



**HAL**  
open science

# Caractérisation phénotypique et moléculaire de différents complexes clonaux de *Staphylococcus lugdunensis*

Laurie Destruel

► **To cite this version:**

Laurie Destruel. Caractérisation phénotypique et moléculaire de différents complexes clonaux de *Staphylococcus lugdunensis*. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR061 . tel-04703460

**HAL Id: tel-04703460**

**<https://theses.hal.science/tel-04703460v1>**

Submitted on 20 Sep 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.



# THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

## Caractérisation phénotypique et moléculaire de différents complexes clonaux de *Staphylococcus lugdunensis*

Présentée et soutenue par  
**LAURIE DESTRUEL**

**Thèse soutenue le 14/09/2023**  
devant le jury composé de :

M. ROMAIN BRIANDET	Directeur de Recherche - INRA PARIS	Rapporteur du jury
MME FANY REFFUVEILLE	Maître de Conférences HDR - UNIVERSITE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE	Rapporteur du jury
MME SANDRINE MARIE DAHYOT	Maître de Conf Univ. - Prat Hospitalier - Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. GILLES PREVOST	Maître de Conf Univ. - Prat Hospitalier - UNIVERSITE STRASBOURG	Membre du jury
M. OLIVIER BARRAUD	Professeur des Univ - Prat Hospitalier - UNIVERSITE LIMOGES	Président du jury
MME MARTINE PESTEL-CARON	Professeur des Univ - Prat Hospitalier - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **MARTINE PESTEL-CARON** (DYNAMIQUE MICROBIENNE ASSOCIEE AUX INFECTIONS URINAIRES ET RESPIRATOIRES)



Thèse pour obtenir le diplôme de Doctorat  
Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Présentée et soutenue par  
**LAURIE DESTRUEL**

**Caractérisation phénotypique et moléculaire de différents  
complexes clonaux de *Staphylococcus lugdunensis***

Thèse dirigée par le professeur Martine PESTEL-CARON  
DYNAMICURE Inserm UMR1311 (Dynamique Microbienne associée aux Infections Urinaires  
et Respiratoires)

Thèse soutenue le  
14 septembre 2023  
devant le jury  
composé de :

**Monsieur Romain BRIANDET**

Directeur de recherche  
INRA Paris  
*Rapporteur*

**Madame Fany REFFUVEILLE**

Maitre de conférences HDR  
Université de Reims Champagne Ardenne  
*Rapporteur*

**Monsieur Olivier BARRAUD**

Professeur des Universités –  
Praticien Hospitalier  
Université de Limoges  
*Membre du jury*

**Madame Sandrine DAHYOT**

Maitre de conférences –  
Praticien Hospitalier  
Université de Rouen Normandie  
*Membre du jury*

**Monsieur Gilles PREVOST**

Maitre de conférences –  
Praticien Hospitalier  
Université de Strasbourg  
*Membre de jury*

**Madame Martine PESTEL-CARON**

Professeur des Universités –  
Praticien Hospitalier  
Université de Rouen Normandie  
*Directeur de thèse*



## Remerciements

*A Monsieur le Docteur Romain Briandet. A Madame le Docteur Fany Reffuveille.* Vous me faites l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mes remerciements les plus sincères.

*A Monsieur le Professeur Olivier Barraud.* Je vous remercie de prendre part à ce jury. Merci de me suivre dans mon parcours professionnel depuis mon externat et ce stage de Master. Merci de m'avoir inspirée et aussi, de toujours prendre le temps de me conseiller. Vos conseils me sont précieux.

*A Madame le Docteur Sandrine Dahyot.* Je te remercie d'avoir co-encadré ce long travail de thèse ! Merci pour ta gentillesse, ta douceur et ta bienveillance. Merci de m'avoir permis de mener ce travail à bien et de m'avoir accompagnée tout au long de mon internat.

*A Monsieur le Docteur Gilles Prévost.* Vous me faites l'honneur d'examiner ce travail. Je vous remercie de de me permettre de bénéficier de votre grande expertise.

*A Madame le Professeur Martine Pestel-Caron.* Je vous remercie d'avoir dirigé ce travail. Je vous suis grandement reconnaissante de m'avoir permis de réaliser ce Doctorat et de m'épanouir durant ces cinq années d'internat. Je tiens à vous remercier aussi pour votre humanité, gentillesse et bienveillance, votre confiance et les opportunités que vous m'apportez.

*A Monsieur le Professeur Jean-Christophe Plantier.* Je vous remercie pour votre accueil au sein du laboratoire Dynamicure, où j'ai pu m'épanouir tout au long de mon Doctorat.

*Au laboratoire CBSA.* Merci Sylvie et Magalie pour ces aventures de microscopie confocale ! Merci pour votre gentillesse et tous vos conseils. Magalie, un grand merci pour m'avoir aidé dans tout ce travail, non sans difficultés ! Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leur chaleureux accueil

*Au laboratoire PBS.* Merci Emmanuelle et Laurent pour mes aventures cette fois de protéomiques. Merci pour toute l'aide que vous nous avez apporté. Laurent, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, ton aide lors des manips et ton implication dans notre projet. Merci également à Nicolas pour son aide en ces derniers instants de rédaction.

*A mes collègues du laboratoire Dynamicure (ex GRAM).* Merci pour ces cinq années passées avec. Merci surtout d'avoir partagé ma passion pour la nourriture, les goûters, les Kebab, les concours de raclette ... Et merci Charles de m'avoir détrônée au titre de plus grand mangeur.

Merci Camille et Vincent pour cette année passée avec vous très « InstaGRAMgrammable », et hélène, le 4<sup>ème</sup> membre du cagib élargi.

*Au laboratoire de bactériologie du CHU.* Merci pour votre accueil et ce semestre passé au sein du laboratoire où j'ai pu m'épanouir. Merci à mes co-internes, les « bactéries huiles » ; Maxime (en Harley-Davidson ou presque), Romain (chef de la pause), Souleiman (PUREE !), Bobo

(Bactério au bac !), Marion (sœur Bercoff le temps d'un semestre) et Grégoire (le danseur de Salsa pêcheur professionnel).

*Au laboratoire d'hygiène.* Merci de me faire découvrir la discipline. Merci pour votre gentillesse et bienveillance. Merci Christine pour votre gentillesse et de m'avoir laissé du temps pour me permettre de finaliser cette thèse.

*A mes amis rencontrés tout au long de ces cinq années rouennaises.*

Anne Clémence, Agnès, Valentin, Marie-Anne, Florian, Marion, Chloé. Merci de votre soutien au quotidien et de votre amitié ! Sans vous la vie à Rouen serait nettement moins cool !

*A mes amis des bancs de fac limougeauds.*

Florian, Laura, Sammy, Stéphanie, Agathe, Ismahan. Merci pour ces années dans la plus belle ville de France parait-il.

*A mes amies de toujours.*

Manon et Elise. Merci de toujours faire partie de ma vie.

*A toute ma famille présente et passée.* Merci d'être une famille aimante et de m'avoir si bien entourée depuis toujours.

Tatie Jo, merci pour tes appels hebdomadaires du Samedi, pour ton soutien et tes « Et pas plus ! »

A Nico, merci pour ton soutien et surtout merci de me faire rire à chaque instant !

A Sebas et Sabrina, merci ! Je n'aurais pas pu rêver meilleur frère et belle-sœur !

A mes parents, merci d'accepter toutes mes décisions et de me soutenir dans tous mes choix. Merci d'être de si bons parents et d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

## Sommaire

LISTE DES FIGURES .....	5
LISTE DES TABLEAUX .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS .....	8
CONTEXTE DE LA THESE .....	11
<b>Partie 1 : <i>Staphylococcus lugdunensis</i></b> .....	<b>12</b>
1. Caractéristiques bactériologiques .....	12
2. Résistance et tolérance aux antibiotiques .....	15
3. Manifestations cliniques .....	18
3.1. Infections de la peau et des tissus mous .....	19
3.2. Infections ostéo-articulaires .....	20
3.3. Bactériémies et endocardites infectieuses .....	22
3.4. Autres infections .....	23
4. Facteurs de virulence .....	23
4.1. Facteurs de colonisation .....	24
4.2. Cytolysines .....	26
4.3. Systèmes d'acquisition du fer .....	27
4.4. La lugdunine .....	32
4.5. Formation de biofilm .....	32
4.6. Autres facteurs de virulence .....	33
5. Caractérisation génotypique .....	34
5.1. Méthodes de typage .....	34
5.2. Épidémiologie des infections .....	37
<b>Partie 2 : Résistance des staphylocoques aux antiseptiques utilisés en milieu hospitalier</b> .....	<b>39</b>
1. Antiseptiques utilisés en milieu hospitalier .....	39
1.1. Définitions et mode d'action .....	39
1.2. Classifications .....	40
1.3. Mécanismes d'actions .....	42
2. Résistance aux antiseptiques .....	45
2.1. Mécanismes de résistances aux antiseptiques .....	45
2.2. Épidémiologie de la résistance .....	48

2.2.1.	Méthodes d'évaluation de la résistance .....	48
2.2.2.	Prévalence de la résistance au CHX et au BAC .....	49
2.3.	Résistances croisées avec les antibiotiques.....	52
2.4.	Résistance de <i>S. lugdunensis</i> aux antiseptiques .....	53
<b>Partie 3 : Le biofilm des staphylocoques.....</b>		<b>55</b>
1.	Généralités.....	55
1.1.	Etapas de formation du biofilm.....	56
1.1.1.	Attachement initial .....	57
1.1.2.	Prolifération cellulaire et production de matrice extracellulaire .....	59
1.1.3.	Structuration du biofilm et détachement cellulaire .....	61
1.2.	Composants de la matrice extracellulaire du biofilm .....	64
1.2.1.	Matrice polysaccharidique.....	64
1.2.2.	Matrice protéique.....	66
1.2.3.	L'ADNe .....	71
1.3.	Régulation de la formation de biofilm .....	72
1.3.1.	Régulation par l'opéron <i>ica</i> .....	72
1.3.2.	Systèmes de quorum sensing (QS) .....	73
1.3.3.	Autres systèmes à deux composants (TCS).....	75
1.3.4.	Autres régulateurs .....	77
1.4.	Facteurs influençant la formation et la composition du biofilm .....	78
2.	Biofilm de <i>S. lugdunensis</i> .....	82
2.1.	Formation de biofilm, composition de sa matrice et régulation .....	82
2.1.1.	Capacité de formation de biofilm .....	82
2.1.2.	Composition de la MEC .....	83
2.1.3.	La régulation.....	89
2.2.	Facteurs influençant la formation de biofilm.....	90
<b>Travaux personnels .....</b>		<b>93</b>
1.	Travail personnel : Etude de la sensibilité de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> aux antiseptiques utilisés en milieu hospitalier .....	93
1.1.	Introduction et contexte de l'étude.....	93
1.2.	Publication n°1 : Impact de la lignée clonale sur la sensibilité de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> au digluconate de chlorhexidine et au chlorure de benzalkonium. ....	95

---

1.3.	Principaux résultats.....	97
1.4.	Discussion et perspectives.....	98
2.	Travail personnel : La caractérisation du biofilm de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> révèle des différences clés selon la lignée clonale et la disponibilité en fer .....	103
2.1.	Introduction et contexte de l'étude.....	103
2.2.	Publication n°2 : La caractérisation du biofilm de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> révèle des différences selon la lignée clonale et la concentration en fer disponible.....	105
2.3.	Principaux résultats.....	107
2.4.	Discussion et perspectives.....	110
	CONCLUSION GENERALE.....	118
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	119



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Hémolysse synergique de <i>S. lugdunensis</i> .....	13
<b>Figure 2</b> : Aspect morphologique de cultures de <i>S. lugdunensis</i> formant des Small Variant Colonies (SCV) .....	14
<b>Figure 3</b> : Comparaison des structures de cassette SCCmec de <i>S. lugdunensis</i> avec SCCmec de type V et SCCmec de type IV. ....	16
<b>Figure 4</b> : Classification des staphylocoques en fonction de la présence ou non de la coagulase libre comme facteur majeur de virulence et des données cliniques. ....	18
<b>Figure 5</b> : Infection de la peau et des tissus mous par <i>S. lugdunensis</i> se présentant sous forme de nodule violacé sur la cuisse gauche.....	19
<b>Figure 6</b> : Infection de la peau et tissus mous par <i>S. lugdunensis</i> se présentant sous forme d'érythème cutané et écoulement cicatriciel (à gauche de profil et à droite, de face). ....	20
<b>Figure 7</b> : Protéines de surface ancrées à la paroi cellulaire .....	25
<b>Figure 8</b> : Les systèmes d'acquisition du fer de <i>S. lugdunensis</i> .....	28
<b>Figure 9</b> : Représentations schématiques du locus <i>isd</i> et des protéines Isd de <i>S. lugdunensis</i> avec leur comparaison avec les protéines Isd conservées de <i>S. aureus</i> .....	29
<b>Figure 10</b> : Acquisition du fer à partir de l'hème chez <i>S. lugdunensis</i> .....	30
<b>Figure 11</b> : Représentation du locus <i>lhaSTA</i> situé au sein du locus <i>isd</i> chez <i>S. lugdunensis</i> ..	31
<b>Figure 12</b> : Localisations génomiques des loci de <i>MultiLocus Sequence Typing</i> (MLST) et Multi-Virulence Locus Sequence Typing (MVLST) dans le génome de <i>S. lugdunensis</i> N920143.....	34
<b>Figure 13</b> : Minimum Spanning tree des 240 isolats de <i>S. lugdunensis</i> basée sur le <i>fbl</i> typing .....	38
<b>Figure 14</b> : Structure chimique du digluconate de chlorhexidine .....	43
<b>Figure 15</b> : Structure chimique du chlorure de benzalkonium.....	44
<b>Figure 16</b> : Pompes à efflux de <i>Staphylococcus aureus</i> appartenant aux familles de protéines membranaires MFS, SMR, MATE et ABC .....	45
<b>Figure 17</b> : Cycle du biofilm staphylococcique .....	57
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique de l'ancrage des protéines à la paroi cellulaire via la sortase A chez <i>S. aureus</i> .....	59
<b>Figure 19</b> : Etapes de développement du biofilm chez <i>S. aureus</i> .....	61
<b>Figure 20</b> : Formation de structures amyloïdes-like par les de PSM (A) et la protéine Bap chez <i>S. aureus</i> (C).....	63

<b>Figure 21</b> : Fibres amyloïdes-like formées par la protéine Bap de <i>S. aureus</i> .....	64
<b>Figure 22</b> : Structure chimique du poly- $\beta$ (1-6)-N-acétylglucosamine (PNAG) .....	64
<b>Figure 23</b> : Représentation du locus <i>icaADBC</i> et synthèse du poly- $\beta$ (1-6)-N-acétylglucosamine (PNAG) .....	65
<b>Figure 24</b> : Différences dans les profils protéiques de la matrice du biofilm de <i>S. aureus</i> et des échantillons planctoniques .....	67
<b>Figure 25</b> : Schéma visualisant les profils d'expression des protéines intracellulaires dans les biofilms par rapport aux cultures planctoniques. ....	69
<b>Figure 26</b> : Représentation schématique des principaux systèmes régulateurs impliqués dans la régulation du biofilm staphylococcique .....	72
<b>Figure 27</b> : Illustration de l'organisation du système de du QS Agr dans la formation de biofilm chez <i>S. aureus</i> .....	74
<b>Figure 28</b> : Système à deux composants LytSR et régulation <i>cid/lrg</i> . ....	76
<b>Figure 29</b> : Modélisation de l'agrégation cellulaire et de la stabilisation de la MEC sous l'influence de facteurs environnementaux .....	79
<b>Figure 30</b> : Comparaison de la formation du biofilm par les principaux complexes clonaux (CC) de <i>S. aureus</i> .....	81
<b>Figure 31</b> : Exemple de « <i>rough colony</i> » (b) et colonies lisses de <i>S. lugdunensis</i> .....	83
<b>Figure 32</b> : Organisation génétique du locus <i>icaADBC</i> de <i>S. lugdunensis</i> en comparaison à celui de <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> .....	84
<b>Figure 33</b> : Analyse de la composition de la MEC de <i>S. lugdunensis</i> obtenues par CLSM ...	86
<b>Figure 34</b> : Schéma du locus <i>isd</i> et des gènes mutés .....	87
<b>Figure 35</b> : Proportion d'exopolysaccharides, protéines, ADNe et biomasse de biofilm dans les différentes souches de <i>S. lugdunensis</i> par rapport à la souche de référence formant un biofilm RP62A .....	88
<b>Figure 36</b> : Analyse du biofilm de <i>S. lugdunensis</i> par CLSM .....	90
<b>Figure 37</b> : Analyses par FESEM de biofilms de souches représentatives cultivées à la surface de lamelles de verre .....	91

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Potentiels facteurs de virulence de <i>S. lugdunensis</i> .....	24
<b>Tableau 2</b> : Qualités requises pour un antiseptique.....	40
<b>Tableau 3</b> : Classification des antiseptiques selon leur spectre d'activité .....	41
<b>Tableau 4</b> : Spectre d'activité des principales classes d'antiseptiques .....	42
<b>Tableau 5</b> : Description des pompes d'efflux NorA et Qac identifiées chez <i>S. aureus</i> .....	46
<b>Tableau 6</b> : Principaux régulateurs du biofilm staphylococcique.....	78

## Liste des abréviations

- Aap** : *Accumulation-associated protein*  
**ADN** : Acide DésoxyribloNucléique  
**ADNe** : ADN extracellulaire  
**AFNOR** : Association Française de NORmalisation  
**agr** : *Accessory regulatory factor*  
**AIP** : *Autoincucing peptide*  
**AMM** : Autorisation de mise sur le marché  
**AMP** : Peptide Antimicrobien Cationique  
**Atl** : Autolysine  
**BAC** : Chlorure de benzalkonium  
**BHI** : *Brain Heart Infusion*  
**CC** : Complexe Clonal  
**CCLIN** : Comité de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales  
**CHX** : Digluconate de chlorhexidine  
**CifA** : *Clumping factor A*  
**CLSM** : *Confocal Laser Scanning Microscopy*  
**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide  
**CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice  
**CRISPR/Cas** : *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR-associated genes*  
**CWA** : *Cell wall-anchored proteins*  
**ECF** : *Energy Coupling Factor*  
**EGM** : Element Génétique Mobile  
**EI** : Endocardite Infectieuse  
**EPS** : Substances Polymériques Extracellulaires  
**ESI** : *Electrospray ionization*  
**Fbl** : Protéine de liaison au fibrinogène  
**Fib** : Protéine de liaison au fibrinogène  
**Fnb** : Protéine de liaison à la fibronectine  
**FRP2** : Récepteur humain formyl-peptide 2  
**IAS** : Infections Associées aux Soins  
**ica** : *Intracellular adhesin*  
**IOA** : Infection Ostéo Articulaires  
**IPTM** : Infection de la Peau et Tissus Mous  
**Isd** : *Iron surface determinant*  
**Lha** : *Lugdunensis heme acquisition*  
**LPXTG** : Leucine-Proline-X-Threonine-Glycine  
**MALDI-TOF** : *Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight*  
**MATE** : *Multiple antimicrobial extrusion protein family*  
**MEC** : Matrice ExtraCellulaire  
**MFS** : *Major facilitator super family*  
**MLST** : *Multilocus sequence typing*

**MLVA** : *Multi-locus VNTR analysis*  
**MSCRAMM** : *Microbial surface componennts recognizing adhesive matrix molecules*  
**MVLST** : *Multi virulence sequence typing*  
**NEAT** : *Near iron transporter*  
**Nuc** : Thermonucléase  
**OatA** : Peptidoglycane O-acétyltransférase  
**ORSL** : *Oxacillin-resistant S. lugdunensis*  
**OSSL** : *Oxacillin-sensitive S. lugdunensis*  
**PCR** : *Polymerase chain reaction*  
**PIA** : *Polysaccharide intracellular adhesin*  
**PNAG** : Poly- $\beta$ (1-6)-N-acétylglucosamine  
**PSM** : *Phenol small modulins*  
**QAC** : *Quaternary ammonium compound*  
**QS** : *Quorum sensing*  
**SA** : Sidérophores staphyloferrine A  
**SaeRS** : *Staphylococcus aureus exoprotein expression*  
**SarA** : *Staphylococcal accessory regulator*  
**SARM** : *Staphylococcus aureus Résistant à la Méricilline*  
**SasG** : Protéine de surface G  
**SASM** : *Staphylococcus aureus Sensible à la Méricilline*  
**SB** : Staphyloferrine B  
**SCCmec** : *Staphylococcal cassette chromosome mec*  
**SCN** : Staphylocoque à Coagulase Négative  
**ScrA** : *Staphylococcus aureus clumping regulator*  
**SCV** : *Small colony variants*  
**SLUSH** : *Staphylococcus lugdunensis synergistic haemolysin*  
**SMR** : *Small multidrug resistant transporter family*  
**SRIS** : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique  
**SrrAB** : *Staphylococcal respiratory response regulator*  
**SrtA** : Sortase A  
**SST7** : Système de Sécrétion de Type 7  
**ST** : *Sequence type*  
**TCS** : Système à deux composants  
**TRST** : *Tandem repeats sequence typing*  
**TSB** : *Trypticase Soy Broth*  
**VNTR** : *Variable number of tandem repeats*  
**VT** : *Virulence type*  
**vWbl** : Protéine de liaison au facteur de von Willebrand  
**vWf** : Facteur de von Willebrand



## Contexte de la thèse

Ce travail de Doctorat a été mené au sein de l'équipe de recherche DYNAMICURE (Dynamique microbienne associée aux infections urinaires et respiratoires) Inserm UMR1311 (ex Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne, GRAM, EA2656).

Il a été initié à un moment où, du fait de sa virulence particulière, *Staphylococcus lugdunensis* représentait un des modèles d'étude du laboratoire GRAM des mécanismes gouvernant l'adaptation des bactéries à leur hôte et à leur environnement.

L'objectif de mon Doctorat était de caractériser cette espèce sur les plans phénotypique et moléculaire à la recherche de facteurs pouvant expliquer la prévalence mondiale de certains complexes clonaux définis par MultiLocus Sequence Typing.

Nos travaux ont ainsi investigué deux hypothèses pour expliquer le succès évolutif de ces clones :

- une résistance aux antiseptiques fréquemment utilisés en milieu hospitalier
- un avantage phénotypique en termes de fitness et/ou de production de biofilm.

Ce manuscrit comporte une première partie présentant des données bibliographiques concernant *S. lugdunensis*, la résistance aux antiseptiques et le biofilm des staphylocoques.

La seconde partie présente les résultats des travaux de ce Doctorat consacrés à :

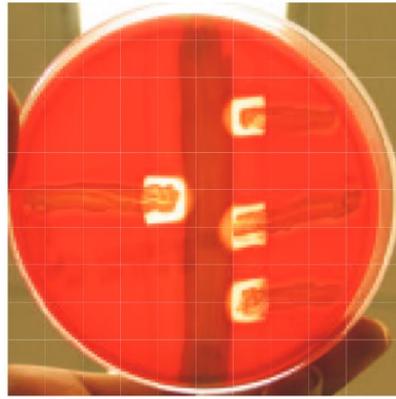
- l'étude phénotypique et moléculaire de la sensibilité de *S. lugdunensis* au digluconate de chlorhexidine et au chlorure de benzalkonium,
- l'analyse de la capacité de souches cliniques à former du biofilm en milieu riche et en conditions de stress (carence en fer) ainsi que la caractérisation de la matrice du biofilm de deux souches de *S. lugdunensis*.

## Partie 1 : *Staphylococcus lugdunensis*

C'est en 1988 que Freney *et al.* ont décrit pour la première fois à Lyon une nouvelle espèce de staphylocoque à coagulase négative (SCN), nommée *Staphylococcus lugdunensis* ; elle appartient à la famille des *Staphylococcaceae* (Freney *et al.*, 1988). *S. lugdunensis* fait partie du microbiote cutané humain normal (Heilbronner and Foster, 2021) ; 30 à 50% des humains en sont porteurs, en particulier les patients en hémodialyse (Ho *et al.*, 2015; Xavier Argemi, Hansmann, *et al.*, 2017). Il est particulièrement retrouvé au niveau des plis inguinaux, des orteils et des aisselles. Cependant, contrairement à *Staphylococcus aureus*, *S. lugdunensis* n'est que peu retrouvé au niveau des fosses nasales (Van Der Mee-Marquet *et al.*, 2003; Bieber and Kahlmeter, 2010; Ho *et al.*, 2015).

### 1. Caractéristiques bactériologiques

*S. lugdunensis* se présente comme une bactérie sous forme de cocci à Gram positif immobile. Les cellules mesurent de 0,8 à 1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre et se présentent seules ou par paires, en grappes ou en chaînes courtes. Le peptidoglycane de la paroi cellulaire est composé de L-lysine-glycine, et les acides teichoïques de la paroi cellulaire contiennent du glycérol, du glucose et de la glucosamine (Freney *et al.*, 1988). *S. lugdunensis* est une espèce non exigeante et aérobie-anaérobie facultative. *S. lugdunensis* produit une  $\delta$ -like hémolysine, similaire à celle de *S. aureus*. Cette hémolysine résulte de trois peptides produits lors de l'expression du locus *slush*. Elle est détectée par un CAMP-test, en agissant par synergie avec une  $\beta$ -hémolysine (par exemple de *S. aureus*) pour produire une zone d'hémolyse complète sur gélose au sang de mouton (Figure 1).

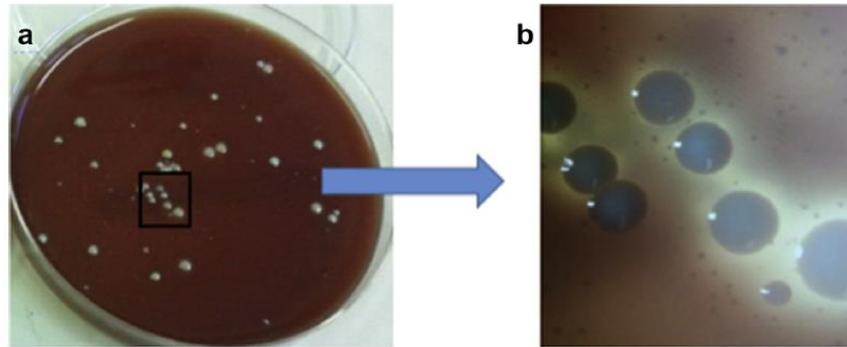


**Figure 1 : Hémolyse synergique de *S. lugdunensis*** (adapté de [Frank, del Pozo and Patel, 2008]).

Deux souches de *S. lugdunensis* (à droite et à gauche) sont ensemencées perpendiculairement à une souche de *S. aureus*, ensemencée verticalement, sans toucher la souche de *S. aureus*. L'hémolysine de type  $\delta$  de *S. lugdunensis*, médiée par trois peptides produits lors de l'expression du locus *slush*, agit en synergie avec la  $\beta$ -hémolysine de *S. aureus* pour produire une zone d'hémolyse complète sur la gélose au sang de mouton après 18 heures d'incubation à 37°C.

L'aspect des colonies sur gélose varie selon les souches (colonies blanches ou crèmes mais aussi jaunes à dorées). Une des caractéristiques de cette espèce est le fait que les colonies peuvent être lisses et brillantes (« *smooth colony* ») ou au contraire rugueuses (« *rough colony* ») (Frank, del Pozo and Patel, 2008).

A noter que *S. lugdunensis* est capable de former des *small colony variants* (SCV), difficiles à détecter. Ce sont des sous-populations à croissance lente, non pigmentées et non hémolytiques. Elles peuvent être retrouvées dans des contextes cliniques particuliers, et notamment les infections sur matériel. En 2005, Seifert *et al.* ont isolé des SCVs de *S. lugdunensis* d'une endocardite dont l'origine était un stimulateur cardiaque (Seifert *et al.*, 2005). Plusieurs équipes ont quant à elles isolé des SCVs lors d'infections sur prothèse articulaire (Figure 2) (Tande *et al.*, 2014; X. Argemi, Dahyot, *et al.*, 2017; Askar, Bloch and Bayston, 2018). Ces SCVs peuvent conduire à des infections latentes, chroniques ou récurrentes (Askar, Bloch and Bayston, 2018).



**Figure 2 : Aspect morphologique de cultures de *S. lugdunensis* formant des Small Variant Colonies (SCV) (Askar, Bloch and Bayston, 2018)**

(a) Culture du sonication de la prothèse retirée sur gélose au sang après 72 heures d'incubation, montrant de grandes colonies entourées d'un grand nombre de très petits établissements. Le carré marqué est grossi 10 fois en (b) pour montrer plus clairement les petites colonies.

Sur le plan biochimique, *S. lugdunensis* produit une catalase, mais pas d'oxydase. Il ne produit pas de coagulase libre, et est ainsi classé dans le groupe des SCNs. Il se distingue des autres SCNs par son activité ornithine décarboxylase et pyrrolidonyl arylamidase (Frank, del Pozo and Patel, 2008) ainsi que par la production d'une tannase qui lui est spécifique, codée par le gène *tanA* (Noguchi *et al.*, 2007).

En condition d'aérobiose, des acides sont produits à partir du D-glucose, D-fructose, D-mannose, maltose, D-tréhalose, alpha-lactose, saccharose, de la N-acétylglucosamine et du glycérol (Frank, del Pozo and Patel, 2008).

Avant les années 2010, l'identification rapide et la distinction de *S. aureus* des SCNs en routine reposait sur un test rapide d'agglutination au latex, permettant de détecter la coagulase liée de *S. aureus*. Cependant ces tests impliquant une sensibilisation des particules de latex par du fibrinogène et *S. lugdunensis* produisant une protéine de liaison au fibrinogène (Fbl) ; ils étaient alors à l'origine de faux positifs (65 % d'après l'étude de Mateo *et al.*) (Mateo *et al.*, 2005). Par ailleurs, les méthodes biochimiques n'étant pas assez discriminantes, les SCNs étaient rarement identifiées au rang d'espèce. Depuis, l'implémentation de la spectrométrie de masse de type *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight* (MALDI-TOF) en laboratoire de routine a permis d'identifier de manière fiable et rapide au rang d'espèce, *S. lugdunensis* facilitant ainsi le suivi des infections à cette espèce (Argemi *et al.*, 2015).

## 2. Résistance et tolérance aux antibiotiques

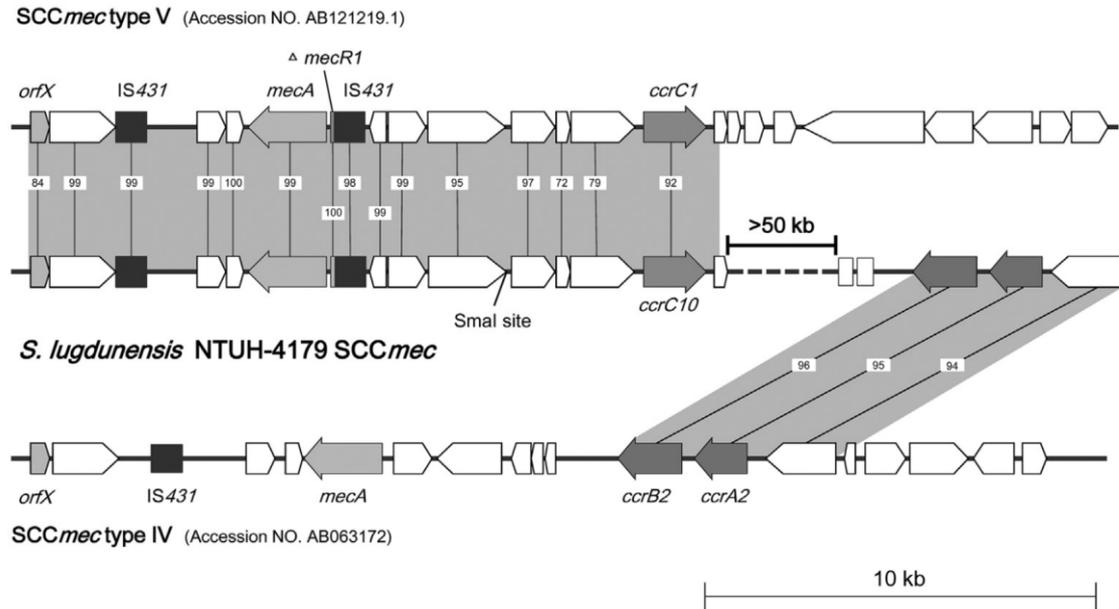
A ce jour, contrairement aux autres SCNs tels que *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* reste très sensible à la plupart des antibiotiques anti-staphylococciques (McHardy *et al.*, 2017; Taha, Stegger and Söderquist, 2019). Cela pourrait être expliqué par le fait que *S. lugdunensis* possède un pan-génome fermé avec de multiples barrières au transfert horizontal de gènes, contrairement à d'autres staphylocoques qui ont un pan-génome ouvert. En effet, le génome de *S. lugdunensis* possède plusieurs opérons codant des systèmes de restriction-modification, de CRISPR/Cas et de toxine/antitoxine (Argemi *et al.*, 2018).

### $\beta$ -lactamines

*S. lugdunensis* peut développer une résistance aux  $\beta$ -lactamines par production d'une pénicillinase (codée par le gène *blaZ*) ou acquisition d'une cassette SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) comme chez *S. aureus*. La production de pénicillinase se traduit par un phénotype de résistance à la pénicilline G, aux aminopénicillines, carboxy- et uréido-pénicillines. Cette résistance varie à travers le monde, probablement du fait de problèmes méthodologiques de détection (la méthode de détection la plus fiable étant la méthode de diffusion en gélose avec un disque de 1 UI de pénicilline G) (Hagstrand Aldman and Pålman, 2020; Teh *et al.*, 2022). Selon les études, elle varie de 15,4 à 55,4% (Herchline *et al.*, 1990; Hellbacher, Törnqvist and Söderquist, 2006; Böcher *et al.*, 2009; Hagstrand Aldman and Pålman, 2020; Fernández-Fernández *et al.*, 2022), voire 67,4% en Asie (Yen *et al.*, 2016) mais en moyenne de l'ordre de 25%.

Le deuxième mécanisme de résistance aux bêtalactamines est la méticillino-résistance. Elle est médiée par le gène *mecA* codant une PLP (Protéine Liant la Pénicilline) additionnelle, la PLP2a de faible affinité pour l'ensemble des bêtalactamines sauf la ceftaroline et le ceftobiprole. Le gène *mecA* est localisé dans un élément génétique mobile, la cassette SCCmec, qui s'intègre dans le génome des staphylocoques après transfert horizontal (Hiramatsu *et al.*, 2014).

A ce jour, cinq types de cassettes SCCmec ont été décrites chez *S. lugdunensis*. C'est en Asie que les cinq éléments SCCmec I, II, IV, V et Vt ont été identifiés ; les souches de *S. lugdunensis* possédant les cassettes SCCmec de type II et V étaient épidémiques (Figure 3) (Ho *et al.*, 2015; Tseng *et al.*, 2015a; Yeh *et al.*, 2015; Yen *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2021). Récemment, une étude japonaise a mis en évidence une cassette SCCmec avec trois complexes *ccr*, structurellement unique et actuellement non typable (Shibuya *et al.*, 2020).



**Figure 3 : Comparaison des structures de cassette SCCmec de *S. lugdunensis* avec SCCmec de type V et SCCmec de type IV (Tseng et al., 2015a).**

Le rectangle noir indique IS431 ; les flèches grises indiquent les gènes *orfX*, *mecA* et *ccrC* ; et les flèches blanches montrent des gènes hypothétiques.

La méticillino-résistance varie selon l'origine géographique des souches et probablement également du fait des méthodologies et des concentrations critiques utilisés (Teh et al., 2022). Décrite pour la première fois en 2003 chez une souche responsable de bactériémie sur cathéter chez un nouveau-né prématuré à Singapour (Tee et al., 2003), elle est actuellement particulièrement prévalente en Asie, notamment à Singapour (4,7%) (Tan, Ng and He, 2008), Hong-Kong (8,3% à 18,7%) (Ho et al., 2015, 2021) et Taïwan (20% à 36,4%) (Yeh et al., 2015; Yen et al., 2016; Chang, Lin and Lu, 2021).

Des souches de *S. lugdunensis* résistantes à la méticilline ont été rapportées dans de nombreux pays des différents continents mais généralement à un taux très faible : 0,4% (2 sur 540) en Suède (Taha, Stegger and Söderquist, 2019), 1% en Australie (Teh et al., 2022), 1,8% en Espagne (1 sur 56 souches collectées entre 2013 et 2018) (Fernández-Fernández et al., 2022), 2,3% à 4,7 % aux Etats-Unis (Kleiner et al., 2010; McHardy et al., 2017). A noter qu'au Danemark et en Suisse, aucune résistance à la méticilline n'a été détectée parmi les isolats analysés (491 isolats collectés entre 2002 et 2006, et 38 isolats entre 1999 et 2003, respectivement) (Hellbacher, Törnqvist and Söderquist, 2006; Böcher et al., 2009).

### **Tolérance aux glycopeptides**

Une souche tolérante aux antibiotiques se caractérise par une Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) indiquant une sensibilité à l'antibiotique, mais une résistance à l'effet bactéricide de l'antibiotique définie par un rapport CMB/CMI supérieure à 32 ou un défaut de bactéricidie lors de réalisation de courbes de bactéricidie (réduction du nombre de bactéries survivantes après 24h inférieure à 3 log<sub>10</sub>) (May *et al.*, 1998).

Un phénomène de tolérance aux glycopeptides a été mis en évidence chez des souches de *S. lugdunensis* par Frank *et al.*. Les 15 souches de l'étude étaient sensibles à la vancomycine (CMI comprises entre 0,5 et 2 µg/mL) mais 93 % des souches y étaient tolérantes (CMB/CMI ≥ 32) (Frank *et al.*, 2007).

Ceci a été également observé par Bourgeois *et al.* qui ont évalué la tolérance de *S. lugdunensis* par réalisation de courbes de bactéricidie. Six des treize isolats étaient tolérants aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) ; alors que l'activité bactéricide des glycopeptides était perturbée, plus faible et plus lente vis-à-vis des sept autres souches (Bourgeois *et al.*, 2007).

Ce phénomène de tolérance est à prendre en considération, car même si *S. lugdunensis* reste encore très sensible aux antibiotiques, il a été suggéré que la tolérance et la persistance peuvent faciliter l'évolution vers la résistance aux antibiotiques (Levin-Reisman *et al.*, 2017).

### **Autres antibiotiques**

Des résistances aux macrolides (érythromycine) et lincosamides (lincomycine) ont été décrites mais à taux faible (Böcher *et al.*, 2009; Kleiner *et al.*, 2010), mais de l'ordre de 7% dans l'étude espagnole récente de Fernandez-Fernandez. De la même façon, un faible taux de résistance aux aminosides, aux tétracyclines ont été publiées (Hellbacher, Törnqvist and Söderquist, 2006; Kleiner *et al.*, 2010; McHardy *et al.*, 2017; Taha, Stegger and Söderquist, 2019). La résistance à la fosfomycine (médiée par la présence du gène *fusB*) est quant à elle variable, avec des taux de souches résistantes qui peuvent être supérieurs à 50 % d'après Argemi *et al.* (Xavier Argemi, Hansmann, *et al.*, 2017).

### 3. Manifestations cliniques

Les SCNs sont des pathogènes opportunistes, de plus en plus impliqués dans les infections associées aux soins (IAS) (infection qui survient au cours ou au décours de la prise en charge d'un patient, si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge). Ils sont notamment responsables de la majorité des infections sur matériel, *S. epidermidis* étant l'espèce la plus fréquemment isolée dans ce contexte (Becker, Heilmann and Peters, 2014; Heilmann, Ziebuhr and Becker, 2019; Becker *et al.*, 2020).

Cependant, *S. lugdunensis* occupe une place particulière au sein des SCNs. Becker *et al.* en 2014 ont proposé une classification des staphylocoques, en fonction des manifestations cliniques observées et de la pathogénicité de ces espèces, définissant par exemple le « groupe *S. epidermidis*-like » comprenant notamment *S. epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus*. *S. lugdunensis* occupe une place intermédiaire entre *S. aureus* et *S. epidermidis*, du fait des caractéristiques des infections dont il est responsable (Figure 4) (Becker, Heilmann and Peters, 2014).

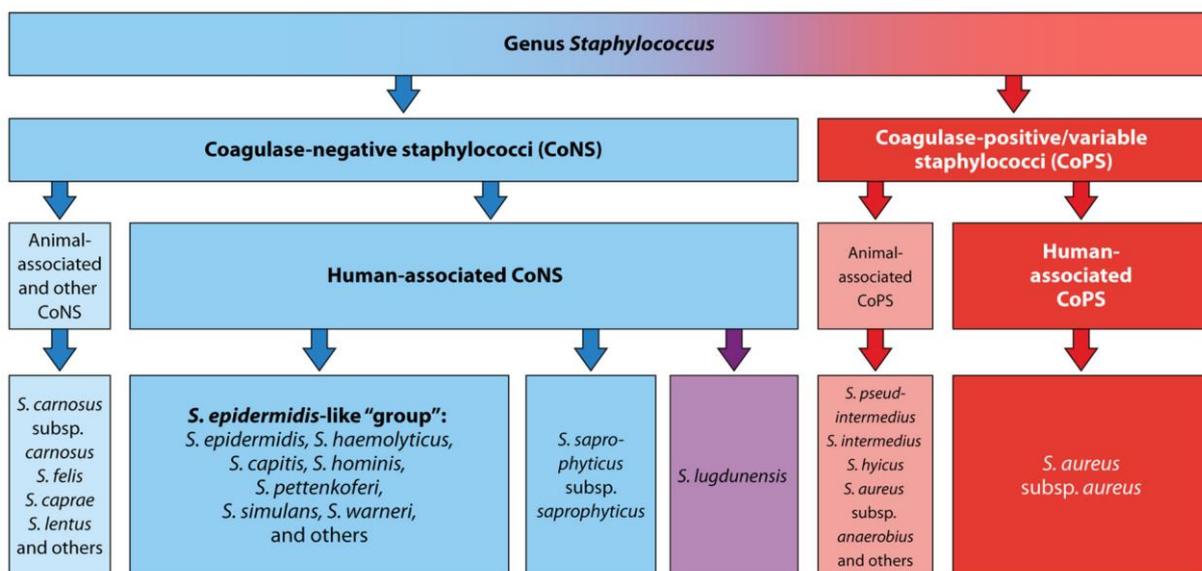


Figure 4 : Classification des staphylocoques en fonction de la présence ou non de la coagulase libre comme facteur majeur de virulence et des données cliniques (Becker, Heilmann and Peters, 2014).

En effet, *S. lugdunensis* est une espèce de SCN particulièrement virulente. Frank *et al.* qualifient cette espèce de « loup déguisé en agneau » (Frank, del Pozo and Patel, 2008).

Par ailleurs, dans une étude rétrospective française, l'avènement de la spectrométrie de masse de type MALDI TOF et son implantation en routine, ont permis d'identifier 85 % des SCNs au rang d'espèce contre seulement 14 % auparavant par méthodes phénotypiques (Argemi *et al.*, 2015). Grâce à cette nouvelle approche, il a été possible de mettre en évidence l'implication de *S. lugdunensis* en infectiologie (Argemi *et al.*, 2015; Hauser *et al.*, 2021).

### **3.1. Infections de la peau et des tissus mous**

Les principales infections causées par *S. lugdunensis* sont des infections de la **peau et tissus mous (IPTM)** (Böcher *et al.*, 2009; Guet-Revillet *et al.*, 2014; Heldt Manica and Cohen, 2017; Natsis and Cohen, 2018; Zaaroura *et al.*, 2018). Ces infections se présentent le plus fréquemment sous forme d'abcès (Yeh *et al.*, 2016). Dans une étude israélienne récente s'intéressant aux IPTMs à *S. lugdunensis* sur une période de huit ans (septembre 2009 à septembre 2017), les manifestations cliniques les plus fréquentes étaient des folliculites et pustuloses cutanées (16/29 patients, 55 %), suivies d'infections des lésions cutanées de patients atteints d'hidrosadénite suppurée ou maladie de Verneuil (5/29, 17 %) (Figure 5, Figure 6). Plus rarement, les souches avaient été isolées dans le cadre de surinfection d'infection cutanée virale (*molluscum contagiosum*) (deux cas), d'une folliculite décalvante, d'une cellulite disséquante du cuir chevelu, d'un kyste, d'un impétigo et d'un granulome après traumatisme (Zaaroura *et al.*, 2018). D'autres études ont isolé *S. lugdunensis* d'infections de plaies, de paronychies, de furoncles et de fêlons (Böcher *et al.*, 2009; Natsis and Cohen, 2018).



**Figure 5 : Infection de la peau et des tissus mous par *S. lugdunensis* se présentant sous forme de nodule violacé sur la cuisse gauche** (Lozano-Masdemont, Gómez-Recuero-Muñoz and Pulido-Pérez, 2015).



**Figure 6 : Infection de la peau et tissus mous par *S. lugdunensis* se présentant sous forme d'érythème cutané et écoulement cicatriciel (à gauche de profil et à droite, de face) (Delaunay et al., 2014).**

Böcher *et al.* ont mené une étude sur un très grand nombre d'infections (491 infections à *S. lugdunensis*) et ont montré que les IPTMs étaient plus fréquemment localisées au-dessous de la taille (56 %) et que le site le plus fréquemment infecté était les orteils (21 %) ; ces localisations correspondant aux niches naturelles de *S. lugdunensis*. Par ailleurs, une étude française s'intéressant au portage de *S. lugdunensis* chez 140 patients à leur porte d'entrée en unité de chirurgie plastique a montré que 22% des patients étaient porteurs dans la zone inguinale et que le portage au niveau des deux plis inguinaux était fréquent (68 % des porteurs). Ceci pourrait expliquer la prévalence des infections dans cette région anatomique (Van Der Mee-Marquet *et al.*, 2003).

A noter que la majorité des IPTMs sont liées à des souches communautaires, comme rapporté dans l'étude rétrospective de Yeh *et al.* (Yeh *et al.*, 2016). Les IPTMs à *S. lugdunensis* sont également plus fréquentes chez les femmes (Böcher *et al.*, 2009; Heldt Manica and Cohen, 2017). Enfin, deux études ont trouvé que près de la moitié des patients infectés présentaient des comorbidités, telles qu'un traitement immunosuppresseur, un diabète ou un antécédent traumatique au niveau du site infectieux (Herchline *et al.*, 1990; Heldt Manica and Cohen, 2017). La prise en charge de ces IPTMs nécessitent majoritairement un traitement antibiotiques ainsi qu'un drainage des abcès (Parthasarathy *et al.*, 2020).

### **3.2. Infections ostéo-articulaires**

Les **infections ostéo-articulaires (IOA)** figurent au deuxième rang des infections à *S. lugdunensis*. *S. lugdunensis* est responsable d'ostéomyélite, de spondylodiscites et d'arthrites septiques (Frank, del Pozo and Patel, 2008; Babu and Oropello, 2011). Ces IOAs surviennent principalement sur matériel, en particulier sur prothèse de genou (Shah *et al.*, 2010; Lourtet-

Hascoët, 2016; Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017a; Hagstrand Aldman and Pählman, 2020; Herry *et al.*, 2022).

Une étude toulousaine multicentrique rétrospective (2000 à 2014) a ainsi décrit 28 cas d'IOA sur matériel, majoritairement des prothèses de genou ( $n = 16$ ) puis de la hanche ( $n = 10$ ), du pied ( $n = 1$ ) et d'épaule ( $n = 1$ ) (Lourtet-Hascoët, 2016). De la même façon, l'étude rétrospective de Shah *et al.* a rapporté 28 épisodes d'IOA sur matériel chez 22 patients, dont 25 sur prothèse de genou et trois sur prothèse de hanche ; une équipe suisse avait isolé elle aussi la plupart des souches à partir de prothèse de genou (20 des 36 cas d'IOA sur matériel) (Hagstrand Aldman and Pählman, 2020). L'étude strasbourgeoise d'Argemi *et al.* s'est intéressée quant à elle à 28 cas d'IOA identifiés de 2013 à 2016, dont 16 survenaient sur matériel (neuf étant des prothèses de genou) (Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017a).

Les souches d'IOA sur prothèses étaient majoritairement sensibles aux  $\beta$ -lactamines (86% des souches) et à la vancomycine dans l'étude américaine de Shah *et al.* (Shah *et al.*, 2010), et à la lévofloxacine et la rifampicine (61% des patients traités par cette association) dans l'étude toulousaine (Lourtet-Hascoët, 2016).

Les épisodes traités avec un antibiotique de la classe des  $\beta$ -lactamines en parentéral semblaient avoir une évolution plus favorable que ceux traités avec de la vancomycine. Par ailleurs, le relai par la thérapie orale, lévofloxacine associée à de la rifampicine, a permis d'obtenir une issue favorable pour 89 % des infections traitées (Lourtet-Hascoët, 2016). Herry *et al.* ont quant à eux observé que 19,8 % des traitements médicamenteux ont échoué et ont alerté sur la difficulté de traiter ces infections et le rôle essentiel d'une bonne prise en charge chirurgicale (Herry *et al.*, 2022).

D'autre part, la présence de matériel est fréquemment associée à la formation de biofilm. 100% des souches isolées d'IOA formaient du biofilm dans l'étude d'Argemi *et al.* (28 souches) et celle de Hagstrand Aldman et Pählman (36 souches) (Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017a; Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023). De plus, l'étude strasbourgeoise a montré que la formation de biofilm *in vitro* survient très tôt (à 6 heures, toutes les souches avaient atteint leur niveau maximal de production de biofilm). Ces données justifient que les traitements de ces infections reposent sur des traitements antibiotiques à fortes doses et/ou sur des durées prolongées, associés à une prise en charge chirurgicale optimisée et adaptée au contexte (Herry *et al.*, 2022). Notamment, toutes les IOAs de l'étude strasbourgeoise ont nécessité une

intervention chirurgicale et la majorité (92 %) des patients de l'étude suisse ont subi une intervention chirurgicale (Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017a; Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023).

### **3.3. Bactériémies et endocardites infectieuses**

La prévalence des bactériémies à *S. lugdunensis* est faible en comparaison à celle des bactériémies causées par les autres SCNs (moins de 1 % des hémocultures à SCN) (Bieber and Kahlmeter, 2010; Pfaller *et al.*, 1999).

Parmi les hémocultures positives à *S. lugdunensis*, 23,3 % à 30 % étaient cliniquement significatives selon les études (Ebright, Penugonda and Brown, 2004; Choi *et al.*, 2010; Non and Santos, 2017). Ce faible taux signifie que *S. lugdunensis* est souvent considéré comme un contaminant comme les autres SCNs. La bactériémie à *S. lugdunensis* est considérée comme cliniquement significative si deux hémocultures séparées ou une hémoculture et une autre culture de site normalement stérile étaient positives et si le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) était présent sans autre explication (Choi *et al.*, 2010; Hauser *et al.*, 2021).

Cependant, Hauser *et al.* ont comparé une paire d'hémocultures positive *versus* plusieurs paires positives comme critère de significativité et ont conclu qu'il semble prudent de traiter *S. lugdunensis* dans une seule fiole comme une véritable bactériémie. En d'autres termes, il faudrait lui appliquer les critères de significativité de *S. aureus* compte-tenu de sa virulence, et non ceux des SCNs, en tenant compte des signes cliniques (Hauser *et al.*, 2021).

Bien que *S. lugdunensis* soit rarement impliqué dans les bactériémies, il n'est pas rare que les patients développent une **endocardite infectieuse** (EI) (1 % à 46,4 % des cas) (Anguera, 2005; Zinkernagel *et al.*, 2008; Non and Santos, 2017). De plus, Petti *et al.* ont montré en 2008, que *S. lugdunensis* était le deuxième SCN impliqué dans les EI après *S. epidermidis* (Petti *et al.*, 2008). Les EI à *S. lugdunensis* se démarquent de celles des SCNs par plusieurs caractéristiques, notamment par leur caractère particulièrement agressif, similaire à celles causées par *S. aureus*. Les EIs à *S. lugdunensis* se caractérisent en effet par une formation fréquente d'abcès et d'embolies septiques, une forte destruction valvulaire et une mortalité élevée par rapport aux EIs à *S. aureus* (20 % à 42 % des EI) (Vandenesch *et al.*, 1993; Anguera, 2005; Liu *et al.*, 2010; Aldman *et al.*, 2021). Cependant, une étude récente ne confirmait pas cette survenue de complications sévères (seulement deux cas d'embolisation septiques dans leur étude). Par

ailleurs, les EIs sont principalement des infections d'origine communautaire dont la porte d'entrée n'est souvent pas identifiée (Liu *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la majorité des EIs survenait sur valves natives (70 % à 78,7 % des cas) contrairement aux autres SCNs qui sont essentiellement responsables d'EI sur prothèses valvulaires et dispositifs à demeure (Anguera, 2005; Liu *et al.*, 2010; Non and Santos, 2017; Aldman *et al.*, 2021). En comparaison, les EIs sur valve prothétique ou pacemaker étaient plus rare (9 patients) mais étaient caractérisées par une mortalité plus élevée (78%) dans l'étude d'Anguer *et al.* (Anguera, 2005). D'autre part, les EIs à *S. lugdunensis* survenaient plus fréquemment chez les hommes (61,2 %), et l'âge moyen des individus était de 53,9 ans (Liu *et al.*, 2010). Les EIs à *S. lugdunensis* ont nécessité un recours à la chirurgie dans 23,3 % à 66,7 des cas (Anguera, 2005; Liu *et al.*, 2010; Aldman *et al.*, 2021).

### **3.4. Autres infections**

Enfin, d'autres infections à *S. lugdunensis*, plus rares, ont également été décrites, comme des infections oto-rhino-laryngologiques, infections oculaires, des péritonites, des infections du tractus urinaire et des infections du système nerveux central (Frank, del Pozo and Patel, 2008; Chiu *et al.*, 2020; Kosecka-Strojek *et al.*, 2022).

## **4. Facteurs de virulence**

La physiopathologie des infections à *S. lugdunensis* reste peu connue, mais quelques facteurs de virulence, avérés ou potentiels, ont été décrits. L'analyse du génome de *S. lugdunensis* a permis de définir de potentiels facteurs de virulence résumés dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Potentiels facteurs de virulence de *S. lugdunensis* (Heilbronner and Foster, 2021)**

Virulence-associated factor	Comment(s)
Capsular polysaccharide Cap	CC3 Cap homologous to type 8 Cap of <i>S. aureus</i> . Others type 5.
Polysaccharide intercellular adhesion Ica	Homology to <i>ica</i> locus of <i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i> .
Polyglutamic acid capsule Pga	Homology to the <i>pga</i> locus of <i>S. epidermidis</i> .
$\beta$ -Hemolysin Hlb	Homologous to $\beta$ -hemolysin, sphingomyelinase of <i>S. aureus</i> .
Hemolysin III	Homologous to hemolysin III of <i>Bacillus cereus</i> .
<i>S. lugdunensis</i> synergistic hemolysins SLUSH	Three synergistic hemolytic peptides. $\beta$ -Type phenol-soluble modulins. Some isolates lack SLUSH-C. SLUSH-B activates FPR2.
ESAT-6 like secretion system Ess/type VII	Highly variable CC-dependent genetic organization.
Multiple peptide resistance factor MprF	Synthesis of lysyl-phosphatidylglycerol. Resistance to antimicrobial peptides.
Dlt	D-Alanylation of teichoic acids. Resistance to antimicrobial peptides.
Peptidoglycan O-acetyltransferase Oat	Survival in macrophages. Resistance to lysozyme.
Lugdulysin	Metalloprotease. Expression <i>in vitro</i> associated with infective isolates. Homology to the Shpl protease of <i>S. hyicus</i> but not to <i>S. aureus</i> serine or cysteine proteases.
Superoxide dismutase SodA	90% identical to SodA in <i>S. aureus</i> . Reduction in reactive oxygen species in phagocytes.
Nuclease	Homologue of <i>S. aureus</i> thermonuclease.
Fibrinogen binding protein of <i>S. lugdunensis</i> Fbl	CWA protein of MSCRAMM family closely related to ClfA of <i>S. aureus</i> . Expression <i>in vitro</i> associated with infective isolates.
von Willebrand factor binding protein of <i>S. lugdunensis</i> vWbl	CWA surface protein binding von Willebrand factor? Frameshift mutation or stop codon in several CCs. No evidence of promoting adhesion to vWF.
<i>S. lugdunensis</i> Sl surface protein	Variable repeat numbers cause length differences in SlA, SlG, and SlE. SlA absent from CC3 and CC5.
Iron-regulated surface determinant Isd proteins	Uptake of heme from hemoglobin. Growth in iron-restricted medium with hemoglobin as sole source of iron. Locus duplicated in HKU09-01.
Iron-regulated ECF heme transporter Lha	Uptake of heme from hemoglobin and myoglobin.

<sup>a</sup>Most genes are present in 100% of genome sequences analyzed by (Lebeurre et al., 2019) (23).

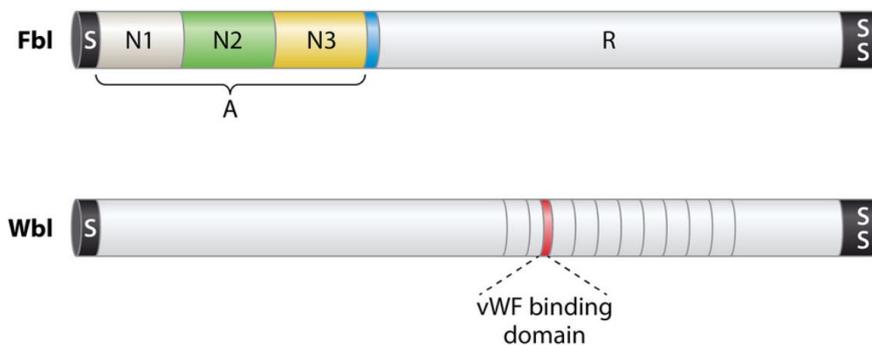
#### 4.1. Facteurs de colonisation

Les interactions des bactéries avec leur environnement sont façonnées par la composition de leur paroi cellulaire. Les bactéries à Gram positif possèdent dans leur paroi des protéines attachées de manière covalente au peptidoglycane par des sortases, et sont nommées protéines ancrées à la paroi (*Cell Wall-Anchored proteins*, CWA). Elles sont notamment impliquées dans l'étape d'adhésion de par leur capacité à promouvoir les interactions avec les cellules de l'hôte (Heilbronner and Foster, 2021).

Alors que le génome de *S. lugdunensis* a révélé la présence de neuf gènes codant potentiellement des protéines de type CWA (Heilbronner and Foster, 2021), seules deux ont été caractérisées : la protéine de liaison au Fibrinogène (Fbl) et la protéine de liaison au facteur von Willebrand (vWbl).

La **protéine de liaison au facteur von Willebrand** est une protéine de surface de 2 060 acides aminés, codée par le gène *vWbl*. Cette protéine **vWbl** a une organisation typique des protéines de surface staphylococciques, avec un peptide signal N-terminal et en région C-terminale, un signal d'ancrage à la paroi cellulaire par liaison à une sortase. Le domaine minimal de liaison au facteur de von Willebrand (vWf) correspond à une séquence de 24 résidus dans des domaines répétés R2 de cette extrémité C-terminale (Figure 7) (Nilsson, Bjerketorp, Wiebenschj , et al., 2004).

Cependant, la fonction de vWbl n'est pas claire à ce jour car un mutant de délétion du gène *vwbl* a été capable de lier le vWf comme la souche sauvage (Liesenborghs *et al.*, 2016).



**Figure 7 : Protéines de surface ancrées à la paroi cellulaire** (Heilbronner and Foster, 2021).

Schémas montrant les deux protéines ancrées à la paroi, protéine de liaison au fibrinogène (Fbl) et au facteur de von Willebrand (Wbl). Les pré-protéines ont une séquence signal (S) qui favorise la sécrétion à travers la membrane à l'extrémité N-terminale et un signal (SS) à l'extrémité C-terminale pour l'ancrage au peptidoglycane. Le domaine A de Fbl est composé de trois sous-domaines, N2 et N3 étant nécessaires pour la liaison du fibrinogène. La région R comprend des répétitions SDSDSA, qui forment une tige flexible. Le domaine de liaison vWF putatif de Wbl est indiqué en rouge.

La **protéine de liaison au fibrinogène** (Fbl) est un membre de la famille Sdr (groupe de protéines de surface cellulaire staphylococcique contenant une région caractéristique de répétition sérine-aspartate) ; elle est codée par le gène *fbl*. C'est la région A (domaine N1, N2, N3) qui est impliquée dans la liaison au fibrinogène (Figure 7). Les domaines de liaison N2 et N3 présentent 62% d'identité avec ceux du *clumping factor A* (ClfA) de *S. aureus* (Nilsson, Bjerketorp, Guss, *et al.*, 2004). L'alignement des domaines A de ClfA et Fbl a révélé que tous les domaines de ClfA impliqués dans la liaison à la chaîne C du fibrinogène sont conservés chez Fbl (Mitchell, Tristan and Foster, 2004).

L'étude de Chatzigeorgiou *et al.* a montré que *fbl* était présent chez toutes les souches de *S. lugdunensis* contrairement aux autres SCN ; *fbl* constitue alors une cible d'identification spécifique à *S. lugdunensis* (Chatzigeorgiou *et al.*, 2010). De plus, par sa variabilité génétique, il s'est avéré que le gène *fbl* était un bon marqueur pour réaliser le typage des souches par séquençage de la région codant le domaine R. Le domaine R de Fbl (motif hexapeptidique SDSDSA) est légèrement différent de celui de ClfA (répétitions SD uniquement). Il est codé par un nombre variable de répétitions de 18 paires de bases situées immédiatement en amont de la région codante pour la séquence de fixation C-terminale. La taille du domaine R de *fbl* varie selon les souches (Figure 7) (Dahyot *et al.*, 2019).

Cependant, malgré la présence du gène *fbl*, le niveau de liaison des souches au fibrinogène est variable (Dahyot *et al.*, 2019) voire inexistant (seulement trois des huit souches de l'étude de Szabados *et al.* ont montré une liaison au fibrinogène) (Szabados *et al.*, 2011). Fbl est alors un facteur de colonisation et de virulence en fonction de sa capacité de liaison au fibrinogène.

#### 4.2. Cytolysines

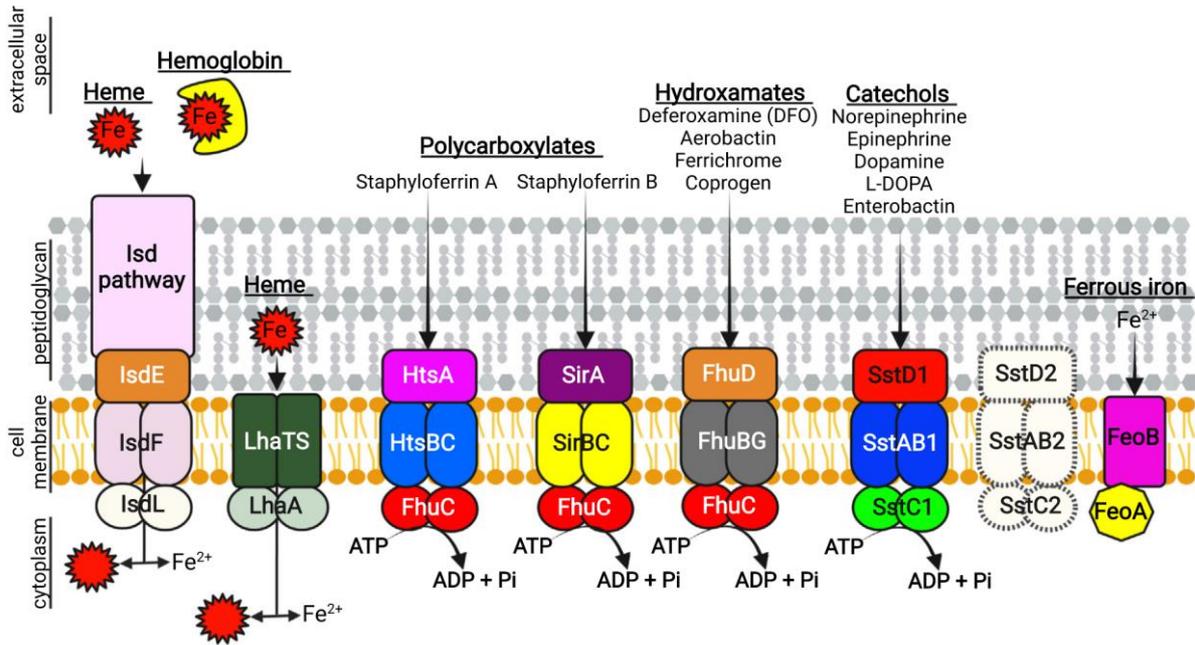
Un autre des facteurs de virulence de *S. lugdunensis* est sa capacité à lyser les érythrocytes humains qui lui permet de pourvoir à ses besoins en fer (Frank, del Pozo and Patel, 2008). Certaines souches de *S. lugdunensis* produisent une *S. lugdunensis synergistic haemolysin* (SLUSH), phénotypiquement similaire à la  $\delta$ -hémolysine de *S. aureus* et codée par l'opéron *slush*. SLUSH est composé de trois petits peptides, SLUSH-A, SLUSH-B et SLUSH-C dont l'expression est régulée par le locus *agr* (Donvito *et al.*, 1997, 2006; Chin *et al.*, 2022). A noter que les peptides SLUSH appartiennent à la famille des *Phenol Soluble Modulins* (PSM) (Rautenberg *et al.*, 2011). Ces peptides SLUSH ont un rôle pro-inflammatoire via leur interaction avec le récepteur humain formyl-peptide 2 (FRP2) qui induit un recrutement et une stimulation des leucocytes. Les peptides SLUSH pourraient avoir un rôle important dans la virulence de *S. lugdunensis* car il a été montré que la libération de PSM (via l'activation de FPR2) est étroitement corrélée à la capacité de provoquer des infections invasives pour *S. aureus* et *S. epidermidis* (Cheung *et al.*, 2010).

*S. lugdunensis* possède également une activité protéolytique. Il a récemment été décrit une nouvelle protéase, la **lugdulysine**, codée par le gène *shp I* (X. Argemi, Prévost, *et al.*, 2017). C'est une métalloprotéase dépendante du  $Zn^{2+}$ , qui est sécrétée sous la forme d'un propeptide et ressemble étroitement à l'hycolysine de *Staphylococcus hyicus* (62,4 % d'homologies de séquence) dont elle partage le même domaine catalytique HEXXH, bien qu'à des positions différentes. La lugdulysine est un membre de la famille des protéases M30 dont l'expression est régulée par le locus *agr* (Chin *et al.*, 2022). Dans leur étude prospective VISLISI menée de novembre 2013 jusqu'à mars 2016, Argemi *et al.* ont montré que la production de cette nouvelle protéase était fortement associée à la survenue d'infections profondes, aux bactériémies et aux IOAs sur matériel ou non. L'implication des métalloprotéases dans les IOAs reposerait sur leur capacité à remodeler la matrice extracellulaire de l'hôte (X. Argemi, Prévost, *et al.*, 2017) mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer le rôle de cette lugdulysine.

### **4.3. Systèmes d'acquisition du fer**

Le fer est un nutriment essentiel pour la croissance bactérienne et doit être présent sous forme libre pour être utilisé par les bactéries. Chez l'hôte, la concentration en fer est très faible du fait de leur séquestration par les protéines, notamment la transferrine et la lactoferrine (mise en place d'une immunité nutritionnelle). Le fer est également présent dans l'hème, constituant de l'hémoglobine des érythrocytes circulants. Les bactéries vont donc développer des systèmes d'acquisition du fer, dépendant ou non de l'hème, afin d'acquérir une concentration suffisante à leurs besoins nutritionnels et à leur survie (Flannagan *et al.*, 2022).

Parmi les systèmes d'acquisition du **fer non hémique**, figurent des systèmes de transport. Les systèmes de transport protéiques Fhu et Sst, codés par les gènes *fhuC* et *sst-1* respectivement, permettent de récupérer du fer via les sidérophores hydroxamate, catéchol et catécholamines. Un troisième système de transport (FeoAB), codé par les gènes *feoAB* permet d'acquérir du fer en conditions environnementales acides. Contrairement à *S. aureus*, *S. lugdunensis* ne produit pas les sidérophores staphyloferrine A (SA) et staphyloferrine B (SB) permettant l'acquisition du fer. Cependant, *S. lugdunensis* exprime les transporteurs HtsABC et SirABC qui sont capables de transporter les xénosidérophores SA et SB de *S. aureus* respectivement (Figure 8) (Heilbronner and Foster, 2021; Flannagan *et al.*, 2022).



**Figure 8 :** Les systèmes d'acquisition du fer de *S. lugdunensis* (Flanagan et al., 2022).

La voie du système iron regulated surface determinant (*Isd*) est composée de protéines ancrées au peptidoglycan (rectangle rose) qui peuvent se lier à l'hème libre ou à l'hémoglobine à la surface de la cellule bactérienne et extraire l'hème. Au niveau de la membrane cytoplasmique, l'hème est lié par la lipoprotéine *IsdE* et transporté à l'intérieur de la cellule par la perméase *IsdF*. Le fer ( $Fe$ ) est libéré de l'hème par l'hème oxygénase *IsdG* (non représenté). L'hème peut également être transporté à travers la membrane cytoplasmique par un transporteur de type ECF codé par les gènes *lhaSTA*. Les sidérophores polycarboxylates staphyloferrine A et staphyloferrine B, fabriqués par *S. aureus*, peuvent être transportés par les transporteurs dédiés de type ABC *HtsABC* et *SirABC*, respectivement. Les sidérophores de type hydroxamate sont transportés par le transporteur de type *FhuDBGC* ABC. L'ATPase *FhuC* est utilisée par les systèmes de transport *Hts*, *Sir* et *Fhu* pour hydrolyser l'ATP et fournir l'énergie nécessaire à l'absorption des sidérophores. Des molécules contenant du catéchol telles que la noradrénaline ou une hormone de réponse au stress de l'hôte, sont transportées par *S. lugdunensis* via le transporteur *Sst1 ABC* codé par les gènes *sstABCD1*. Le deuxième transporteur de type *Sst ABC* codé par les gènes *sstABCD2* (indiqué par les formes blanches avec des lignes pointillées) ne semble pas être exprimé chez *S. lugdunensis* et n'aide pas la croissance de *S. lugdunensis* grâce aux catécholamines comme source de fer. *S. lugdunensis* peut également utiliser le fer directement de l'environnement grâce au transporteur de fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) *FeoAB*. ECF, facteur de couplage énergétique ; L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphénylalanine.

Pour l'acquisition du **fer héminique**, *S. lugdunensis* est le seul SCN possédant un système *Iron Surface Determinant* (*Isd*) fonctionnel lui permettant d'acquérir le fer héminique de l'hémoglobine. Ce système est codé par l'opéron *isd*, composé de 13 gènes et présentant une organisation similaire à celui de *S. aureus* (Figure 9).

Les séquences d'acides aminés prédites des protéines *Isd* ancrées à la paroi cellulaire de *S. lugdunensis* sont comparables aux protéines *Isd* homologues de *S. aureus*. Les protéines *IsdB* et *IsdJ* de *S. lugdunensis* avaient chacune deux domaines NEAT (*near iron transporter*), tandis que *IsdC* et *IsdK* en ont un seul. *IsdB* et *IsdJ* ont des séquences de reconnaissance de la sortase A

(LPATG et LPNTG, respectivement), alors que IsdC et IsdK ont des séquences de reconnaissance de type sortase B (NPQTS et NKQPN, respectivement). Les identités des protéines de *S. lugdunensis* et *S. aureus* se produisent principalement dans les domaines NEAT. Ainsi, les protéines IsdB et IsdC de *S. lugdunensis* sont des orthologues des protéines IsdB et IsdC de *S. aureus* avec respectivement 37 % et 57 % d'identité ; IsdJ et IsdK présentent des similitudes avec IsdA de *S. aureus* (Figure 9)(Zapotoczna *et al.*, 2012).

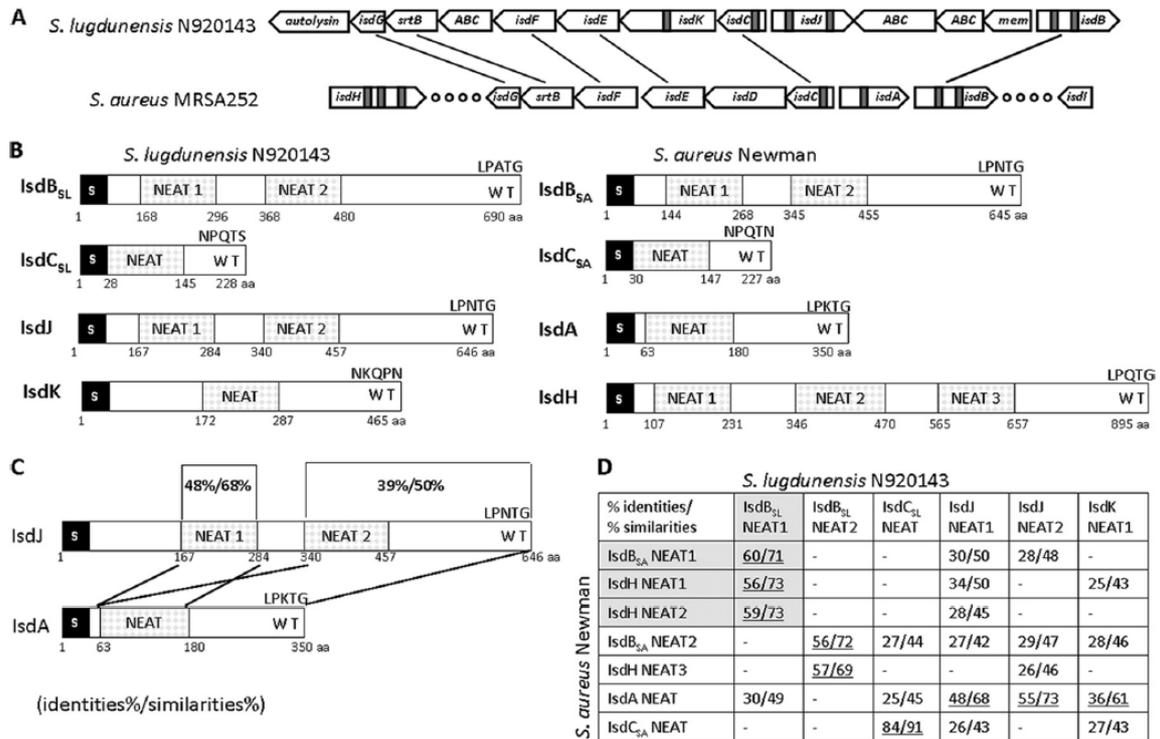
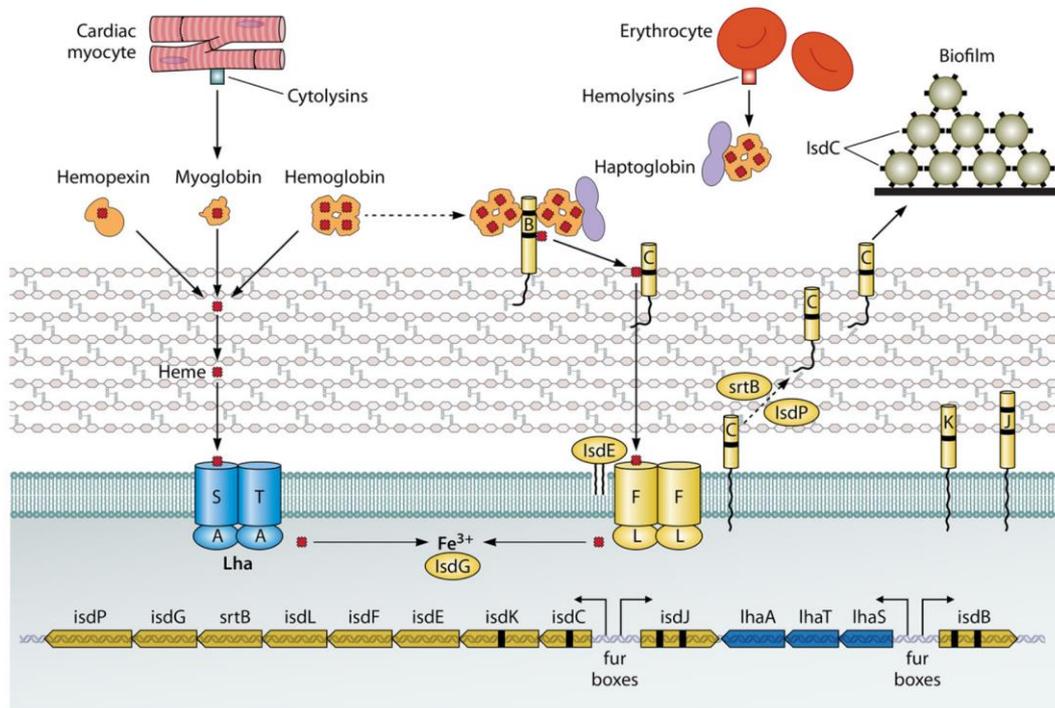


Figure 9 : Représentations schématiques du locus *isd* et des protéines *Isd* de *S. lugdunensis* avec leur comparaison avec les protéines *Isd* conservées de *S. aureus* (Zapotoczna *et al.*, 2012).

(A) Comparaison des locus *isd* de *S. aureus* et *S. lugdunensis*. Les lignes noires relient les gènes orthologues. Les domaines NEAT sont indiqués par des cases grises. Les gènes *isdH* et *isdI* de *S. aureus* sont situés à l'extérieur du locus, comme indiqué par des cercles. (B) Représentation schématique des protéines putatives ancrées à la paroi cellulaire *IsdB*, *IsdC*, *IsdJ* et *IsdK* de *S. lugdunensis* et *IsdB*, *IsdC* et *IsdH* de *S. aureus*. Les séquences signal (S) et les motifs putatifs d'ancrage de la paroi cellulaire (WT) sont indiqués. (C) Schéma représentant la conservation dans des régions spécifiées de *S. aureus* *IsdA* et *S. lugdunensis* *IsdJ*. (D) Tableau comparatif de la conservation des acides aminés entre les domaines NEAT des protéines *Isd* de *S. aureus* et de *S. lugdunensis*. Les champs surlignés en gris représentent les domaines NEAT de liaison à l'Hb, tandis que les champs blancs montrent les domaines NEAT de liaison à l'hème. Les niveaux d'homologie les plus significatifs sont soulignés.

Le fonctionnement du système *Isd* chez *S. lugdunensis* est le suivant : les protéines *Isd* capturent l'hème de l'hémoglobine, le transfèrent à travers la paroi via des transporteurs membranaires qui libèrent l'hème dans le cytoplasme où des oxygénases libèrent le fer. Les protéines *Isd* sont exprimées en condition de carence en fer. *IsdB* est la seule protéine du système *Isd* qui joue le

rôle de récepteur de l'hémoglobine. Le domaine NEAT1 d'IsdB lie l'hémoglobine et les complexes hémoglobine-haptoglobine, tandis que NEAT2 lie l'hème. L'hème est transféré du domaine NEAT2 d'IsdB au motif NEAT unique d'IsdC (Zapotoczna *et al.*, 2012). IsdC est ancrée à la paroi grâce à l'action d'une autolysine IsdP (co-transcrit avec l'opéron *isd*) ; cette dernière clive le peptidoglycane entre la lysine du peptide et la cinquième glycine du pont inter-peptidique, pour qu'IsdC puisse s'ancrer au peptidoglycane par la sortase B (Farrand *et al.*, 2015). IsdC transfère alors l'hème à travers la paroi. IsdJ et IsdK ne sont pas ancrés à la membrane par une sortase et leur rôle dans l'acquisition de l'hème n'est pas encore élucidé (Zapotoczna *et al.*, 2012). IsdG est une oxygénase se liant à l'hème et le dégradant, libérant ainsi le fer sous forme libre et le rendant disponible pour la bactérie (Figure 10) (Haley *et al.*, 2011).

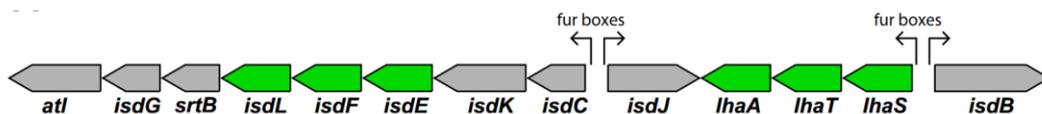


**Figure 10 : Acquisition du fer à partir de l'hème chez *S. lugdunensis*** (Heilbronner 2021).

La partie inférieure du schéma représente l'organisation génétique du locus *isd* de *S. lugdunensis*. Les emplacements des boîtes *fur* et les sens de transcription après induction par limitation en fer sont indiqués par des flèches. Au-dessus, sont représentés la membrane cellulaire et le peptidoglycane de la paroi cellulaire et la localisation des protéines *Isd* (à droite) et des protéines *Lha* (à gauche). Les hémoprotéines sont représentées avec leurs molécules d'hème liées (rectangles rouges). La myoglobine et l'hémoglobine sont respectivement libérées des myocytes et des érythrocytes sous l'action des toxines cytolytiques. Les tirets noirs dans les gènes et les protéines indiquent les domaines NEAT. *IsdB* NEAT1 peut lier l'hémoglobine et le complexe haptoglobine-hémoglobine. Le passage de l'hème à travers la paroi cellulaire et la membrane s'effectue via les systèmes *Lha* ou *Isd*, et le fer  $Fe^{3+}$  est libéré par l'hémoxygénase intracellulaire *IsdG*. Les protéines *IsdC* favorisent également la formation de biofilm.

Par ailleurs, Heilbronner *et al.* ont montré que le locus *isd* de la souche *S. lugdunensis* HKU09 - 01 est dupliqué en tandem. Cette duplication est un événement intrinsèque instable dépendant de RecA, conduisant à une variation importante du nombre de copies du locus *isd*. L'amplification du locus augmente le niveau d'expression des protéines Isd, améliore la liaison de l'hémoglobine à la surface cellulaire de la souche *S. lugdunensis* HKU09-01 et offre un avantage lorsque les souches sont en compétition pour une quantité limitée d'hémoglobine comme seule source de fer (Heilbronner *et al.*, 2016). Enfin, des études ont montré que IsdC était impliqué dans la formation de biofilm (ce rôle sera décrit dans la partie 3 du manuscrit) (Missineo *et al.*, 2014; Aubourg *et al.*, 2020).

Plus récemment, un deuxième système d'acquisition du fer héminique putatif a été décrit chez *S. lugdunensis*, le transporteur ABC de type ECF (*Energy Coupling Factor*) nommé Lha (*Lugdunensis heme acquisition*) (Figure 8). Le locus codant ce système est composé de trois gènes (*lhaS*, *lhaT* et *lhaA*) qui sont situés entre *isdJ* et *isdB*. Une « *fur box* » située en amont du gène *lhaS* pourrait potentiellement réguler la transcription du locus. En outre, il a été montré qu'une condition limitante en fer (milieu chélaté avec de l'EDTA) avait pour conséquence une surexpression de *lhaS* et *lhaA*, indiquant que la carence en fer activerait la transcription du locus *lhaSTA* (Figure 11). Une analyse du cadre de lecture ouvert a révélé que *lhaSTA* code pour les composants du transporteur ECF putatif, à savoir une sous-unité de spécificité (LhaS), une sous-unité transmembranaire (LhaT) et une ATPase (LhaA) (Jochim *et al.*, 2020).



**Figure 11 : Représentation du locus *lhaSTA* situé au sein du locus *isd* chez *S. lugdunensis* (Jochim *et al.*, 2020).**

La direction de la transcription est indiquée par des flèches. Les transporteurs membranaires ABC sont représentés en vert.

L'emplacement au sein de l'opéron *isd* suggère son rôle de transporteur dans l'acquisition du fer ; le système Lha permettrait d'extraire l'hème de diverses hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine, hémopexine) de l'hôte (Figure 8) (Jochim *et al.*, 2020; Flannagan *et al.*, 2022).

Ce système, de description récente constitue une nouvelle stratégie pour surmonter la limitation nutritionnelle en fer lors d'une infection.

#### **4.4. La lugdunine**

Récemment, il a été découvert dans le microbiome nasal humain le premier antibiotique synthétisé de manière non ribosomique : la lugdunine (Zipperer *et al.*, 2016). C' est un thiazolidine cycloheptapeptidique, membre fondateur de la nouvelle classe d'antibiotiques fibupeptidiques (Schilling *et al.*, 2019) ; constituant de nouveaux agents antimicrobiens prometteurs.

La lugdunine est codée par l'opéron *lug* composé de 14 gènes (*lugJ* à *lugM*), et régulé par LugR. (Fu *et al.*, 2023). De façon intéressante, deux études ont mis en évidence que les variations génétiques des gènes *lug* étaient dépendantes du complexe clonal de la souche de *S. lugdunensis* (Lebeurre *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2023).

La lugdunine est alors synthétisée par des synthétases peptidiques non ribosomiques. Elle inhibe le développement des bactéries en perturbant leur potentiel membranaire, probablement à la manière d'un protonophore (Schilling *et al.*, 2019). En plus de son activité antimicrobienne directe, la lugdunine stimule les cellules de la peau humaine qui produisent alors des peptides antibactériens de défense de l'hôte agissant en synergie avec la lugdunine dans l'élimination des microorganismes sensibles (Bitschar *et al.*, 2019). La lugdunine possède alors une activité bactéricide contre les bactéries Gram positive, notamment contre *S. aureus*. La découverte de cette bactériocine contribue à expliquer les différentes niches de portage de *S. aureus* et *S. lugdunensis* ; les individus qui hébergent *S. lugdunensis* dans leurs narines sont moins susceptibles d'être porteurs de *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016).

#### **4.5. Formation de biofilm**

La capacité de formation de biofilm est un facteur de virulence majeur dans les infections à staphylocoques. Le biofilm est notamment associé aux infections sur matériel, comme les cathéters (von Eiff, Peters and Heilmann, 2002; Becker, Heilmann and Peters, 2014; Heilmann, Ziebuhr and Becker, 2018). Chez *S. lugdunensis*, il serait d'importance particulière dans les IOAs sur matériel (Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017b; Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023).

Les connaissances actuelles du biofilm staphylococcique, et les données existantes chez *S. lugdunensis*, seront développées dans la partie 3 de ce manuscrit.

#### ***4.6. Autres facteurs de virulence***

*S. lugdunensis* est l'agent d'infections parfois profondes, et pour cela il a dû développer des systèmes d'évasion au système immunitaire pour survivre *in vivo*. En 1990, Lambe *et al.* a révélé l'existence d'un glycocalyx décrit comme une protection membranaire chez *S. lugdunensis* (Lambe Jr. *et al.*, 1990). Plus tard, des analyses génomiques ont identifié chez *S. lugdunensis* le locus *cap* codant pour la synthèse du polysaccharide capsulaire (O'Riordan and Lee, 2004; Heilbronner *et al.*, 2011). La capsule constituerait une protection contre la phagocytose par les macrophages. D'autre part, *S. lugdunensis* a la capacité de sécréter une nucléase extracellulaire qui pourrait empêcher l'action des neutrophiles (Heilbronner and Foster, 2021).

Par ailleurs, *S. lugdunensis* parvient à survivre dans les macrophages (et les cellules de Kupffer) en partie grâce à sa capacité à résister au lysozyme via l'acétylation de l'acide muramique dans le peptidoglycane par le peptidoglycane O-acétyltransférase (OatA) (Bera *et al.*, 2006) ; l'acétylation empêche ainsi la liaison au lysozyme (Bera *et al.*, 2004). Le lysozyme n'est alors plus capable de cliver le peptidoglycane modifié.

Enfin, l'addition de résidus D-alanine aux molécules d'acide teichoïque par l'activité du système Dlt (Peschel *et al.*, 1999) et la synthèse de lysyl phosphatidyl glycérol sur la surface externe de la membrane cytoplasmique par MprF (Peschel *et al.*, 2001) entraînent la création de surfaces chargées positivement qui repoussent les peptides antimicrobiens cationiques (AMP) (Weidenmaier *et al.*, 2005).

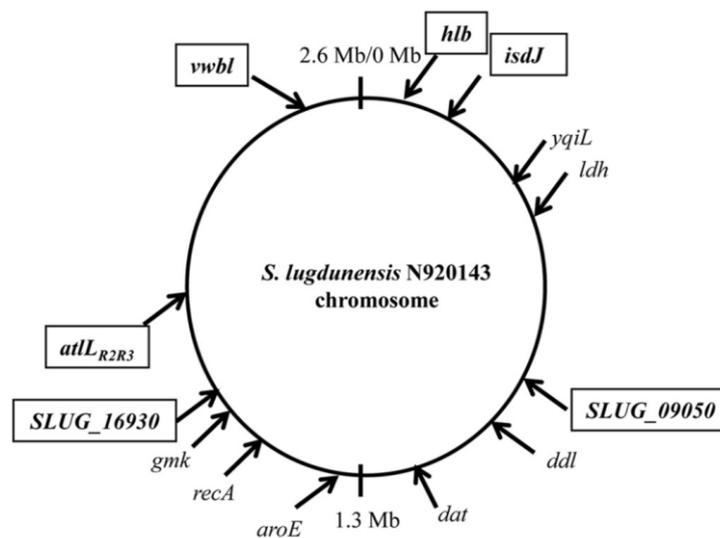
De façon intéressante, des analyses génomiques ont identifié le locus *ess* chez *S. lugdunensis* ; il présentait des homologies avec celui de *S. aureus*. En outre, Lebeurre *et al.* ont montré que l'organisation génétique du locus était dépendant du complexe clonal. (Warne *et al.*, 2016; Lebeurre *et al.*, 2019). Chez *S. aureus*, ce locus code pour un système Ess (système de sécrétion ESAT-6) également nommé système de sécrétion de type 7 (SST7) composé de 12 protéines (Cao *et al.*, 2016) et impliqué dans la formation d'abcès (Kneuper *et al.*, 2014), la pathogénicité (Burts *et al.*, 2005; Burts, DeDent and Missiakas, 2008) et l'échappement au système immunitaire (Anderson *et al.*, 2017).

## 5. Caractérisation génotypique

L'émergence des infections à *S. lugdunensis* a motivé le développement de différentes techniques de typage des souches dans le but de suivre leur diffusion, au niveau local comme au niveau mondial, et déterminer la structure de population de cette espèce.

### 5.1. Méthodes de typage

En 2012, Chasain *et al.*, ont développé un schéma de **MultiLocus Sequence Typing (MLST)** qui repose sur le séquençage de fragment internes de sept gènes domestiques (*aroE*, *dat*, *ddl*, *gmk*, *ldh*, *recA* et *yqiL*) et l'analyse de leur profil allélique (Figure 12). Cette étude a inclus 87 isolats de diverses origines géographiques et cliniques, et a permis de définir 20 *Sequence Types* (STs) regroupés en cinq Complexes Clonaux (CCs). Le CC principal était le CC1 ( $n = 29$ ), suivi du CC3 ( $n = 20$ ) et du CC2 ( $n = 18$ ). Aucune corrélation entre lignée phylogénétique et source géographique ou manifestation clinique n'a pu être faite. Cette étude a mis en évidence une structure de population clonale pour *S. lugdunensis* (Chassain *et al.*, 2012).



**Figure 12 : Localisations génomiques des loci de MultiLocus Sequence Typing (MLST) et Multi-Virulence Locus Sequence Typing (MVLST) dans le génome de *S. lugdunensis* N920143 (Didi *et al.*, 2014).**

Les sept gènes de ménage du schéma MLST sont indiqués en italique tandis que les sept loci de virulence sont encadrés et en caractères gras.

Par la suite, en 2014, Didi *et al.* se sont intéressés à 93 isolats d'origines géographiques variées et ont analysé par **Multi Virulence Sequence Typing (MVLST)** le polymorphisme de sept gènes connus ou putatifs associés à la virulence (*atILR2*, *atILR3*, *hlb*, *isdJ*, *SLUG\_09050*,

*SLUG\_16930* et *vwbl*) (Figure 12). Cette technique a permis d'identifier 43 *Virulence Types* (VTs) regroupés dans six CCs de virulence, indiquant que la MVLST était significativement plus discriminante que la MLST. Cette étude a confirmé la structure de population clonale, et l'absence de lignée hypervirulente (Didi *et al.*, 2014). A ce jour, 7 CCs sont décrits (<http://bigsd.db.web.pasteur.fr/staphlugdunensis/>).

Plus récemment, dans le but d'étudier plus finement la diffusion et l'épidémiologie des souches de *S. lugdunensis*, notamment celles appartenant aux lignées clonales prédominantes, deux outils ont été développés reposant sur le polymorphisme de régions répétées, les *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs). Ces deux techniques étaient la **Multi-Locus VNTR Analysis** (MLVA) et le **Tandem Repeats Sequence Typing** (TRST) (Dahyot *et al.*, 2018).

La MLVA consistait en l'analyse de sept VNTRs, trois codant des protéines hypothétiques, un codant une protéine impliquée dans la régulation transcriptionnelle et trois non codants. Parmi les 128 isolats analysés, il a été défini 55 MLVA *types* (MTs) regroupés en 6 MLVA *complexes* (MCs). La MLVA était plus discriminante que la MLST et la MVLST (Dahyot *et al.*, 2018). La TRST reposait sur l'analyse des mêmes VNTRs, combinant l'analyse du nombre de motifs répétés à celle des séquences nucléotidiques. Parmi les 128 isolats, il a été identifié 69 TRST *types* (TRTs). La TRST était ainsi légèrement plus discriminante que la MLVA en terme de nombre de génotypes identifiés (Dahyot *et al.*, 2018). Aucune de ces deux techniques n'a permis d'établir un lien entre génotype et manifestations cliniques. De façon intéressante, la MLVA et la TRST prédisaient les CCs de MLST avec une grande précision, tout en discriminant les souches appartenant à certaines lignées chez cette espèce clonale.

Enfin, en 2019, un nouvel outil a été développé : le ***fbl*-typing** (Dahyot *et al.*, 2019). Cette technique, qui repose sur l'analyse d'un seul locus, est moins coûteuse, plus simple à mettre en place et plus rapide. Le *fbl*-typing repose sur le séquençage de la région R du gène *fbl*, codant la protéine de liaison au Fibrinogène (Fbl). Dans l'étude de Dahyot *et al.*, 240 isolats de *S. lugdunensis* d'origines cliniques et géographiques diverses ont été analysés. La longueur du domaine R variait de 9 à 52 répétitions ; 92 *fbl types* ont été identifiés. Le *fbl*-typing présentait un pouvoir discriminant supérieur à celui de la MLST et équivalent à celui de la TRST, tout en prédisant les CCs définis par MLST.

Malgré le développement de toutes ces techniques, aucune lignée hypervirulente ou associée à une origine géographique particulière n'a pu être identifiée.

En outre, une étude taïwanaise s'est intéressée au typage de la région répétée R du gène *vWbl* codant la protéine de liaison au facteur von Willebrand (Lin *et al.*, 2021). La région R contient en effet un nombre de copies de séquences répétées variable entre les souches. Parmi les 212 isolats de *S. lugdunensis* analysés, dont 162 sensibles (*oxacillin-sensitive S. lugdunensis*, OSSL) et 50 résistants à la méticilline (*oxacillin-resistant S. lugdunensis*, ORSL), huit génotypes (comportant 8 à 15 répétitions) ont été identifiés. Certains nombres de répétitions étaient associés au caractère OSSL ou ORSL des souches, ou à certains STs ou SCCmec types (cf chapitre 2), suggérant des spécificités clonales.

La même année, une autre étude taïwanaise s'est intéressée à la distribution phylogénétique du système CRISPR-Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR-associated genes*) (Kao *et al.*, 2021). L'objectif de l'étude était de déterminer une potentielle association entre les systèmes CRISPR-cas de *S. lugdunensis* et les STs définis par MLST ou la sensibilité à l'oxacilline. Les systèmes CRISPR-Cas sont des systèmes de protection des bactéries contre l'ADN exogène (notamment les éléments génétiques mobiles). La région CRISPR est composée de répétitions séparées par des séquences uniques, les *spacers*, dont l'organisation et la composition est variable entre les souches d'une même espèce. L'analyse de 199 isolats (recueillis entre 2009 et 2014 dans un hôpital de Taiwan) a montré que les isolats des ST1, ST6, ST12 et ST15 avaient des systèmes CRISPR-Cas de type IIIA et les isolats des ST4, ST27 et ST29 des systèmes de type IIC. 20.5 % des isolats CRISPR-Cas de type IIIA étaient résistants à l'oxacilline, toutes les souches résistantes appartenant par ailleurs au ST6. Au contraire, l'ensemble des isolats CRISPR-Cas de type IIC étaient sensibles à l'oxacilline. Cette étude a ainsi mis en évidence que les types de CRISPR-Cas étaient associées aux STs et à la sensibilité à l'oxacilline chez *S. lugdunensis* (Kao *et al.*, 2021).

En lien avec la présence de ces systèmes CRISPR-cas ou des Systèmes de Restriction-Modification de type I et II, qui protègent la cellule face à l'invasion d'ADN étranger, il a été montré que *S. lugdunensis* possédait un pangéome fermé, avec une faible diversité génétique (Argemi *et al.*, 2018; Lebeurre *et al.*, 2019). Les données de séquençage génomique ont permis malgré tout d'identifier plusieurs éléments génétiques mobiles (EGM) (plasmides, prophages notamment) qui ne portent pas de gènes codant des facteurs de virulence ni de gènes de résistance (Lebeurre *et al.*, 2019). L'analyse de ces EGM suggère une acquisition par transfert horizontal d'origine staphylococcique (*S. aureus*, *S. epidermidis*) malgré la difficulté à transformer cette espèce (Argemi *et al.*, 2018; Heilbronner and Foster, 2021).

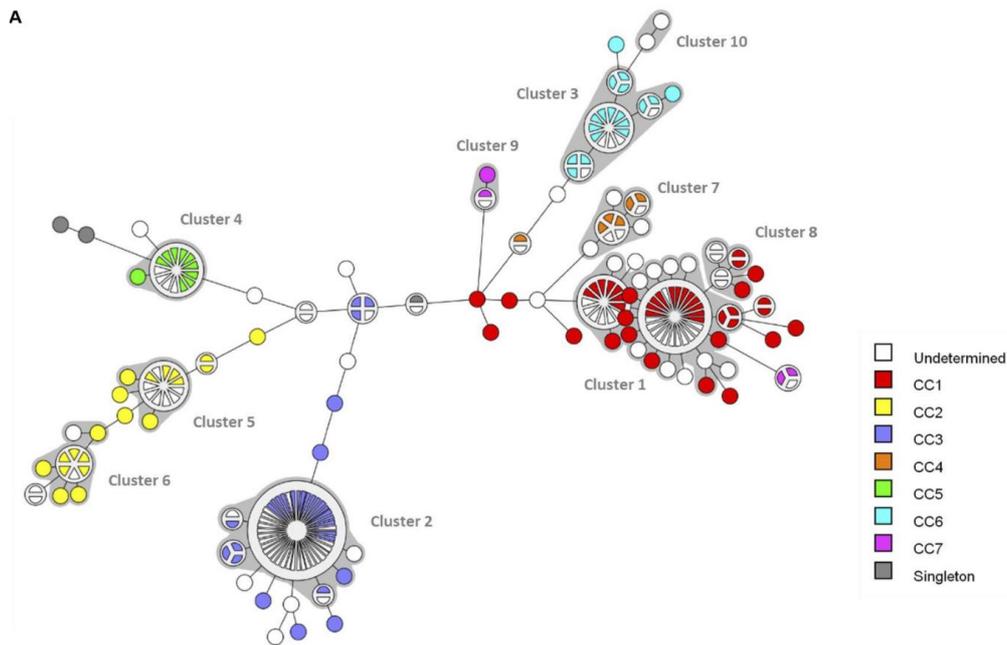
## 5.2. *Épidémiologie des infections*

Grâce au développement de ces méthodes de typage, il a été possible de suivre la diffusion des clones de *S. lugdunensis* dans le monde.

En Asie, Yeh *et al.* ont réalisé une étude rétrospective de 2003 à 2014, incluant 126 souches cliniques de *S. lugdunensis* isolées d'IAS et d'infections communautaires. Par MLST, ils ont mis en évidence que les **CC3** et **CC1** étaient majoritaires et que le ST6 (CC1) était le ST le plus fréquemment identifié ( $n = 40$ ), suivi du ST3 (CC3) ( $n = 33$ ). De plus, la proportion de souches appartenant au CC3 était significativement plus élevée pour les souches isolées d'IAS (82 %) que pour celles isolées d'infections communautaires (18%). A noter que les souches résistantes à l'oxacilline appartenaient aux deux STs les plus représentés, ST3 (78%) et ST6 (15%). La diffusion de certains clones hospitaliers pourrait alors être favorisée par la résistance à l'oxacilline (Yeh *et al.*, 2016).

En 2022, une étude polonaise s'est intéressée à la caractérisation de 18 souches de *S. lugdunensis* collectées sur une période de trois ans et isolées de sinus maxillaires. Une analyse MLST a identifié huit STs correspondants à six CCs, le **CC3** étant majoritaire (sept souches). Cependant, les limites de cette étude sont le faible nombre de souches analysées et son caractère monocentrique (Kosecka-Strojek *et al.*, 2022).

En France, deux études ont montré que les souches appartenant aux **CC1** et **CC3** étaient majoritaires. Ces isolats cliniques provenaient du CHU de Rouen (106 souches) et de Strasbourg (98 souches). Elles avaient été collectées d'infections de localisations diverses isolées de patients de différents services sur une période de 12 mois au CHU de Rouen et 29 mois au CHU de Strasbourg (Figure 13) (Dahyot *et al.*, 2018, 2019).



**Figure 13 : Minimum Spanning tree des 240 isolats de *S. lugdunensis* basée sur le *fbl* typing (adapté de (Dahyot et al., 2019).**

L'analyse de cluster a été réalisée avec BioNumerics. Chaque cercle représente un *fbl*-type et sa taille est proportionnelle au nombre d'isolats. La longueur des branches exprime la distance entre deux *fbl*-types. Les zones grises autour des cercles délimitent les clusters *fbl*. Chaque couleur utilisée représente un complexe clonal (CC) défini par MLST ; undetermined, ST inconnu (isolats non caractérisés par MLST).

Finalement, malgré le développement de ces techniques de typages de plus en plus performantes et discriminantes, les différentes études menées dans le monde n'ont pas permis d'identifier de lignée hypervirulente, et la prédominance des CC1 et CC3 reste à ce jour inexpliquée.

## Partie 2 : Résistance des staphylocoques aux antiseptiques utilisés en milieu hospitalier

### 1. Antiseptiques utilisés en milieu hospitalier

#### 1.1. Définitions et mode d'action

Ces dernières années, les infections associées aux soins à SCN sont en augmentation, en lien avec l'utilisation de matériel étranger (Becker, Heilmann and Peters, 2014; Michels *et al.*, 2021). Parmi les stratégies utilisées dans la lutte contre ces infections, figure l'utilisation d'antiseptiques. Cependant, leur utilisation croissante en milieu hospitalier favoriserait l'émergence de résistance (Block and Furman, 2002; Hardy *et al.*, 2018).

D'après l'Association Française de Normalisation (AFNOR), l'**antiseptie** est une « opération au résultat momentané, permettant au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer tous les microorganismes et/ou d'inactiver les virus en fonction des objectifs fixés. Le résultat est limité aux microorganismes et virus présents au moment de l'opération ». La **désinfection** au sens strict est destinée aux milieux inertes.

Les **désinfectants** sont ainsi destinés à la désinfection des sols et surfaces dans les établissements de santé, alors que les **antiseptiques** sont destinés aux tissus vivants. Dans ce travail, nous nous concentrerons sur les antiseptiques.

D'après le Cclin Sud-Ouest, un antiseptique est un « Produit - à l'exclusion des antibiotiques - utilisé pour son effet d'antiseptie (norme définie par l'Afnor). Les antiseptiques en tant que produits en contact, soit avec une peau lésée, soit sur peau saine avant de léser la peau (champ opératoire, avant ponction, avant injection, etc.) et dans certaines indications thérapeutiques (acné, etc.) font partie de la classe des médicaments. Les antiseptiques disposent d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). Celle-ci précise leurs indications et contre-indications ».

Les antiseptiques peuvent avoir une activité bactériostatique, fongistatique ou virostatique (inhibition de la croissance des micro-organismes) ou être bactéricide, fongicide, virucide, ou sporicide (action létale). Certains antiseptiques possèdent ces deux types d'action en fonction de leur concentration.

Les antiseptiques sont capables d'éliminer la flore transitoire (présente au niveau des couches superficielles de l'épiderme) et réduisent la flore résidente (présente à la surface et dans la couche épidermique et au niveau de la couche cornée et des follicules pileux). Les principales qualités requises pour un antiseptique sont décrites dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Qualités requises pour un antiseptique (CCLin Sud Ouest 2013)**

	Qualités requises pour un antiseptique « idéal »
Avoir un spectre d'activité le plus large possible	+++
Être le moins possible inhibé par les matières organiques	+++
Agir rapidement	+++
Permettre une vision correcte du site opératoire	++
Être stable	++
Agir longtemps	+
Ne pas induire ou sélectionner de résistance	+
Avoir une bonne tolérance cutanée	+
Être très peu allergisant	+
Ne pas provoquer de réactions douloureuses	+
Être le moins cytotoxique possible	+

+++ : très important                      ++ : important                      + : souhaitable

### **1.2. Classifications**

Les antiseptiques peuvent être classés selon la famille chimique, les indications de l'AMM ou encore leur spectre d'activité. La classification retenue par le CCLin est celle basée sur le spectre d'activité et le pouvoir bactériostatique ou bactéricide. Les antiseptiques sont ainsi répartis en quatre classes :

- les antiseptiques majeurs : bactéricides et à large spectre,
- les antiseptiques intermédiaires : bactéricides et à spectre étroit,
- les antiseptiques mineurs : bactériostatiques et à spectre étroit,
- les antiseptiques à déconseiller (toxicités et effets indésirables importants) et les produits considérés à tort comme antiseptiques.

Cette classification est détaillée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Classification des antiseptiques selon leur spectre d'activité (d'après CCLin Sud-Ouest 2013)

Famille	Molécules	Mécanismes d'action	Indications
<b>ANTISEPTIQUES MAJEURS</b>			
<b>Biguanides</b>	<b>Chlorhexidine</b> (ex : <i>Hibitane</i> ®), association d'antiseptiques ( <i>Biseptine</i> ®)	Bactériostatiques puis Bactéricides à large spectre (après contact de 5 à 10 min)	Détersion, lavage des mains, antiseptie peau saine (champ opératoire, points de ponction) ou lésée <i>Eviter sur les muqueuses</i>
<b>Dérivés iodés (halogénés)</b>	<b>Polyvidone iodée</b> <b>Polyvinylpyrrolidone iodée</b> ( <i>Bétadine</i> ®)	Bactéricides à large spectre, effet rapide	Détersion, lavage des mains, antiseptie peau saine (champ opératoire) et muqueuses
<b>Dérivés chlorés (halogénés)</b>	Solution d' <b>hypochlorite de sodium</b> ( <i>Dakin</i> ®)	Bactéricides à très large spectre, effet très rapide	Accident d'exposition au sang, antiseptie peau saine et muqueuses, irrigation plaies...
<b>Alcools</b>	<b>Ethanol</b> ou <b>alcool éthylique</b> 60 à 70°, alcool isopropylique ...	Bactéricides	Antiseptie peau saine (points de ponction)
<b>ANTISEPTIQUES INTERMEDIAIRES</b>			
<b>Ammoniums quaternaires</b>	<b>Chlorure de Benzalkonium</b> (+ <i>chlorhexidine</i> + alcool benzylique = <i>Biseptine</i> ®), utilisé seulement en association <b>Cetrimide</b> ( <i>Cetavlon</i> ®)	Bactéricides à spectre étroit	Antiseptie peau saine (champ opératoire), antiseptie plaies chirurgicales/traumatiques
<b>ANTISEPTIQUES MINEURS</b>			
<b>Carbanilides</b>	<b>Triclocarban</b> ( <i>Solubacter</i> ®, <i>Septivon</i> ®, ...)	Bactériostatiques à spectre étroit	Détersion de la peau et de la muqueuse vaginale
<b>Diamidines</b>	<b>Haxamidine</b> ( <i>Hexomédines</i> ®)	Bactériostatiques à spectre étroit	Traitement d'appoint des affections dermatologiques
<b>Acides</b>	<b>Acide boriques</b> (préparations), <b>acide salicylique</b> ( <i>Dermacide</i> ®)	Bactériostatiques à spectre étroit	
<b>Dérivés métalliques</b>	<b>Nitrate d'argent, sulfates de cuivre et zinc</b> ( <i>Ramet Dalibour Acide</i> ®)	Bactériostatiques à spectre étroit	
<b>ANTISEPTIQUES A DECONSEILLER ET CONSIDERES A TORT COMME ANTISEPTIQUES</b>			
Famille	Molécules	Famille	Molécules
<b>Dérivés mercuriels (toxiques)</b>	<i>Chromaplaie</i> ®, <i>Mercuresceine</i> ®	<b>Peroxyde d'hydrogène, colorants</b>	Eau oxygénée à 10 volumes, Eosine aqueuse, Solution de Milian, Violet de Gentiane

Les spectres d'activité des différentes classes d'antiseptiques sont détaillés dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Spectre d'activité des principales classes d'antiseptiques (CClin Sud-Ouest 2013)**

Familles d'antiseptiques*	Bactéries végétatives					Fungi	
	Gram +		Gram -		CMN**		
	BC +	SL	BC +	SL	BC +	FC +	SL
Alcool 70°							
Halogénés							
PVP-I 10%	BC +++	SL	BC +++	SL	BC ++	FC +++	SL
D. chlorés 0,5%	BC +++	SL	BC +++	SL	BC ++	FC +++	SL
Biguanides							
Chlorhexidine 2%	BC +++	SL	BC +++	SI	AN	FC ++	SI
Ammoniums quaternaires	BC ++	SL	BC ++	SI	AN	FC +	SI
Oxydants							
Eau oxygénée	BC +	SL	BC +	SL	AN	FC +	SL

**BC** : Bactéricide                   +++ élevée  
**AN** : Activité nulle               **FC** : Fongicide  
**SL** : Spectre Large               **SI** : Spectre Incomplet  
 \* les exemples proposés pour chacune des familles ne sont pas exhaustifs et se réfèrent aux études disponibles.  
 \*\* CMN : Actinobactéries soit *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux antiseptiques fréquemment utilisés en milieu hospitalier (Williamson, Carter and Howden, 2017), le digluconate de chlorhexidine (CHX) et le chlorure de benzalkonium (BAC).

### 1.3. Mécanismes d'actions

Le mécanisme d'action des antiseptiques et les structures bactériennes ciblées varient en fonction de la famille dont ils font partie. Les ammoniums quaternaires (BAC) et les biguanides (CHX) appartenant à la famille des antiseptiques intermédiaires et majeurs respectivement, ont une action sur la membrane mais également sur les protéines.

#### Le CHX

Le CHX est un biguanide ; dont le nom complet est 1,6-bis(4'-chlorophénylbiguanide)hexane. C'est un composé cationique divalent qui existe sous forme de sels de digluconate, d'acétate et de chlorhydrate (Figure 14).

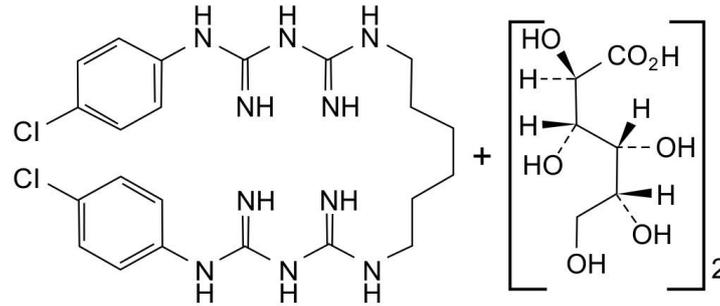


Figure 14 : Structure chimique du digluconate de chlorhexidine (Fiorentino, Corrêa and Salgado, 2013)

Les groupes biguanides cationiques du CHX se lient fortement aux sites anioniques des membranes et parois bactériennes. Il se forme des ponts entre les têtes phospholipidiques adjacentes qui entraînent un déplacement des cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) qui stabilisent naturellement la membrane cellulaire. La membrane cellulaire devient alors perméable aux ions potassium et aux protons. Le CHX est également un inhibiteur de l'ATPase liée à la membrane et un inhibiteur de l'absorption de potassium. Il se crée alors un effondrement du potentiel de membrane et une déstabilisation membranaire, entraînant une fuite des composants intracellulaires. L'effet du CHX est extrêmement rapide, l'effet maximal survenant dans les 20 secondes (Mcdonnell and Russell, 1999; Horner, Mawer and Wilcox, 2012; Rozman *et al.*, 2021).

A noter que l'action du CHX est dépendante de la concentration et du pH. A des concentrations plus élevées, la liaison du CHX entraîne une perte d'intégrité structurelle de la membrane, ayant pour conséquence la mort cellulaire (Mcdonnell and Russell, 1999; Horner, Mawer and Wilcox, 2012).

Différentes formes de chlorhexidine sont utilisées en clinique ; la plus courante est la forme digluconate soluble dans l'eau. Les indications d'utilisations dépendent de la concentration (variant de 0,5 % à 4 %) de la solution de chlorhexidine. Le CHX est notamment recommandé pour l'antiseptie de la peau avant pose de cathéter, largement utilisé pour l'hygiène des mains, la décolonisation de *S. aureus* Résistants à la Méricilline (SARM), l'antiseptie préchirurgicale de la peau ou encore le bain des patients en soins intensifs (Williamson, Carter and Howden, 2017).

### Le BAC

Le BAC est l'ammonium quaternaire le plus couramment rencontré. C'est un tensioactif cationique. Il se compose d'un mélange de chlorures d'alkyl benzyl diméthyl ammonium, dans lequel le groupe alkyle a diverses longueurs (8 à 18 carbones) et plusieurs nombres de chaînes (Figure 15).

Le BAC est caractérisé par un azote chargé positivement lié de manière covalente à trois substituants du groupe alkyle et un substituant benzyle (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012; Kampf, 2018).

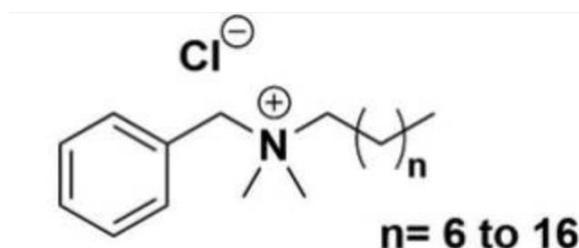


Figure 15 : Structure chimique du chlorure de benzalkonium (Schrack, Minbiole and Wuest, 2020)

L'activité antimicrobienne du BAC est fonction de la longueur de la chaîne N-alkyle, qui lui confère sa lipophilie. L'activité optimale contre les bactéries à Gram positive est obtenue avec des longueurs de chaînes de 12 à 14 alkyles. Les composés avec des longueurs de chaînes entre 8 et 18 alkyles sont pratiquement inactifs.

Lors de l'antisepsie, il se crée des interactions électrostatiques entre l'azote quaternaire chargé positivement du BAC et les têtes chargées négativement des phospholipides des membranes bactériennes. La queue hydrophobe du BAC s'intègre ensuite dans la partie hydrophobe de la membrane bactérienne. À des concentrations élevées, le BAC solubilise les composants hydrophobes de la membrane cellulaire en formant des agrégats micellaires. L'activité antimicrobienne du BAC peut également impliquer la perturbation et la dénaturation de protéines structurales et d'enzymes. En résumé, l'activité antimicrobienne du BAC implique principalement une interaction avec les membranes cellulaires, une perturbation de l'intégrité de la membrane (pouvant aller jusqu'à la lyse cellulaire), et une fuite du contenu cellulaire de faible poids moléculaire (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012; Rozman *et al.*, 2021).

Le BAC est utilisé en association avec d'autres antiseptiques (par exemple avec la chlorhexidine [Biseptine®]). Le BAC est indiqué pour l'hygiène des mains, l'antiseptie de la peau avant pose de cathéter par exemple et l'antiseptie des plaies (Htun *et al.*, 2019; Kampf, 2018).

## 2. Résistance aux antiseptiques

### 2.1. Mécanismes de résistances aux antiseptiques

L'un des principaux mécanismes de résistance aux antiseptiques hébergés par les staphylocoques est celui des systèmes de transport membranaires de type efflux. Ce mécanisme de résistance peut être naturel ou acquis (mutation ou acquisition d'éléments génétique mobiles). Les systèmes d'efflux éliminent activement les agents antimicrobiens hors de la cellule, réduisant leur concentration intracellulaire.

Ces pompes d'efflux peuvent être classées en deux groupes :

- les pompes qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les molécules à travers la membrane (transporteurs **ABC**)
- les pompes qui utilisent l'énergie d'un gradient de concentration (pompes **MFS** [*Major facilitator super family*], **SMR** [*Small multidrug resistant transporter family*] et **MATE** [*Multiple antimicrobial extrusion protein family*]) (Figure 16).

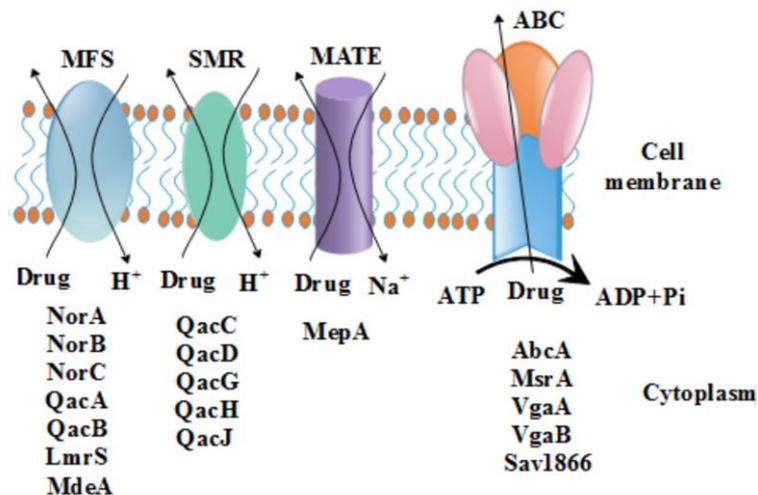


Figure 16 : Pompes à efflux de *Staphylococcus aureus* appartenant aux familles de protéines membranaires MFS, SMR, MATE et ABC (Lekshmi, 2018).

À l'exception du groupe ABC qui sont des pompes d'efflux qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour dynamiser l'efflux de médicaments, les autres protéines d'efflux dépendent du gradient électrochimique créé par les ions pour dynamiser l'efflux.

Chez les staphylocoques, il a principalement été décrit des pompes des familles MFS, SMR et MATE. Les principales pompes impliquées dans la résistance aux antiseptiques sont les pompes NorA et Qac (Tableau 5).

Tableau 5 : Description des pompes d'efflux NorA et Qac identifiées chez *S. aureus* (d'après (Costa et al., 2013)).

Pompe d'efflux	Famille	Régulateur(s)	Substrats (liste non exhaustive)
<i>Pompe d'efflux codée par gène chromosomique</i>			
NorA	MFS	MgrA, NorG (?)	Fluoroquinolones hydrophiles (ciprofloxacine, norfloxacine) QACs (tétraphénylphosphonium, chlorure de benzalkonium) Colorants (bromure d'éthidium, rhodamine)
<i>Pompes d'efflux codées par gènes plasmidiques</i>			
QacA	MFS	QacR	QACs (tétraphénylphosphonium, chlorure de benzalkonium, déquiniium) Biguanides (chlorhexidine) Diamidines (pentamidine) Colorants (bromure d'éthidium, rhodamine, acriflavine)
QacB	MFS	QacR	QACs (tétraphénylphosphonium, chlorure de benzalkonium) Colorants (bromure d'éthidium, rhodamine, acriflavine)
QacC/smr	SMR	NI	QACs (chlorure de benzalkonium, cétrimide) Colorants (bromure d'éthidium)
QacG	SMR	NI	QACs (chlorure de benzalkonium, cétyltriméthylammonium) Colorants (bromure d'éthidium)
QacH	SMR	NI	QACs (chlorure de benzalkonium, cétyltriméthylammonium) Colorants (bromure d'éthidium)
QacJ	SMR	NI	QACs (chlorure de benzalkonium, cétyltriméthylammonium) Colorants (bromure d'éthidium)

QAC : ammonium quaternaire, NI : non identifié

### La pompe d'efflux NorA

NorA fait partie de la famille des MFS. Il s'agit d'ailleurs de la pompe la mieux caractérisée de cette famille. NorA (42.2 kDa) est composé de 388 acides aminés se repliant en 12 hélices transmembranaires. Elle est codée par *norA*, un gène chromosomique, dont l'expression est régulée par MgrA.

Initialement, NorA a été découverte chez une souche de *S. aureus* résistante aux fluoroquinolones. NorA efflue une grande variété de substrats. La pompe confère notamment une résistance aux quinolones et fluoroquinolones (norfloxacine, ciprofloxacine), aux

tétracyclines, à des colorants (le bromure d'éthidium), ainsi que des antiseptiques (le BAC, le CHX, le cétrimide et le tetraphenylphosphonium) (Tableau 5) (Horner, Mawer and Wilcox, 2012; Costa *et al.*, 2013; Andersen *et al.*, 2015; Lekshmi, no date).

Il n'a été montré récemment que *norA* faisait partie du *core genome* de *S. aureus* (Costa *et al.*, 2019) mais les souches n'expriment pas toujours une résistance phénotypique. L'expression basale de *norA* confère une légère diminution de la sensibilité aux antiseptiques. L'hyperexpression de *norA* est nécessaire pour observer une résistance aux antiseptiques (BAC et CHX) (LaBreck *et al.*, 2020).

### **Les pompes d'efflux du groupe Qac**

Plusieurs pompes d'efflux Qac ont été décrites ; elles appartiennent à différentes familles (MFS, SMR).

Les pompes **QacA** et **QacB** appartiennent à la famille des MFS. Ce sont les pompes les mieux caractérisées chez *S. aureus*. Ces pompes sont composées de 524 acides aminés et ont une taille de 55 kDa. QacA et QacB diffèrent de seulement sept acides aminés. Leur structure se compose de 14 hélices transmembranaires. QacA et QacB sont codées par *qacA* et *qacB* portés par des plasmides, pSK1 et pSK23 respectivement chez *S. aureus*. Récemment, chez *S. epidermidis*, il a été montré que *qacA* était porté par un nouveau plasmide identifié, pAQZ1 (Addetia *et al.*, 2019). L'expression de *qacA* et *qacB* est régulée par *qacR*, appartenant à la famille des régulateurs *tetR*. QacR agit comme un répresseur par liaison à l'ADN en amont de *qacA* ou *qacB*.

Les substrats de QacA et QacB sont des composés d'ammonium quaternaire (dont le BAC), des hydrazones de guanyle, des biguanidines (CHX), des diamidines et une large gamme de colorants (Tableau 5) (Paulsen *et al.*, 1996; Wassenaar *et al.*, 2015; Lekshmi, 2018).

Les pompes **QacC**, **G**, **H**, et **J** font partie de la famille SMR. La pompe **QacC** est composée de 107 acides aminés et contient quatre domaines transmembranaires formant des dimères dans la membrane. Elle est codée par le gène *qacC* qui a été initialement identifié sur le plasmide pSK89 de *S. aureus* puis chez les SCNs par la suite. Contrairement aux autres pompes décrites précédemment, l'expression de *qacC* n'est pas sous le contrôle d'un régulateur transcriptionnel. A noter que le gène *qacC* est également appelé *smr* (*staphylococcal multidrug resistance*).

Les protéines **QacG, H et J** sont composées de 107 acides aminés. Le gène *qacG* a été identifié sur un plasmide pST94 d'un staphylocoque, *qacH* sur un plasmide p2H6 de *S. saprophyticus*, et *qacJ* sur des plasmides de souches d'origine équine de *S. aureus*, *Staphylococcus stimulans* et *Staphylococcus intermedius* (Wassenaar *et al.*, 2015). Les substrats des pompes d'efflux QacC, G, H et J, sont les composés ammoniums quaternaires (BAC et cetyltriméthylammonium) et le colorant bromure d'éthidium (Tableau 5) (Costa *et al.*, 2013).

## **2.2. Épidémiologie de la résistance**

Dans le monde, l'émergence des résistances aux antiseptiques en milieu de santé constitue un événement préoccupant ; de plus en plus d'équipes de recherche s'intéressent à ce sujet du fait du risque associé d'augmentation d'IAS. Cependant, il est difficile d'avoir des données comparables entre études compte-tenu de l'absence de consensus concernant les méthodes d'évaluation *in vitro* et les critères d'interprétation.

### **2.2.1. Méthodes d'évaluation de la résistance**

Il n'existe à ce jour pas de consensus sur la méthode utilisée pour évaluer la sensibilité aux antiseptiques ni pour la détermination de seuils pour classer les bactéries sensibles, de sensibilité diminuée ou résistantes aux antiseptiques (Vali *et al.*, 2008; Horner, Mawer and Wilcox, 2012; Furi *et al.*, 2013; Rozman *et al.*, 2021).

La sensibilité aux antiseptiques est généralement évaluée par des méthodes phénotypiques basées sur la détermination des CMI et/ou CMB. La CMI est la plus faible concentration de l'antiseptique qui inhibe la croissance visible de l'organisme alors que la CMB est la concentration la plus faible ayant une action létale (définie en France comme un pourcentage de bactéries survivantes inférieur ou égal à 0,01 % de l'inoculum de départ) sur l'organisme. Les CMI peuvent être mesurées par dilution en milieu solide (sur géloses) ou en milieu liquide (en bouillon). Les CMB sont déterminées (i) par microdilution en milieu liquide suivie d'une inoculation sur gélose sans antiseptique et d'un dénombrement des survivants ou (ii) par la réalisation de courbes de bactéricidie en présence de l'antiseptique (Horner, Mawer and Wilcox, 2012).

Une méthode alternative consiste à détecter par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) la présence de gènes connus pour coder les pompes d'efflux responsables de la résistance phénotypique. Elle complète la méthode phénotypique en permettant d'identifier la (les) pompe(s) en cause.

Les gènes *norA* et *qacA* sont généralement recherchés pour la résistance au CHX et *norA*, *qacA*, *C*, *G*, *H*, *J* pour celle au BAC. En ce sens, plusieurs publications ont proposé des amorces pour amplifier les gènes *qacA* et *qacC* chez *S. aureus* (Noguchi *et al.*, 1999) ; et *qacG*, *qacH*, *qacJ* pouvaient être recherchés par PCR multiplexe chez les staphylocoques (Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017). Par ailleurs, avec l'avènement du séquençage haut débit, ces gènes peuvent être recherchés sur les génomes entiers des souches.

Cependant, la présence dans le génome de ces gènes ne permet pas toujours de conclure sur l'expression d'une résistance au niveau phénotypique. Certaines études ont donc analysé l'expression des gènes de résistance (Costa *et al.*, 2019; LaBreck *et al.*, 2020).

### 2.2.2. Prévalence de la résistance au CHX et au BAC

Par ces méthodes phénotypiques et/ou moléculaires, des études à travers le monde ont tenté de caractériser la prévalence de la résistance au BAC et au CHX chez *S. aureus* et les SCNs.

#### Méthodes phénotypiques

Il a été observé une grande variabilité des CMI du CHX et du BAC vis-à-vis des staphylocoques en fonction de l'origine géographique des souches.

En Europe, des études menées en milieu hospitalier ont rapporté des CMI du CHX comprises entre 0,25 et 8 mg/L vis-à-vis de SCNs et *S. aureus* ; les souches avaient été isolées de situation de portage ou de bactériémies (Hijazi, 2016), d'infections chez des nouveaux nés prématurés (Lepointeur, 2013) ou d'infections post-opératoires (Jenedi, 2014). En Asie, les CMI du CHX variaient de 0,5 à 32 mg/L vis-à-vis de souches de SCNs et *S. aureus* cliniques isolées d'un centre hospitalier Iranien (Taheri *et al.*, 2016) et des souches communautaires de portage, et de portage chez des infirmières (Zhang *et al.*, 2021). Deux études américaines s'intéressant aux SCNs, dont une menée sur une large collection d'isolats (1 050 souches de *S. epidermidis* provenant d'écouvillonnages de la peau de patients de 37 centres américains et canadiens), ont montré que les CMI du CHX variaient entre 0,125 et 8 mg/L (Addetia *et al.*, 2019; Vale, 2019).

Enfin, une étude africaine menée en milieu hospitalier, a mis en évidence une différence significative de sensibilité aux antiseptiques entre des souches de portage de SARM et *S. aureus* Sensibles à la Méricilline (SASM), puisque les 16 SARM et 25 SASM avaient des CMI<sub>50</sub> du CHX (CMI auxquelles 50% des isolats ont été inhibés) de 32 mg/L et 2 mg/L respectivement (Akinkunmi and Lamikanra, 2011).

Les CMI ont été déterminées par microdilution en bouillon, sauf dans les études d'Hijazi *et al.*, Do Vale *et al.* et Akinkunmi *et al.*, pour lesquelles les CMI ont été mesurées par une technique de dilution sur gélose (Akinkunmi and Lamikanra, 2011; Hijazi, 2016; Vale, 2019). L'utilisation de deux méthodologies différentes rend la comparaison difficile.

Par ailleurs, 3,9 % à 46,3 % des souches des souches de SCNs avaient une sensibilité diminuée au CHX (Akinkunmi and Lamikanra, 2011; Lepointeur, 2013; Taheri *et al.*, 2016; Addetia *et al.*, 2019; Vale, 2019). Mais ici encore l'interprétation et la comparaison de ces résultats étaient difficiles du fait de l'absence de consensus pour les seuils déterminant si une souche est sensible ou de sensibilité diminuée au CHX. En effet, les seuils étaient fixés à 1 mg/L, 2 mg/L ou 4 mg/L selon les études (Akinkunmi and Lamikanra, 2011; Lepointeur, 2013; Taheri *et al.*, 2016; Addetia *et al.*, 2019; Vale, 2019).

Concernant le BAC, deux études européennes ont mesuré des CMI variant de 0,25 à 4 mg/L vis-à-vis de souches cliniques de SCNs et *S. aureus* isolées en milieu hospitalier (Lepointeur, 2013; Kampf, 2018), alors qu'en Asie des CMI plus élevées ont été relevées (de 0,5 à 64 mg/L) (Taheri *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). En Argentine, les CMI du BAC vis-à-vis de souches de *Staphylococcus haemolyticus* cliniques isolées dans deux hôpitaux étaient légèrement plus élevées que celles observées dans les études précédemment citées pour *S. aureus* et autres SCNs ; les CMI variant de 1 à 8 mg/L (Correa *et al.*, 2008). Par ailleurs, Akinkunmi *et al.* ont démontré que les CMI du BAC dépendaient du caractère méticillino-résistant de la souche ; en effet, les CMI<sub>50</sub> du BAC étaient de 32 mg/L et 4 mg/L vis-à-vis des souches de portage de SARM et SASM de leur étude (Akinkunmi and Lamikanra, 2011).

Dans des études, 24% à 54,9 % des souches de SCNs et *S. aureus* avaient des sensibilités diminuées au BAC (Akinkunmi and Lamikanra, 2011; Lepointeur, 2013; Taheri *et al.*, 2016). Cependant, tout comme pour le CHX, il n'y avait pas de consensus et des seuils différents ont été considérés, 2 mg/L, 3 mg/L et 4 mg/L dans les études de Lepointeur *et al.*, Taheri *et al.* et Akinkunmi *et al.* respectivement (Akinkunmi and Lamikanra, 2011; Lepointeur, 2013; Taheri *et al.*, 2016).

Par ailleurs, dans l'étude anglaise d'Hardy *et al.* et roumaine de Nicolae Dopcea *et al.*, les CMB du CHX vis-à-vis de staphylocoques, déterminées par microdilution en milieu liquide puis repiquage sur gélose, étaient comprises entre 0,490 et 64 mg/L. Les souches étaient des SARM ou des SASM cliniques vétérinaires provenant de l'Université de sciences agronomiques et

médecine vétérinaire, et *S. epidermidis* sensible ou résistants à la méticilline (Hardy *et al.*, 2018; Nicolae Dopcea *et al.*, 2020). Par ailleurs, dans l'étude de Dopcea *et al.*, la comparaison des CMBs avant et après exposition *in vitro* à une faible concentration de CHX ne montrait pas d'augmentation significative après exposition ; les auteurs suggéraient qu'il n'y avait pas de phénomène de tolérance (Nicolae Dopcea *et al.*, 2020).

Furi *et al.* ont quant à eux montré, par la même technique que celle mise en œuvre dans l'étude de Nicolae Dopcea *et al.* et Hardy *et al.*, que les CMB du BAC de 1 602 souches de *S. aureus* d'origine communautaire et hospitalière variaient entre 4 et 16 mg/L (Furi *et al.*, 2013).

### Méthodes moléculaires

Certaines études s'intéressant à la prévalence des gènes de résistance (*norA*, *qacA*, *qacC*, *qacG*, *qacH* et *qacJ*) chez les SCNs et *S. aureus* ont également mis en évidence une grande variabilité.

Une étude iranienne a montré que *norA* était présent chez 14,5% (24/165) des souches de SCNs et *S. aureus* de leur étude (Taheri *et al.*, 2016). En Ecosse, Vali *et al.* s'intéressaient à des souches cliniques de SARM et ont trouvé que le gène *norA* était plus prévalent que dans l'étude de Taheri *et al.* (36,7 % des 120 souches) (Vali *et al.*, 2008).

Plusieurs études menées en Asie et en Europe ont mis en évidence que le gène *qacA* était plus fréquemment présent chez les SCNs (entre 42,4 % et 62,5%) que chez *S. aureus* (entre 10,3 % et 27,8 %) (Taheri *et al.*, 2016; Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017; Zhang *et al.*, 2021).

Le gène *qacC* était quant à lui retrouvé chez les staphylocoques sans différence notable entre *S. aureus* et SCNs (de 1,6% à 17,5%), mais il était moins prévalent que *qacA* (Mayer, 2001; Shamsudin, 2012; Taheri *et al.*, 2016; Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017). Cependant, en Ecosse, Vali *et al.* ont montré chez 120 souches de SARM que *qacC* était plus fréquent que *qacA* (44,2% vs. 8,3%), bien que *qacA* confère une résistance à une plus large gamme d'antiseptiques que *qacC* (Vali *et al.*, 2008).

Enfin, Vali *et al.* ont retrouvé *qacH* chez 3,3 % des 120 souches de *S. aureus* (Vali *et al.*, 2008). Ignak *et al.* ont identifié *qacG* et *qacJ* dans des proportions similaires chez les *S. aureus* et les SCN (23,2 % et 26,1 % respectivement) (Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017). Taheri *et al.* n'ont quant à eux pas détecté les gènes *qacG*, *qacH* et *qacJ* chez leur 165 souches de *S. aureus* et SCNs (Taheri *et al.*, 2016). De la même façon, Vali *et al.* n'ont pas identifié *qacG* chez leur

120 SARM (Vali *et al.*, 2008) et Ignak *et al.* ne retrouvaient pas *qacH* au sein des 69 souches de staphylocoques (Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017).

### **Lien résistance phénotypique / moléculaire**

D'autre part, des études se sont intéressées au lien entre la composante phénotypique et moléculaire de la résistance aux antiseptiques.

Certaines équipes ont en effet montré un lien entre la détection du gène *qacA* et l'augmentation des CMI du CHX (Horner, Mawer and Wilcox, 2012; Taheri *et al.*, 2016; Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017; Addetia *et al.*, 2019; LaBreck *et al.*, 2020; Sommer *et al.*, 2020) et du BAC vis-à-vis des SCNs et *S. aureus* ; *qacC* était quant à lui associé à des CMI augmentées du BAC (Taheri *et al.*, 2016; Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017). Chez *S. aureus*, *norA* était associé à une résistance basale de bas niveau aux antiseptiques (LaBreck *et al.*, 2020).

Au contraire, une étude danoise portant sur 107 souches de *S. epidermidis* isolées de portage chez des infirmières et des patients dans un hôpital n'a pas mis en évidence de corrélation entre présence du gène *qacA* et augmentation des CMI du CHX (Skovgaard *et al.*, 2013).

De plus, LaBreck *et al.* ont montré qu'une pré exposition *in vitro* au BAC par ajout de l'antiseptique à un temps donné de la culture augmentait significativement l'expression de *qacA* et *qacC* (mesurée par analyses transcriptomiques) (LaBreck *et al.*, 2020). Nicolae Dopcea *et al.* ont montré le même phénomène avec la CHX chez des souches de SCNs et *S. aureus* (Nicolae Dopcea *et al.*, 2020).

L'impact clinique de cette résistance aux antiseptiques reste controversé et n'a pas été démontré à ce jour.

### **2.3. Résistances croisées avec les antibiotiques**

La résistance croisée entre antibiotiques et antiseptiques reste une notion controversée, particulièrement chez les bactéries à Gram positif (Kampf, 2016).

En ce sens, des études ont montré que la proportion de souches de SCNs et *S. aureus* possédant les gènes *qac* était accrue chez les souches résistantes à la méticilline (Kampf, 2018). Plus particulièrement, une étude iranienne ainsi qu'une étude malaisienne ont rapporté une prévalence du gène *qacA* plus élevée chez les SARMs (42,3% et 83,3% respectivement)

(Shamsudin, 2012; Taheri *et al.*, 2016), tout comme en Europe où 63% des SARMs possédaient le gène *qacA* contre 12% des SASMs (Mayer, 2001). Par ailleurs, dans l'étude de El Sayed *et al.*, chez des souches de *S. aureus*, la présence de gènes *qac* de résistance aux antiseptiques était associée à une résistance aux  $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones, lincosamides, cyclines et macrolides (El Sayed Zaki, Bastawy and Montasser, 2019).

De plus, dans des études menées chez des souches de *S. aureus*, et SCNs, il était observé plus de résistances aux antiseptiques (BAC et CHX) quand les souches étaient également résistantes aux antibiotiques notamment aux  $\beta$ -lactamines (dont la méticilline), fluoroquinolones, lincosamides, aminosides et cyclines (Kampf, 2016; Vale, 2019; Nicolae Dopcea *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Ces données suggèrent une co-sélection des gènes *qac* et des gènes de résistance aux antibiotiques (El Sayed Zaki, Bastawy and Montasser, 2019). En effet, certains de ces gènes de résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques sont co-localisés sur un même plasmide. Par exemple, *qacA* a été identifié sur le plasmide pSK23, contenant également un gène codant une  $\beta$ -lactamase (Kampf, 2016).

La résistance croisée pourrait également être expliquée par la présence de NorA (codée par *norA*, faisant partie du *core genome* de *S. aureus*) (Costa *et al.*, 2019; LaBreck *et al.*, 2020), qui est une pompe d'efflux conférant une résistance aux antiseptiques mais également à plusieurs antibiotiques de structures chimiques différentes, notamment aux fluoroquinolones (Costa *et al.*, 2019).

Finalement, une exposition aux antiseptiques pourrait sélectionner des souches résistantes aux antiseptiques et par le phénomène de co-sélection, les souches pourraient également être résistantes aux antibiotiques. Il est donc important de rester prudent quant à l'utilisation des antiseptiques en milieu hospitalier.

#### **2.4. Résistance de *S. lugdunensis* aux antiseptiques**

La sensibilité de *S. lugdunensis* aux antiseptiques reste à ce jour très peu étudiée.

Fleurette *et al.* en 1989 ont été les premiers à étudier la sensibilité au CHX et au BAC de onze souches de *S. lugdunensis* via la détermination de CMI et CMB par microdilution en milieu

liquide. Ils ont montré que presque toutes les souches étaient sensibles au CHX et au BAC (Fleurette *et al.*, 1989).

Deux autres équipes se sont intéressées à la résistance au CHX de *S. lugdunensis* mais sur un très faible nombre de souches ; huit souches de portages provenant d'écouvillonnages de peau de patients de 37 centres hospitaliers américain pour l'étude d'Addetia *et al.* et une souche isolée d'une hémoculture d'un centre hospitalier à Houston pour l'étude de Sommer *et al.*. Les CMI's étaient déterminées en milieu liquide et les gènes *qacA* et *qacC* étaient recherchés dans les deux études (Addetia *et al.*, 2019; Sommer *et al.*, 2020). Du fait du peu de souches étudiées, aucune conclusion quant à la sensibilité aux antiseptiques de *S. lugdunensis* n'a été tirée de ces deux études.

Au vu du phénomène d'émergence de la résistance aux antiseptiques chez les staphylocoques, *S. aureus* comme SCNs, il semble important d'étudier et de caractériser cette résistance chez *S. lugdunensis*, particulièrement chez des souches circulant en milieu hospitalier.

## Partie 3 : Le biofilm des staphylocoques

### 1. Généralités

Le concept de biofilm a été décrit pour la première fois en 1978 par Costerton *et al.*, observant que les bactéries pouvaient être recouvertes d'un glycocalyx de fibres qui adhèrent aux surfaces et aux cellules de l'hôte (Costerton, Geesey and Cheng, 1978). Par la suite, la description du biofilm s'est précisée ; en 2002, Donlan *et al.* ont proposé la définition suivante « le biofilm est une structure complexe et dynamique, composée de communautés microbiennes caractérisées par des cellules irréversiblement attachées à un substrat ou à une surface, et entourées d'une matrice polymérique extracellulaire produite par les bactéries elles-mêmes » (Donlan and Costerton, 2002).

Ce biofilm constitue un facteur de virulence important chez les staphylocoques, notamment chez les SCNs qui, contrairement à *S. aureus*, n'expriment que peu de facteurs de virulence (Otto, 2009; Fey and Olson, 2010; Archer *et al.*, 2011; Becker, Heilmann and Peters, 2014; Kranjec *et al.*, 2021).

Le mode de vie en biofilm a des conséquences sur la physiologie des cellules bactériennes. En fonction de leur position dans le biofilm, les cellules rencontrent en effet différentes conditions environnementales, entraînant une grande hétérogénéité métabolique. Certaines cellules ont ainsi une croissance active, alors que d'autres présentent une croissance altérée associée à une activité métabolique diminuée (cellules en dormance). Cela a notamment pour conséquence une modification de la sensibilité aux antimicrobiens et l'apparition de sous-populations de cellules tolérantes ou résistantes aux antibiotiques (Kranjec *et al.*, 2021).

Les infections liées à la formation de biofilm sont généralement difficiles à traiter, car les bactéries sont protégées du système immunitaire de l'hôte et des traitements antibiotiques. La résistance aux antibiotiques est accrue par une pénétration et diffusion limitée à travers le biofilm, l'hétérogénéité cellulaire et un potentiel de transferts horizontaux de gènes de résistance augmenté du fait de la promiscuité cellulaire (Idrees *et al.*, 2021; Kranjec *et al.*, 2021). En pratique clinique, la prise en charge thérapeutique des infections à staphylocoques formant du biofilm nécessitera de plus fortes doses d'antibiotiques sur une période prolongée, fréquemment associée au retrait du tissu ou du matériel infecté (Del Pozo, 2018; Zimmerli and Sendi, 2019).

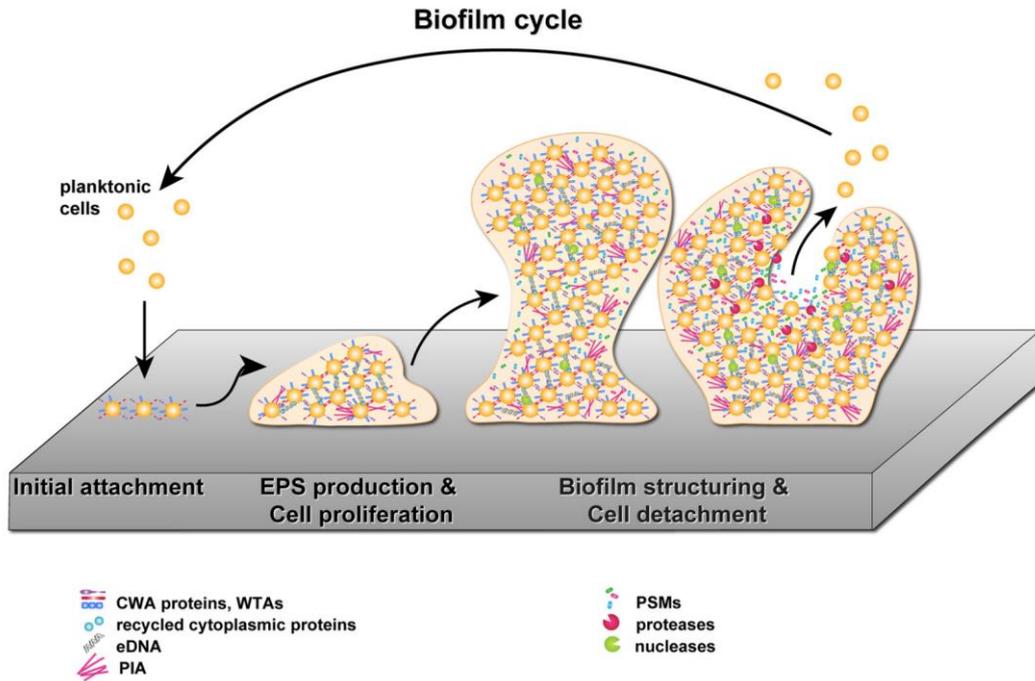
L'augmentation de la prévalence des souches de staphylocoques résistants aux antibiotiques (Stefani *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2020) et la difficulté à traiter les infections liées aux biofilms invitent à trouver de nouvelles stratégies de lutte anti-biofilm (Zhao, Sun and Liu, 2023). Pour cela, il est indispensable d'avoir une bonne connaissance des étapes de formation ainsi que de la composition du biofilm (Idrees *et al.*, 2021).

Les connaissances actuelles sur le biofilm staphylococcique proviennent en grande majorité de l'étude des espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, qui sont les plus fréquemment identifiées en clinique (Gotz, 2002; Otto, 2009; Kranjec *et al.*, 2021).

### ***1.1. Etapes de formation du biofilm***

Les premières études de biofilm chez les staphylocoques sont apparues dans les années 1980 (Christensen *et al.*, 1982; Marrie, Nelligan and Costerton, 1982). De nombreuses équipes de recherche ont depuis étudié la production du biofilm *in vitro*, mettant en évidence les différentes étapes de son développement en conditions statiques. Il est communément admis que ce processus complexe est divisé en trois étapes (Figure 17) :

- l'attachement initial,
- la prolifération cellulaire et la production de matrice extracellulaire,
- la structuration du biofilm et le détachement cellulaire (Schilcher and Horswill, 2020).



**Figure 17 : Cycle du biofilm staphylococcique** (Schilcher and Horswill, 2020).

Lors de la première étape de la formation du biofilm (attachement initial), les cellules planctoniques se fixent sur une surface via des protéines ancrées à la paroi (cell wall anchored proteins, CWA) et des acides taichoïques pariétaux (WTAs, wall teichoic acids). La production de PIA (polysaccharides intercellular adhesins), d'ADN extracellulaire (eDNA) et d'adhésines est stimulée et conduit à la formation de microcolonies à la surface par interactions intercellulaires (étape de production de substances polymériques extracellulaire et prolifération cellulaire). Les cellules du biofilm produisent des nucléases et des PSMs (phenol soluble modulins) responsables de la formation de canaux et de tours dans le biofilm mature. Dans la dernière étape (structuration du biofilm et détachement cellulaire), le biofilm est dispersé par l'action des PSMs et des protéases, permettant aux cellules bactériennes de se détacher du biofilm pour coloniser de nouvelles niches.

### 1.1.1. Attachement initial

La première étape dans le développement du biofilm consiste en l'adhésion de cellules planctoniques à des surfaces, biotiques (épithéliums) ou abiotiques (matériel tel qu'un cathéter).

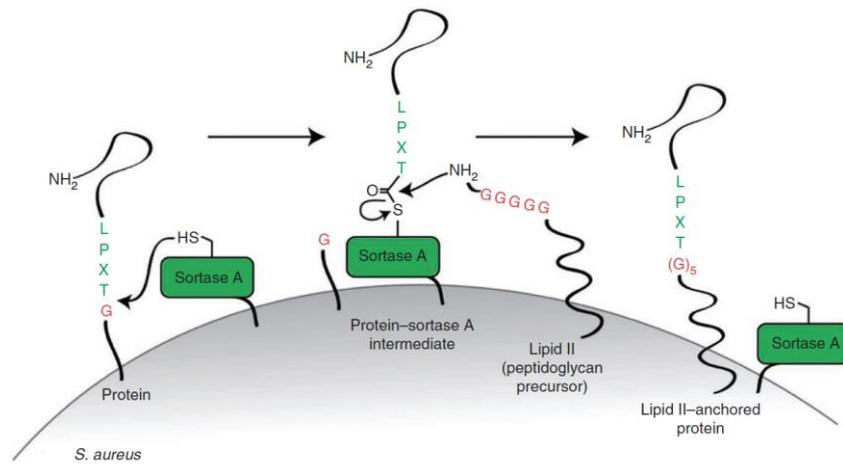
Sur les **surfaces abiotiques**, telles que les dispositifs médicaux (par exemple les prothèses ou cathéters), l'adhésion initiale est médiée par des interactions non spécifiques de nature électrostatique ou hydrophobe. Cependant à noter que *in vivo*, le matériel est rapidement recouvert par des protéines sériques telles que le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine et le collagène. Les glycopolymères d'acides taichoïques ont été identifiés comme les principaux moteurs des interactions avec ces surfaces chez *S. aureus* et chez *S. epidermidis* (Schilcher and Horswill, 2020). Des protéines bactériennes ont également été identifiées comme intervenant dans l'adhésion à ces surfaces abiotiques, comme l'autolysine **AtIA** chez *S. aureus* et son homologue **AtIE** chez *S. epidermidis*. De par son rôle dans la lyse cellulaire, AtIE est également

impliquée dans la libération d'ADN extracellulaire (ADNe), qui s'avère lui-même jouer un rôle important dans l'adhésion et l'agrégation des cellules de *S. epidermidis* (Fey and Olson, 2010). Au contraire, un traitement par DNase I à différents temps de formation du biofilm de *S. aureus* montrait que l'ADNe ne semble pas avoir de rôle dans l'attachement aux surfaces chez cette espèce (Grande *et al.*, 2014; Moormeier *et al.*, 2014). Enfin, chez *S. epidermidis*, la protéine *accumulation-associated protein* (**Aap**) joue un rôle dans l'attachement aux surfaces en polystyrène par son domaine N-terminal (domaine A). Son homologue, la protéine de surface G (**SasG**), jouerait un rôle similaire chez *S. aureus* (Conlon *et al.*, 2014).

Finalement, l'adhésion initiale aux surfaces abiotiques est médiée par

- Des interactions chimiotactiques des cellules avec la surface,
- Des liaisons faibles non spécifiques comme des liaisons de van der Waals (processus réversible),
- Ou encore des interactions hydrophobes via les cellules bactériennes (variant selon l'espèce, le taux de croissance bactérien et le milieu de culture) (Zhao, Sun and Liu, 2023).

Les interactions avec les **surfaces biotiques** que sont les protéines de la matrice de l'hôte (fibrinogène, fibronectine, vitronectine et collagène) se font grâce à des protéines ancrées à la paroi des bactéries, dont le principal groupe est nommé « *microbial surface componennts recognizing adhesive matrix molecules* » (MSCRAMMs). Ces protéines sont composées d'un motif C-terminal LPXTG (Leucine-Proline-X-Threonine-Glycine) qui va former des liaisons covalentes avec les protéines de l'hôte via une enzyme, la sortase A (Figure 18) (Foster, 2019).



**Figure 18 :** Représentation schématique de l'ancrage des protéines à la paroi cellulaire via la sortase A chez *S. aureus* (Guimaraes et al., 2013).

Les principales MSCRAMMs impliquées dans le biofilm décrites chez *S. aureus* sont les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPs, dont **FnbA** et **FnbB**), la protéine de liaison au fibrinogène (**Fib**), des *clumping factors* (**ClfA** et **ClfB**) et des protéines avec des motifs répétés sérine aspartate (**SdrC**, **SdrD** et **SdrE**) (Peng et al., 2022). Chez *S. epidermidis*, les trois principales MSCRAMMs identifiées impliquées dans la phase d'adhésion sont **SdrG** (liaison au fibrinogène), **SdrF** (liaison au collagène et à la kératine) et **SdrH** (pas de ligand identifié à ce jour) (Foster, 2019).

### 1.1.2. Prolifération cellulaire et production de matrice extracellulaire

Cette deuxième étape est caractérisée par la transition de l'attachement de cellules individualisées à la formation de microcolonies en lien avec leur prolifération.

Cette phase d'adhésion irréversible est médiée par l'hydrophobicité de la surface des cellules bactériennes, les liaisons hydrogène, covalentes, ioniques et les interactions dipôle-dipôle (Zhao, Sun and Liu, 2023).

Du fait des contraintes extérieures, par exemple un flux environnant, les bactéries doivent créer des interactions entre elles pour permettre le développement du biofilm. Pour cela, les cellules vont produire des **substances polymériques extracellulaires** (EPS) permettant de stabiliser ce biofilm immature, formant ainsi une jeune matrice extracellulaire (MEC). Lors de cette étape, les bactéries prolifèrent au sein de cette matrice et peuvent perdre le contact direct avec les

surfaces biotiques ou abiotiques. Le développement du biofilm dépend alors principalement de l'adhésion cellules-cellules et cellules-EPS et de la génération de canaux permettant l'apport de nutriments à la communauté cellulaires ainsi que le rejet des déchets (Peng *et al.*, 2022).

Chez les staphylocoques, les EPS sont majoritairement des polysaccharides, des protéines, des acides téichoïques et de l'ADNe. En fonction de la composition en EPS, les biofilms staphylococciques peuvent être divisés en deux grandes catégories : les biofilms constitués d'une matrice essentiellement polysaccharidique et les biofilms à matrice essentiellement protéique (O'Gara, 2007; Speziale *et al.*, 2014; Schilcher and Horswill, 2020).

En fonction des EPS produits, les MEC peuvent être classées en deux grandes classes :

- les biofilms avec une matrice polysaccharidique,
- et les biofilms avec une matrice protéique.
- Par ailleurs, l'ADNe constitue une troisième composante essentielle à la formation des biofilms.

Ces types de biofilms seront décrits dans le paragraphe 1.2.

D'autre part, Moormeir *et al.* ont décrit en 2017 chez *S. aureus*, par une technique de microscopie « *time-lapse* » (technique qui enregistre des séquences d'images à intervalles de temps réguliers permettant de suivre le processus dynamique de formation de biofilm), une étape supplémentaire dans le développement du biofilm, l'**exodus**. Elle survient environ six heures après le début de l'étape de prolifération, et se manifeste par un relargage précoce des cellules. Cette restructuration précoce est dépendante de l'activité d'une nucléase, dont l'expression est contrôlée par le système de régulation Sae (Figure 19) (Moormeier and Bayles, 2017).

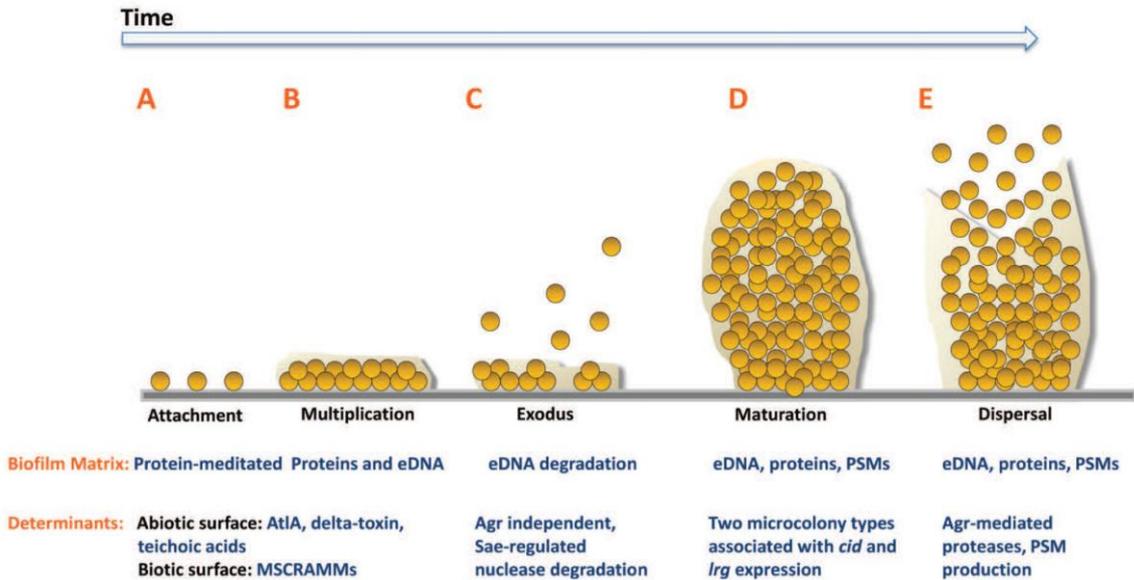


Figure 19 : Etapes de développement du biofilm chez *S. aureus* (Moormeier et al. 2017).

Cinq étapes sont décrites : A) attachement, B) multiplication, C) exode, D) maturation et E) dispersion. A) Les cellules de *S. aureus* se fixe aux surfaces abiotiques ou biotiques à l'aide d'interactions hydrophobes ou via des MSCRAMMs, respectivement. B) Une fois les cellules attachées, le biofilm se développe en un « tapis » confluent de cellules composées d'ADN extracellulaire et d'une matrice protéique. C) Après avoir atteint la confluence, une période d'exode massif de cellules se produit au cours de laquelle une sous-population de cellules est libérée du biofilm via la dégradation de l'eDNA, par la nucléase régulée par *Sae* permettant la formation de microcolonies tridimensionnelles. D) Les microcolonies se forment à partir de cellules qui sont restées attachées pendant la phase d'exode. E) L'activation du système régulateur de quorum sensing *Agr*, initie la modulation et la dispersion des cellules via l'activation de protéases et/ou la production de PSM.

*AtIA*, autolysine A; MSCRAMM, composants microbiens de surface reconnaissant les molécules de la matrice adhésive ; eDNA, ADN extracellulaire ; PSM, phénol soluble modulines ; *Agr*, système de régulation « accessory gene regulator ».

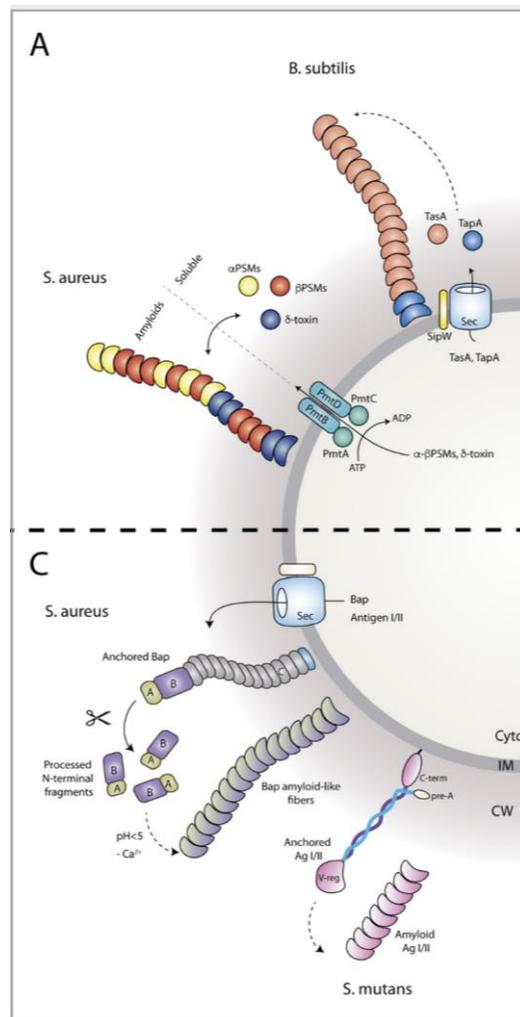
### 1.1.3. Structuration du biofilm et détachement cellulaire

A cette étape, l'accumulation des EPS donne une forme tridimensionnelle au biofilm avec des structures caractéristiques tridimensionnelles en « tours » entrecoupées de canaux dans lesquels circulent des fluides nutritifs. Des structures en « tuyaux » permettent le transport des nutriments aux couches les plus profondes du biofilm.

Le processus de dispersion fait intervenir chez *S. aureus* un large panel d'exoenzymes de la famille des métalloprotéases (auréolysine **Aur**), cystéines protéases (**SspB** et **ScpA**) et sérines protéases (**SspA**), et chez *S. epidermidis* la métalloprotéase **SepA**, la sérine protéase **Esp** et la cystéine protéase **EcpA** (Schilcher and Horswill, 2020; Peng et al., 2022). Les nucléases vont également jouer un rôle dans cette étape de par leur activité de dégradation de l'ADNe. D'autre part, un autre groupe de molécules participe à la dispersion du biofilm staphylococcique : les modulines solubles dans le phénol ou *phenols soluble modulins* (PSMs). Les PSMs possèdent

une activité de type surfactant, entraînant une destruction des interactions non covalentes entre les composants de la matrice. Il a également été montré que l'expression différentielle des PSMs dans le biofilm de *S. aureus* est responsable de la formation caractéristique des canaux fluidiques qui apportent les nutriments aux couches les plus profondes du biofilm (Schilcher and Horswill, 2020). De plus, elles favorisent la dissémination des microcolonies vers d'autres sites *in vivo*. Paradoxalement, chez *S. aureus*, les PSMs n'existent pas seulement sous forme soluble, mais aussi sous forme de fibres « amyloids-like », créant des agrégats et ayant cette fois, un rôle dans la stabilisation du biofilm (Zheng *et al.*, 2018).

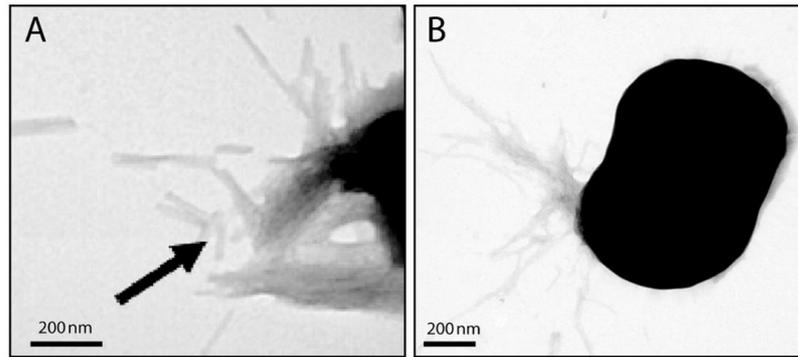
Les fibres amyloïdes correspondent à des conformations particulières de protéines, résultant d'un mauvais repliement de protéines solubles. Les protéines deviennent insolubles du fait de leur structure en « *cross-β* ». Ces fibres sont impliquées dans la stabilisation du biofilm en créant des interactions avec l'ADNe. Les PSMs par exemple peuvent être sécrétées par un transporteur ABC et polymériser pour former des fibres insolubles amyloïdes (Figure 20). La protéine de surface Bap de *S. aureus* peut, quant à elle, s'assembler en fibres amyloïdes quand le pH environnant est acide et que la concentration en calcium est inférieure à 1 mM (Figure 21). Cette conformation a l'avantage de conférer une résistance aux conditions de dénaturation sévère, et dans la plupart des cas, une résistance à la dégradation par les protéases. Cette polymérisation en fibres amyloïdes demande par ailleurs peu d'énergie métabolique. Ainsi, cette conformation est observée quand les sources d'énergie sont limitées (Taglialegna, Lasa and Valle, 2016).



**Figure 20 : Formation de structures amyloides-like par les de PSM (A) et la protéine Bap chez *S. aureus* (C)** (Figure adaptée de (Taglialegna, Lasa and Valle, 2016))

A : Chez *S. aureus*, les PSM, et les monomères de toxines sont transportés à l'extérieur de la cellule par un transporteur ABC dépendant de l'ATP (protéines transmembranaires PmtB et PmtD liées aux ATPases PmtA et PmtC) Les PSM peuvent être présents sous forme de monomères solubles ou, si nécessaire, peuvent former des fibres amyloïdes. L'expression des gènes codant les PSM est induite par AgraA.

C : Une fois ancrée dans la paroi, la protéine Bap de *S. aureus* est dégradée par des protéases libérées dans le milieu extracellulaire qui vont s'auto-assembler en structures fibrillaires amyloides-like en cas d'acidification du milieu et en absence de calcium



**Figure 21 : Fibres amyloïdes-like formées par la protéine Bap de *S. aureus*** (Taglialegna, Lasa and Valle, 2016).

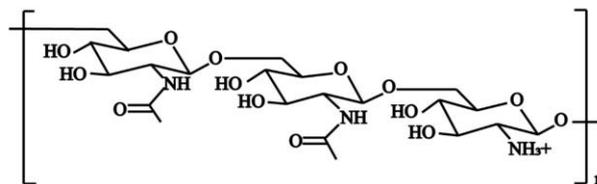
Observations en microscopie électronique à transmission de fibres colorées négativement formées par le domaine B recombinant de la protéine Bap incubée à pH 4,5 (A) et des cellules de *S. aureus* cultivées pendant la nuit à 37°C et 200 tr/min dans du milieu LB-glucose (B).

Chez *S. epidermidis*, la formation de structures *amyloid-like* par des PSMs amyloïdes n'a pas encore été décrite (Le *et al.*, 2019). Cependant, il a été montré chez cette espèce que la protéine Sbp (*Small basic protein*) peut former des fibres amyloïdes et avoir un rôle structural dans le biofilm (Wang *et al.*, 2018).

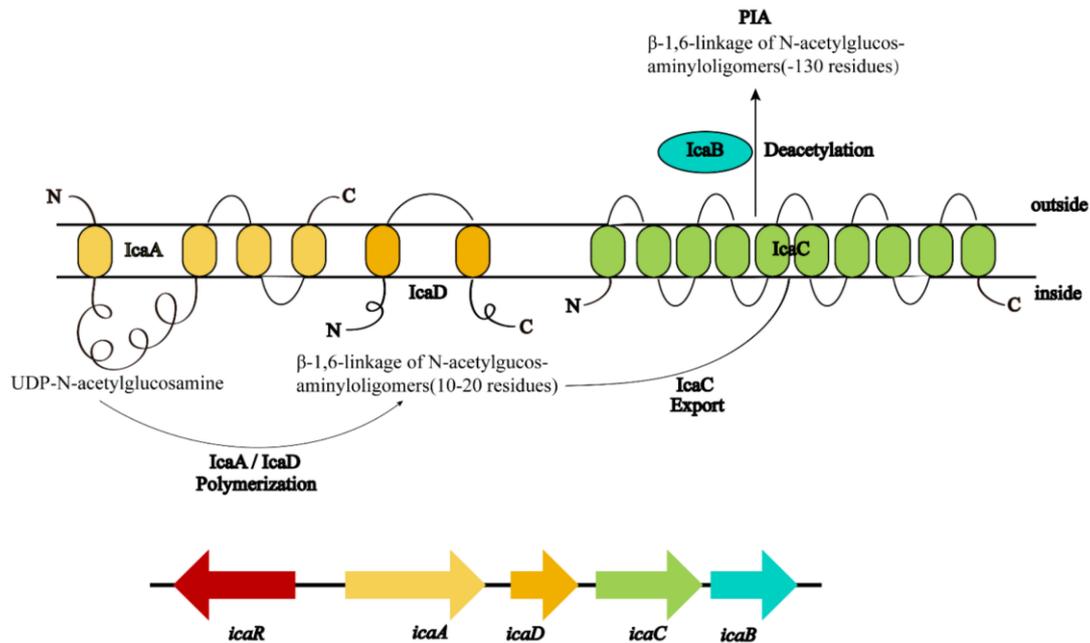
## 1.2. Composants de la matrice extracellulaire du biofilm

### 1.2.1. Matrice polysaccharidique

Chez les staphylocoques, le principal polysaccharide identifié est le poly- $\beta$ (1-6)-N-acétylglucosamine (PNAG), également appelé *polysaccharide intracellular adhesin* (PIA). Le PNAG joue un rôle essentiel au cours des phases d'adhésion et de prolifération cellulaire. C'est un homopolymère cationique de résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc) liés en  $\beta$ -1-6 (Figure 22) (Nguyen, Nguyen and Otto, 2020), dont la synthèse est régulée par l'opéron *icaADBC*, identifié initialement chez *S. epidermidis* puis chez *S. aureus* (Figure 23) (Mack *et al.*, 1994; Cramton *et al.*, 1999).



**Figure 22 : Structure chimique du poly- $\beta$ (1-6)-N-acétylglucosamine (PNAG)** (Peng *et al.*, 2022).



**Figure 23 : Représentation du locus *icaADBC* et synthèse du poly- $\beta(1-6)$ -N-acétylglucosamine (PNA) (Peng et al., 2022).**

*IcaA* et *IcaD* sont deux protéines membranaires qui polymérisent la N-acétylglucosamine à partir des monomères de UDP-N-acétylglucosamine. Cette chaîne peut être exportée par la protéine membranaire *IcaC*. *IcaB* est une acétylase attachée à la surface externe des bactéries. Par désacétylation des résidus, *IcaB* introduit une charge positive dans la molécule PIA initialement neutre.

Le locus *ica* (*intracellular adhesin*) est composé de quatre gènes, *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC*. Le gène *icaA* code une N-acétylamino-glucosamine transférase et *icaD* une protéine chaperone. L'action concomitante des protéines correspondantes *IcaA* et *IcaD* permet la synthèse d'oligomères de N-acétylglucosamine (jusqu'à 20 résidus). Le gène *icaC* code une protéine transmembranaires qui permet la translocation du polymère poly-N-acétylglucosamine à la surface cellulaire, où il va être désacétylé par une désacétylase codée par *icaB*. Cette désacétylation confère au polymère une charge positive nécessaire à l'adhésion intercellulaire et à l'adhésion aux surfaces. En amont du gène *icaA* est situé le gène de régulation *icaR*, dont le rôle sera détaillé plus loin (Arciola et al., 2015).

Le locus *ica* appartient au génome accessoire des staphylocoques, il n'est par conséquent pas présent chez toutes les souches (Arciola et al., 2015).

Mais, Chokr et al. et Rohde et al. ont montré dans leurs études que 100 % des souches de *S. aureus* avaient *ica* dans leur génome (n = 5 et n = 18 respectivement). Par ailleurs, 100 % et 60 % des *S. aureus* de l'étude de Rhode et 60 % et Chokr et al. respectivement produisaient du PNAG.

Chez *S. epidermidis*, *ica* était présent chez 61,5 % des 52 souches de l'étude de Rhode *et al.* et 81,6 % des 38 souches de l'étude de Chokr *et al.* Toutes les souches de *S. epidermidis* présentant *ica* ne produisaient pas de PNAG (26 des 52 souches et 12 des 38 souches). A l'inverse, des souches pour lesquelles *ica* n'a pas été détecté étaient capable de produire du biofilm (10/20 souches de l'étude de Rhode *et al.* et 1/7 souches de l'étude de Chokr *et al.*) (Chokr *et al.*, 2006; Rohde *et al.*, 2007).

Par ailleurs, des études utilisant des tests de dispersion du biofilm par traitement à la dispersine ont permis d'analyser la composition en polysaccharides des matrices des biofilms de *S. aureus* et *S. epidermidis*. Chez *S. aureus*, les études de Chaignon *et al.*, Izano *al.* et Rohde *et al.* ont montré des proportions très variables de matrices polysaccharidiques ; zéro, trois et 18 souches produisaient des polysaccharides respectivement (Chaignon *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2007; Izano *et al.*, 2008). Trois études ont mis en évidence que toutes leurs souches de *S. epidermidis* produisaient des polysaccharides (Kaplan *et al.*, 2004; Chaignon *et al.*, 2007; Izano *et al.*, 2008). Alors que Rohde *et al.* montraient que 50 % des 52 *S. epidermidis* de leur étude produisaient un biofilm composé de polysaccharides.

### 1.2.2. Matrice protéique

Outre les biofilms polysaccharidiques, il a été démontré que certaines souches de staphylocoques forment des biofilms avec des matrices principalement constituées de protéines, via des mécanismes de développement *ica*-indépendants (O'Gara, 2007). Kogan *et al.* se sont intéressés à deux souches clinique de *S. epidermidis* (les deux avaient le locus *ica* dans leur génome). Le PNAG n'a été détecté dans aucune de ces souches et un traitement par protéinase K dispersaient partiellement le biofilm (Kogan *et al.*, 2006). De la même manière, l'étude de Chaignon *et al.* a montré qu'une souche clinique de *S. epidermidis* produisait un biofilm partiellement protéique (Chaignon *et al.*, 2007). Rohde *et al.* ont montré que 30,8 % de leur 52 souches étaient avaient un biofilm dispersé par la trypsine (Rohde *et al.*, 2007).

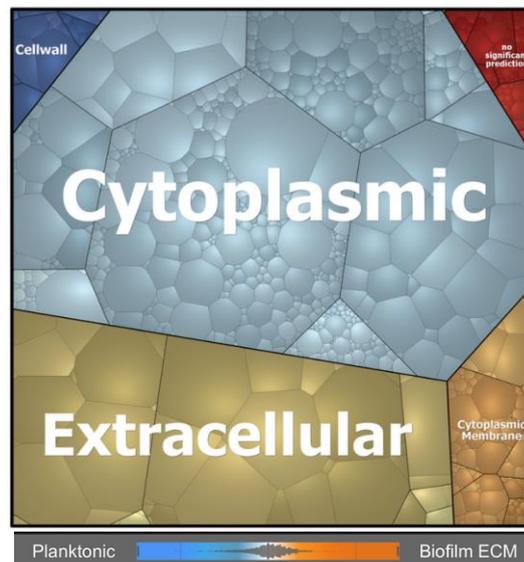
Chez *S. aureus*, toutes les souches des études de Chaignon *et al.* et Rohde *et al.* (une et 18 souches respectivement) produisaient un biofilm dispersé par protéinase ou trypsine (Chaignon *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2007).

La matrice du biofilm ayant été montrée comme pouvant être protéique, plusieurs équipes se sont intéressées à caractériser ces protéines de la MEC du biofilm, chez *S. aureus in vitro* (Muthukrishnan *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2014; Graf *et al.*, 2019; Hiltunen *et al.*, 2019) et *in vivo*

(Lei, Gupta and Lee, 2017) mais également chez *S. epidermidis in vitro* (Martínez-García *et al.*, 2021). Ces études ont caractérisé la matrice du biofilm en utilisant notamment des techniques de spectrométrie de masse de type *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) ou *electrospray ionization* (ESI).

L'analyse protéomique de la matrice peut être effectuée de la manière suivante : une première étape d'extraction (avec du NaCl par exemple, permettant de perturber les interactions électrostatiques et de détacher la matrice des cellules bactériennes) est nécessaire (Chiba *et al.*, 2015). Les protéines extraites sont ensuite récupérées par migration sur gel SDS-PAGE. Une technique *label free* peut alors être appliquée dans laquelle les protéines migrent mais ne sont pas séparées en fonction de leur poids. Les protéines sont ensuite digérées par traitement à la trypsine générant ainsi des peptides. L'échantillon de peptides est analysé en spectrométrie de masse. Cette technique offre de nombreux avantages, tels qu'une sensibilité élevée, une grande sélectivité, une rapidité et une capacité à analyser des mélanges complexes (Idrees *et al.*, 2021).

Selon les études, de 33 à 460 protéines ont été identifiées dans la matrice du biofilm staphylococcique. Celles-ci peuvent être classées en différents groupes (Figure 24).



**Figure 24 : Différences dans les profils protéiques de la matrice du biofilm de *S. aureus* et des échantillons planctoniques** (adapté de (Graf *et al.*, 2019)).

Les protéines trouvées dans les analyses de spectrométrie de masse sont affichées sous forme de cellules individuelles, dont la taille est en corrélation avec l'abondance des protéines. Les protéines sont regroupées en fonction de leur localisation subcellulaire. Les différences d'abondance de protéines entre le biofilm et les échantillons planctoniques sont indiquées par un code couleur : les protéines orange plus abondantes dans la matrice, et les protéines bleues plus abondantes dans les cultures planctoniques, gris clair aucune différence en abondance de protéines.

### Protéines intracellulaires

Tout d'abord, des **protéines intracellulaires** ont été identifiées, à taux élevé (jusqu'à 86,2% des protéines) dans les études de Graf *et al.*, Lei *et al.*, Hiltunen *et al.* et Martinez-Garcia *et al.* (Lei, Gupta and Lee, 2017; Graf *et al.*, 2019; Hiltunen *et al.*, 2019; Martínez-García *et al.*, 2021). Parmi ces protéines, des **protéines ribosomales** ont notamment été identifiées. Il a été démontré par Graf *et al.* que ces protéines jouent un rôle dans la stabilisation de la structure du biofilm par liaison électrostatique avec les autres composés de la MEC. En effet quand la MEC devient acide, les protéines ribosomales sont protonées et deviennent alors chargées positivement, permettant les interactions avec les autres composants.

La matrice des biofilms staphylococcique contient également des protéines intervenant dans divers **métabolismes** (Figure 25). Gil *et al.* ont mené une étude *in vitro* sous flux, et ont mis en évidence chez *S. aureus* un grand nombre des protéines intervenant dans le métabolisme des glucides, et dans une moindre mesure dans la biosynthèse et le métabolisme des glycanes et le métabolisme de l'ADN. L'étude de Martinez-Garcia *et al.* montrait cette fois ci par une méthode d'étude statique que la MEC du biofilm de *S. epidermidis* était enrichie en protéines impliquées dans la glycolyse, ayant pour conséquence la production de pyruvate, et en protéines catabolisant ce pyruvate (lactate déshydrogénase, formate acétyltransférase et acétoïne réductase).



Parmi les protéines intracellulaires, il est également possible de retrouver les protéines de régulation de la formation de biofilm (décrites dans le paragraphe 1.3).

#### Protéines de surface

Outre les protéines intracellulaires, des **protéines de surface** composent la MEC du biofilm, telles les protéines de la famille des MSCRAMMs. Parmi celles-ci, plusieurs ont été impliquées dans les interactions intercellulaire : les protéines **FnBPA**, **FnBPB** et **SdrC** (Speziale *et al.*, 2014), mais aussi la protéine **Bap** (*biofilm-associated protein*) de *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001) et son homologue **Bhp** (*Bap homologue protein*) chez *S. epidermidis* (Bowden *et al.*, 2005). De plus, la protéine Bap forment des structures amyloïdes et renforce la structure du biofilm (Taglialegna *et al.*, 2016). La protéine **Aap** chez *S. epidermidis* ainsi son homologue **SasG** chez *S. aureus* participent également à la formation d'un biofilm protéique et permettant l'adhésion et l'accumulation des cellules bactériennes sur les surfaces (Hussain *et al.*, 1997; Geoghegan *et al.*, 2010). Enfin, chez *S. epidermidis*, la protéine **Embp** médie l'attachement initial à la MEC de l'hôte (via sa liaison à la fibronectine) et favorise l'accumulation de biofilm (Christner *et al.*, 2010). Dans leur modèle murin d'infection sur matériel à *S. aureus*, Lei *et al.* ont mis en évidence le rôle important de trois protéines associées à la surface (Ebh, SasF et IsdA) également impliquées dans l'étape initiale d'adhésion (Lei, Gupta and Lee, 2017).

#### Protéines extracellulaires

D'autre part, il a été rapporté que la matrice des biofilms staphylococcique était en grande partie composée de **protéines sécrétées**. Par exemple, les protéines **Eap** et **Emp** sont des protéines sécrétées, attachées de manière non covalente à la surface cellulaire de *S. aureus* et impliquées dans la formation de biofilm dans des conditions de restriction en fer (Johnson *et al.*, 2011). D'autre part, chez *S. aureus*, la **toxine  $\alpha$**  participe aux interactions intercellulaires tandis que les **toxine  $\beta$**  se lient de façon covalente entre elles ainsi qu'avec de l'ADN, produisant une matrice nucléoprotéique insoluble (Foulston *et al.*, 2014; Speziale *et al.*, 2014). Les **PSMs** ainsi que **AgrD** (décrite dans le paragraphe 1.3.) contribuent à la stabilité du biofilm via leur capacité à former des structures amyloïdes (Schwartz *et al.*, 2012, 2014). Des facteurs de virulence sécrétés (hémolysines, leucotoxines et lipases) (Graf *et al.*, 2019), ont été également été identifié dans la matrice du biofilm de *S. aureus* (Gil *et al.*, 2014).

De façon intéressante, Graf *et al.* ont révélé la présence de nombreux **facteurs de virulence** au sein du biofilm de *S. aureus* cultivé *in vitro* dans un système à flux, comme des protéines intervenant dans la biosynthèse de la capsule ainsi que divers facteurs sécrétés (hémolysines, leucotoxines et lipases) (Graf *et al.*, 2019). De par leur charge positive, ces facteurs médient très probablement des interactions électrostatiques avec les composants anioniques de la surface cellulaire, l'ADNe et les métabolites anioniques, contribuant ainsi à la stabilisation du biofilm. De la même façon, l'étude du protéome de la matrice du biofilm de *S. aureus* dans un modèle murin d'infection sur matériel a révélé la présence de leucocidines (Lei, Gupta and Lee, 2017). L'étude de l'exoprotéome d'une souche de portage nasal de *S. aureus* a quant à elle mis en évidence la forte présence parmi l'exoprotéome du biofilm, de protéines immuno modulatrices, dont la principale protéine identifiée était la protéine A (Muthukrishnan *et al.*, 2011).

### 1.2.3. L'ADNe

Ce n'est que plus récemment (à partir des années 2000s), que des études se sont intéressées à l'ADNe dans la matrice du biofilm staphylococcique. L'ADNe semble être un composant constant de la MEC des staphylococques et contribuer à l'architecture complexe du biofilm par le biais d'interactions avec d'autres composants moléculaires de la MEC.

La libération dans la MEC de l'ADNe est sous le contrôle de l'autolysine bifonctionnelle AtlA (en lien avec son activité hydrolytique du peptidoglycane) chez *S. aureus* (Bose *et al.*, 2012) ainsi que de la thermocluéase staphylococcique (Nuc) (Kiedrowski *et al.*, 2011). L'ADNe a d'abord été décrit comme formant des réseaux filamenteux stables. Il a ensuite été montré que l'ADNe contribue à l'agrégation bactérienne en favorisant l'adhésion intercellulaire, et qu'il médie l'attachement à des surfaces abiotiques et stabilise la structure du biofilm. En effet, de par son caractère polyanionique, l'ADNe interagit avec les composants de la MEC et notamment avec le PNAG, via des liaisons électrostatiques avec les charges positives du PNAG. Il forme également des complexes avec les protéines présentes dans la MEC, comme les protéines sécrétées (exotoxine  $\beta$  de *S. aureus*), les protéines et lipoprotéines exprimées sur la surface bactérienne (SaeP, IsaB) et les protéines amyloïdes (les PSMs). L'ADNe polyanionique interagirait avec les charges positives des PSMs créant des interactions PSM-ADNe-PSM permettant de rassembler les PSMs ; augmentant ainsi la concentration locale de peptides et déclenchant la polymérisation des protéines amyloïdes (Campoccia, Montanaro and Arciola, 2021).

De plus, l'ADNe peut avoir d'autres fonctions, comme favoriser le transfert de gènes de virulence, moduler la réponse immunitaire de l'hôte ou encore être à l'origine de résistance aux antibiotiques par acidification du milieu ou transfert de gènes de résistance (Campoccia, Montanaro and Arciola, 2021).

### 1.3. Régulation de la formation de biofilm

Le développement du biofilm staphylococcique est sous le contrôle de différents systèmes de régulation (Figure 26), dont l'opéron *ica*, les systèmes à deux composants (TCS), la famille des régulateurs Sar et le facteur sigma  $\beta$ .

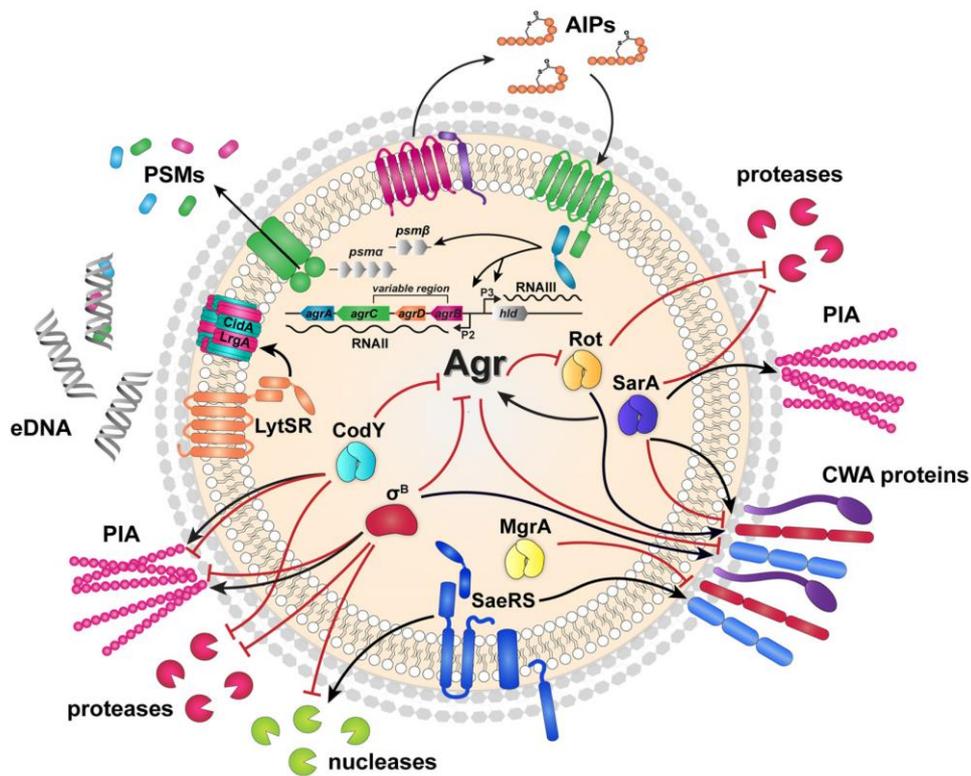


Figure 26 : Représentation schématique des principaux systèmes régulateurs impliqués dans la régulation du biofilm staphylococcique (Schilcher and Horswill, 2020).

Les flèches noires indiquent l'activation et les flèches rouges la répression.

#### 1.3.1. Régulation par l'opéron *ica*

L'opéron *icaADBC*, nécessaire à la synthèse de PNAG, est sous le contrôle d'un réseau de régulation complexe. Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'opéron *ica* est régulé négativement par IcaR et TcaR (*teicoplanin-associated locus regulator*). Le gène *icaR* est situé en amont du locus

*icaADBC* et code la protéine de liaison à l'ADN IcaR qui inhibe la transcription de *icaA*. TcaR est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille MarR ; il régule négativement *icaADBC* en se fixant sur son promoteur (Figure 23) (Conlon, Humphreys and O'Gara, 2002; Jefferson *et al.*, 2004).

En outre, les ARNs non codants sont également des régulateurs de *ica*. Plus particulièrement, IcaZ, présent chez des souches de *S. epidermidis* *ica*-positives mais pas chez *S. aureus*, régule négativement la traduction de l'ARNm de *icaR* par liaison à sa région 5'UTR (Lerch *et al.*, 2019). Plus récemment, les petits ARNs non codants RsaI et RsaE ont été identifiés chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, respectivement (Bronesky *et al.*, 2019; Schoenfelder *et al.*, 2019).

### 1.3.2. Systèmes de quorum sensing (QS)

Les systèmes de QS constituent les principaux systèmes de régulation de la formation de biofilm. Ce sont des systèmes de communication intercellulaires qui permettent aux bactéries de se coordonner et d'agir de manière collective. Quand la densité cellulaire atteint un certain seuil, des molécules signal appelées *autoinducers* sont libérées. Les bactéries détectent alors ces signaux grâce à des récepteurs spécifiques et activent des réponses adaptées, ayant notamment un impact sur la formation de biofilm (Fuqua, Parsek and Greenberg, 2001).

Le système *accessory regulatory factor (agr)* est le principal système de QS staphylococcique décrit et impliqué dans la régulation du développement du biofilm. La molécule signal de densité cellulaire bactérienne est l'*autoincucing peptide* (AIP) (Dunman *et al.*, 2001; Thoendel *et al.*, 2011). Le système Agr est un TCS. Les TCS sont des systèmes de transduction de signaux, qui génèrent une réponse adaptative à des conditions environnementales. Les TCS sont composés d'un senseur localisé au niveau membranaire (possédant une activité histidine kinase) et d'un effecteur qui régule l'expression de gènes cibles (Cashin *et al.*, 2006).

Ce système Agr est codé par le locus polygénique de 3,5kb, *agr*. Le locus est constitué de deux unités transcriptionnelles divergentes, RNAII et RNAIII, sous le contrôle de deux promoteurs, P2 et P3 respectivement. L'opéron RNAII régule positivement les gènes *agrBDCA* codant des protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des AIPs, la détection du signal et la régulation ultérieure des gènes cibles. Le cycle commence avec la transcription et la traduction de AgrD, qui est un propeptide précurseur de l'AIP. Il est ensuite sécrété et subit des modifications post-traductionnelles pour acquérir sa forme de peptide AIP final. AgrB est une endopeptidase multifonctionnelle membranaire, mais aussi une protéine chaperonne, qui

participe par son activité de protéase au processus de maturation de AgrD. Quand la concentration d'AIPs atteint un certain seuil, appelé *quorum*, ils vont se lier à AgrC (histidine kinase enchâssée dans la membrane). AgrC s'autophosphoryle et phosphoryle ensuite AgrA, le régulateur de réponse, qui va à son tour induire la transcription et l'expression de *RNAIII* via le promoteur P3 (Schilcher and Horswill, 2020; Peng *et al.*, 2022) (Figure 27).

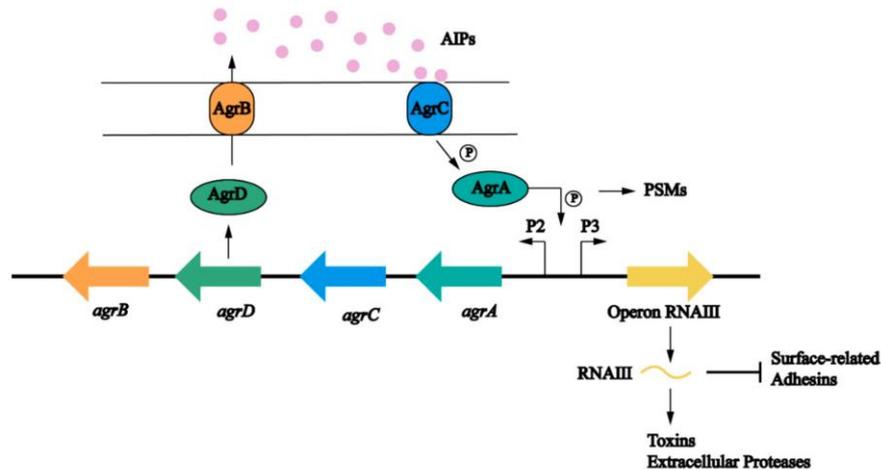


Figure 27 : Illustration de l'organisation du système de du QS Agr dans la formation de biofilm chez *S. aureus* (Peng *et al.*, 2022).

Le petit ARN, RNAIII, est la molécule effectrice principale de ce système. Elle régule positivement la transcription de gènes codant des protéines sécrétées (toxines, exoenzymes), et négativement celle de gènes codant des adhésines associées aux surfaces (Cheung *et al.*, 2011). L'augmentation de la concentration de RNAIII bloque la traduction du répresseur de toxines Rot (régulateur négatif des protéases). Bien que la majorité des gènes soient régulés par RNAIII, certains gènes sont directement régulés par AgrA. Par exemple, AgrA régule directement la transcription de *RNAII* via le promoteur P2, conduit à une production élevée d'AIP et à une boucle d'auto-activation. AgrA régule également positivement la transcription des gènes *psmA* et *psm $\beta$*  codant les PSM $\alpha$  et PSM $\beta$  respectivement, ainsi que *hld* qui code la toxine  $\delta$ .

Le système Agr est impliqué dans les différentes étapes de formation du biofilm staphylococcique. L'initiation de la formation de biofilm nécessite des conditions dans lesquelles l'activité du QS est faible, afin que l'expression des protéines de surface nécessaires à l'adhésion, telles FnBP et SdrC, ne soient pas réprimée. Ensuite, l'activation du QS de façon localisée au sein du biofilm entraîne le détachement de cellules (grâce à l'activation de protéases), créant des « vides » au sein du biofilm. Enfin, l'activation du QS entraîne une régulation positive de la production des PSMs et des enzymes dégradant la matrice, qui sont responsables de la

structuration du biofilm et du détachement des cellules staphylococciques du biofilm mature (Schilcher and Horswill, 2020).

Un deuxième système de QS a été décrit chez les staphylocoques, **LuxS/AI-2**. Dans ce système, AI-2 (furanyle borate diester) est la molécule signal, codée par le gène *luxS* (Schauder *et al.*, 2001). LuxS/AI-2 a des effets différents selon l'espèce sur la production de PNAG et donc sur la formation de biofilm : il diminue la production de biofilm chez *S. aureus* alors qu'il l'augmente chez *S. epidermidis*. En effet, AI-2 inhibe la transcription de *icaADBC* par activation de *icaR* chez *S. aureus* (Doherty *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012), alors qu'il régule positivement l'expression du locus *icaADBC* chez *S. epidermidis* (Xu *et al.*, 2006).

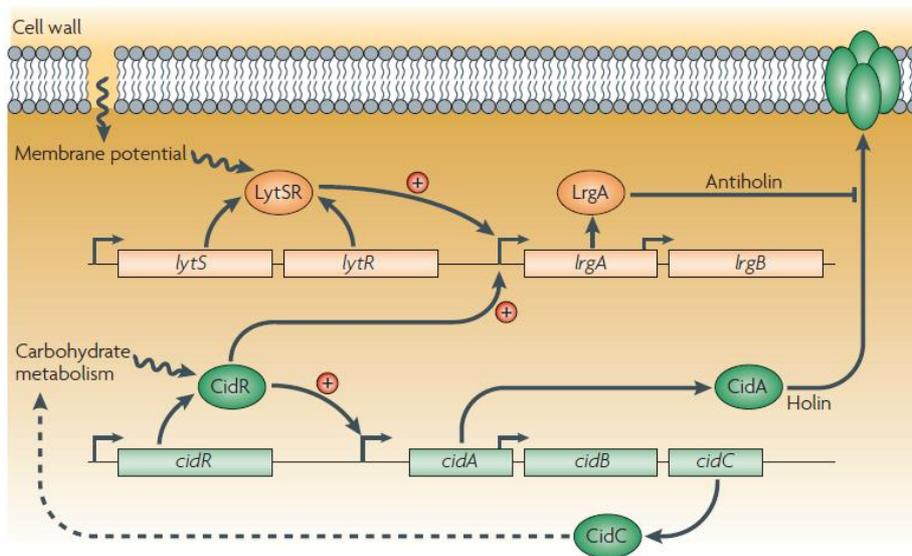
### 1.3.3. Autres systèmes à deux composants (TCS)

Chez les staphylocoques, le développement du biofilm peut être contrôlé par d'autres TCS que le système Agr.

Chez *S. aureus*, le TCS *S. aureus exoprotein expression* (**SaeRS**) régule l'expression de diverses exoprotéines jouant un rôle clé dans la pathogénèse et la formation de biofilm. Ce système est composé du senseur SaeS, de l'effecteur SaeR, ainsi que de deux protéines auxiliaires, SaeP et SaeQ, formant un complexe avec SaeS. Le système SaeRS favorise le développement du biofilm lors de **l'étape initiale d'adhésion** en stimulant l'expression des gènes *fnbA*, *fnbB* et *fib* (Liang *et al.*, 2006). SaeRS régule également positivement la production de la nucléase Nuc dégradant l'ADNe, ce phénomène précédant l'étape **d'exodus** (Moormeier and Bayles, 2017). Chez *S. epidermidis*, SaeRS inhibe la formation de biofilm par une diminution de relargage d'ADNe et de l'expression de Aap (Handke *et al.*, 2008). Plus récemment, chez *S. aureus*, il a été montré qu'une expression augmentée du *S. aureus clumping regulator* (**ScrA**) régulée par SaeRS, favorisait l'agrégation cellulaire par une régulation positive de multiples adhésines et une diminution d'expression de protéases sécrétées (Wittekind *et al.*, 2022).

Le TCS *Staphylococcal respiratory response regulator* (**SrrAB**) est un régulateur majeur de croissance selon la concentration en oxygène et de virulence de *S. aureus*. SrrB est le senseur qui s'autophosphoryle quand l'oxygène environnemental manque, et SrrA est la molécule effectrice qui induit la transcription de *icaA* et la production de PNAG en condition d'anaérobiose (Ulrich *et al.*, 2007).

Enfin, le TCS **LytSR** régule la mort cellulaire chez *S. aureus* par un système holine/antiholine. Le gène *cidA* code pour la protéine CidA et *lrgA* pour LrgA et fonctionnent comme holine et antiholine. CidA s'oligomérisse dans la paroi et forme des pores favorisant ainsi la lyse cellulaire. Une diminution du potentiel membranaire induit la transcription de *lytSR* et le TCS LytSR induit à son tour la transcription de *lrgAB* ; le produit de transcription LrgA inhibe l'action de CidA et la lyse cellulaire. D'autres part, CidR augmente l'expression de *cidABC* et *lrgAB* (Figure 28). Les opérons *lrgAB* et *cidABC* se sont révélés être des régulateurs de la mort cellulaire et de la lyse au cours du développement du biofilm. Le système Cid/Lgr est également contrôlé par le régulateur transcriptionnel de type LysR et le facteur sigma SigB décrit dans le chapitre 1.3.4. L'opéron *lrgAB* est aussi régulé par SarA, Rot (décrits dans le paragraphe 1.3.4.) et Agr. De plus, *lrgAB* est particulièrement exprimé lorsque le biofilm de *S. aureus* se structure en forme de tours (Schilcher and Horswill, 2020). Chez *S. epidermidis*, une seule étude menée chez une seule souche a montré que LytSR a un effet régulateur négatif sur le développement de biofilm (Zhu *et al.*, 2010) ; cependant le rôle de ce système chez cette espèce reste peu connu.



**Figure 28 : Système à deux composants LytSR et régulation cid/lrg** (Bayles, 2007).

Les gènes *cidA* et *lrgA* de *S. aureus* codent pour des protéines hydrophobes homologues fonctionnant respectivement comme holine et antiholine. Les gènes *cidB* et *lrgB* de *S. aureus* codent également pour des protéines hydrophobes homologues, mais les fonctions de ces protéines sont inconnues. Il est proposé que le système de régulation à deux composants LytSR détecte une diminution du potentiel membranaire et répond en induisant la transcription de *lrgAB*. La protéine CidR, un régulateur de transcription de type LysR, induit la transcription de *cidABC*, *lrgAB* et *alsSD* (*alsSD* n'est pas représenté) en réponse au métabolisme des glucides. Le gène *cidC* code pour la pyruvate oxydase.

#### 1.3.4. Autres régulateurs

La famille de protéines *staphylococcal accessory regulator* (**SarA**) regroupe des facteurs de transcription généraux qui se lient aux régions de l'ADN riches en bases AT et activent ou inhibent l'expression de certains gènes. Chez *S. aureus*, le régulateur SarA se lie directement au promoteur de *agr* et régule positivement l'expression de RNAIII. Il régule également positivement l'expression de *fnbA*, *fnbB* et *hla*. Au contraire, SarA réprime la production de protéases extracellulaires, favorisant ainsi la formation de biofilm. D'autre part, le locus *sarA* active la transcription de l'opéron *ica* et la production de PNAG, mais il peut également induire l'expression de *icaR* et ainsi prévenir une production excessive de biofilm (Peng *et al.*, 2022). SarA est lui-même régulé positivement par SigB (Figure 26). Chez *S. epidermidis*, l'effet de SarA sur la formation de biofilm est souche dépendant (Tormo *et al.*, 2005; Christner *et al.*, 2012).

La famille SarA inclut également d'autres régulateurs, dont **Rot** et **MgrA** (Figure 26). Rot régule négativement la transcription de protéases, favorisant ainsi la production de biofilm (Schilcher and Horswill, 2020). MgrA est le principal effecteur du TCS ArlRS qui un régulateur d'autolyse et de formation de biofilm (Fournier and Hooper, 2000). MgrA inhibe l'expression de gènes codant huit protéines ancrées à la membrane, dont SasG, diminuant ainsi l'attachement initial aux surfaces abiotiques et les interactions intercellulaires au sein du biofilm (Crosby *et al.*, 2016; Jiang, Jin and Sun, 2018).

Le facteur sigma **SigB** est le principal facteur de réponse au stress environnemental de *S. aureus* et joue un rôle essentiel dans la formation de biofilm dans ces conditions. SigB favorise la production de biofilm en condition de stress osmotique (Rachid *et al.*, 2000). Cependant, il a été montré que ce phénomène est souche-dépendant (Valle, Echeverz and Lasa, 2019). SigB diminue la production de RNAIII du système Agr et régule négativement le TCS SaeRS. Il est également impliqué dans **l'étape précoce d'attachement**, favorisant l'expression d'adhésines (FnbA, ClfA). A l'inverse, il régule négativement la production de plusieurs exoprotéines (nucléase, protéase) (Figure 26), inhibant donc la libération d'ADNe ainsi que la dispersion du biofilm. Chez *S. epidermidis*, il a été montré que le SigB favorise la formation de biofilm par inhibition de *icaR*, et production plus importante de PNAG (Knobloch *et al.*, 2004).

Le facteur de transcription global **CodY** agit principalement comme un répresseur des gènes métaboliques et de virulence chez *S. aureus*. Dans des conditions nutritionnelles favorables, CodY interagit avec ses molécules effectrices, entraînant un changement conformationnel qui augmente l'affinité de CodY pour ses sites de liaison à l'ADN. CodY inhibe fortement la

transcription du locus *agr* (Figure 26), et régule la formation de biofilm de façon PNAG-dépendante en régulant l'expression de *ica*. De plus, CodY régule négativement la production d'exoprotéases et de la thermonucléase (*nuc*), par régulation du locus *sae* (Peng *et al.*, 2022).

Les principaux systèmes de régulation et leurs fonctions sont résumés dans le (Tableau 6). En fonction de la nature du biofilm, composé principalement d'exopolysaccharides ou d'ADNe, ce ne sont pas les mêmes régulateurs qui sont mis en jeu.

**Tableau 6 : Principaux régulateurs du biofilm staphylococcique** (Schilcher and Horswill, 2020).

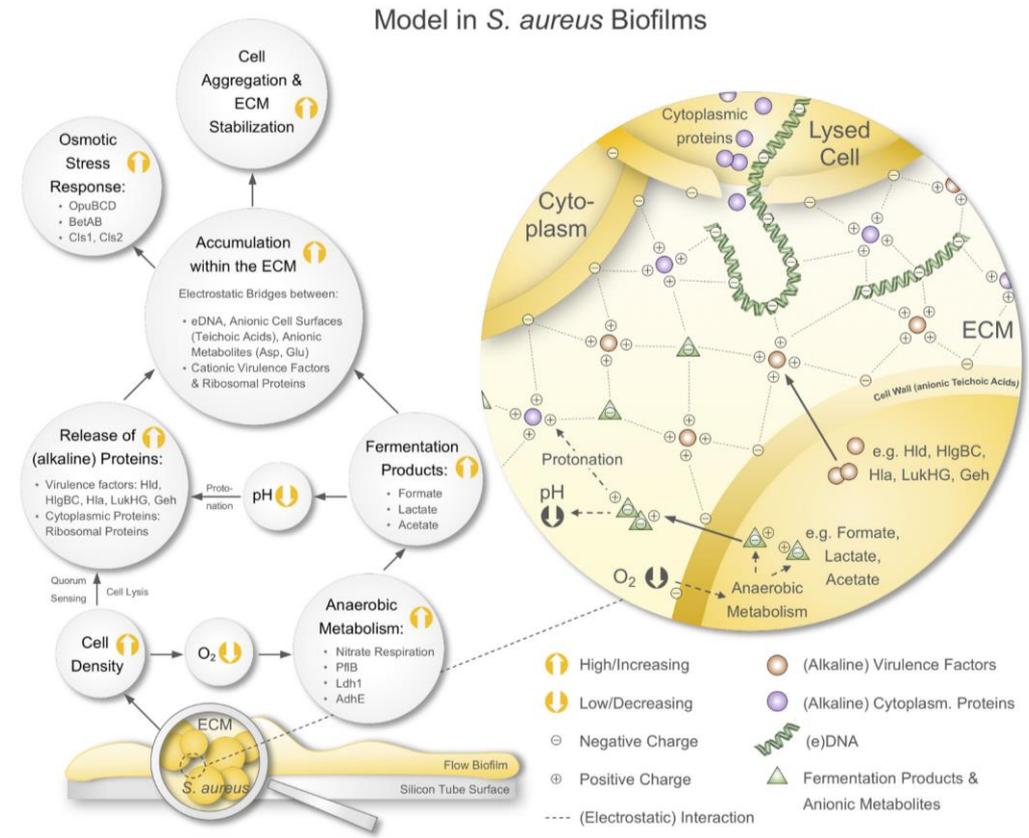
Regulator	Functions	Involvement in biofilm development
Agr	Cell-cell communication system (quorum sensing), TCS with AIPs as signaling molecules; stimulation of protease production and PSMs; repression of adhesins	Important for initial attachment and biofilm disassembly
SaeRS	TCS; stimulation of adhesins and nuclease	Important for biofilm maturation; regulates the "exodus" event in the five-phase biofilm model
SarA	SarA family cytoplasmic regulator; repression of protease production and stimulation of PIA; regulation of adhesins	Important for biofilm formation mainly through repression of proteases; positive regulator of biofilm formation
Rot	SarA family cytoplasmic regulator; main effector of the Agr QS; stimulation of adhesins and repression of proteases	Important for biofilm formation mainly through repression of proteases; positive regulator of biofilm formation.
MgrA	SarA family cytoplasmic regulator; main effector of the ArlRS TCS; repression of adhesins	Important for biofilm formation mainly through repression of adhesins; negative regulator of biofilm formation
SigB	Alternative sigma factor for stress response; stimulation of adhesins and repression of proteases and nuclease; strain-dependent regulation of PIA	Important for initial attachment and biofilm disassembly
CodY	Cytoplasmic regulator for metabolic response; strain-dependent regulation of PIA; repression of proteases	Important for PIA-dependent biofilm formation
LytSR	TCS regulating cell lysis; stimulation of LrgAB	Important for eDNA-dependent biofilm formation

#### ***1.4. Facteurs influençant la formation et la composition du biofilm***

Divers facteurs ont été décrits comme pouvant influencer sur la capacité de formation et sur la composition du biofilm staphylococcique, dépendant de la souche et/ou de son milieu environnant.

##### **Facteurs du milieu environnant**

L'environnement dans lequel se trouve la bactérie peut impacter la production de biofilm et la composition de sa MEC (Figure 29).



**Figure 29 : Modélisation de l'agrégation cellulaire et de la stabilisation de la MEC sous l'influence de facteurs environnementaux** (Graf et al., 2019).

Les biofilms étaient cultivés dans un système à flux. Leur développement à des densités cellulaires élevées conduit à une limitation de l'oxygène. Par conséquent, les cellules incluses dans le biofilm développent un métabolisme anaérobie et sécrètent de grandes quantités de produits de fermentation abaissant le pH local dans la matrice. Les cellules du biofilm libèrent de grandes quantités d'ADNe, de facteurs de virulence et de protéines ribosomales (en plus d'autres protéines cytoplasmiques). Ces protéines sont protonées dans l'environnement acide en raison de leur caractère alcalin. L'accumulation de ces protéines cationiques, de l'ADNe et des produits de fermentation anioniques ainsi que d'autres métabolites anioniques crée un réseau électrostatique impliquant l'ADNe et les surfaces cellulaires anioniques (abritant des acides teichoïques anioniques), ce qui conduit à l'agrégation cellulaire et à la stabilisation de la matrice. ECM : Matrice extracellulaire.

La présence de **glucose** peut avoir un effet positif sur la production de biofilm par action sur le système Agr. Une concentration élevée de glucose stimule la voie de la glycolyse ; or les produits issus de la glycolyse sont des composés acides, inhibant Agr. Ce phénomène est espèce- et souche-dépendant, en effet dans certains cas, le glucose avait un effet négatif sur la production de biofilm. Le **pH** affecte le système Agr ; un pH acide favorise la production de biofilm (Moormeier *et al.*, 2014; Schilcher and Horswill, 2020). Des conditions d'**anaérobiose** favorisent la production de biofilm par activation du système SrrAB.

D'autres **stress** environnementaux, tels que le stress osmotique, l'éthanol ou des concentrations sub-inhibitrices de certains inhibiteurs de la synthèse des protéines comme la tétracycline,

régulent positivement l'opéron *ica* et induisent la synthèse de PNAG chez les staphylocoques (Rachid *et al.*, 2000; Knobloch *et al.*, 2001; Julia M Ross and Marten, 2015).

**L'écoulement de fluide** peut modifier la capacité de formation de biofilm en éliminant les molécules signales des systèmes de QS (dont Agr), levant ainsi l'inhibition du QS et favorisant la formation de biofilm. Chez *S. aureus*, il a été montré *in vitro*, que la formation de biofilm est augmentée dans les zones à fort débit de fluide (Schilcher and Horswill, 2020).

La concentration en **fer** et notamment la carence à laquelle la bactérie fait face lors d'infections est un déterminant important pour la formation du biofilm staphylococcique. Par exemple, Lin *et al.* ont montré que la production de biofilm en 24h en microplaque (évaluée par coloration à la safranine et analysée en microscopie confocale) de cinq souches de *S. aureus* était inhibée en absence de fer (avec comme chélateurs le 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucofuranose ou le 2,2-dipyridyl). La carence en fer inhibait la formation de biofilm en empêchant l'attachement initial des cellules à une surface solide (tests d'adhésion en boîte de pétri) et en réduisant la production de PNAG (détecté par dot-plot) (Lin *et al.*, 2012). Au contraire, Johnson *et al.* ont montré en 2005, que la formation de biofilm en 24h de sept souches de *S. aureus* était augmentée en condition de restriction en fer (RPMI additionné d'un chélateur de fer) ; et réprimée par l'ajout de fer. L'induction de la formation du biofilm en milieu carencé en fer n'était dans cette étude pas expliquée par une augmentation de l'expression du PNAG (analyse par slot plot) (Johnson *et al.*, 2005). La même équipe, en 2011, a montré par mutagenèse, que la restriction en fer induisait l'expression de Fur et Sae, augmentant l'expression de *isdA*, *isdB*, *eap* et *emp* chez *S. aureus* (Johnson *et al.*, 2011). Le fer joue également un rôle central dans la formation de biofilm chez *S. epidermidis*. Une équipe a en effet montré par analyse de la production de biofilm en microplaque et microscopie confocale (à 6h et 24h de culture) chez trois souches de *S. epidermidis*, qu'un excès (par ajout de fer dans le milieu) ou une carence en fer (par ajout d'un chélateur, la bipyridine) entraînaient une formation de biomasse altérée et des modifications de la structure du biofilm, aboutissant à une diminution et un retard de formation du biofilm (Oliveira, França and Cerca, 2017).

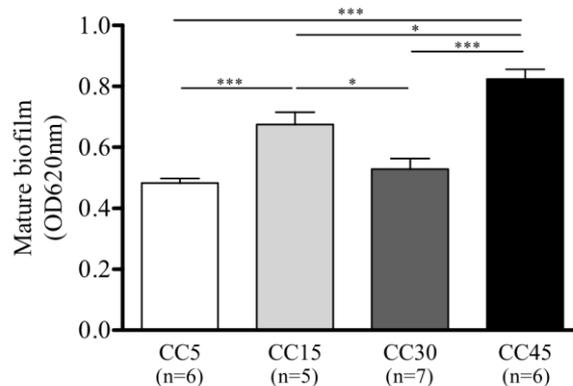
#### Facteurs dépendant de la souche

La composition du biofilm peut être souche-dépendante, et varier selon le profil de résistance aux antibiotiques et/ou la lignée phylogénétique.

Il a été montré par des analyses de biofilm après traitement avec de la protéinase K et immunoblot pour détecter le PNAG, que les souches de SARM formaient des biofilms majoritairement protéiques alors que les souches de SASM développaient un biofilm polysaccharidique (Fitzpatrick, Humphreys and O’Gara, 2005; O’Neill *et al.*, 2007).

Dans une étude sud-africaine de 2016, la formation de biofilm, évaluée en microplaques par coloration au cristal violet chez 30 souches de *S. aureus* responsables de bactériémie, était corrélée avec la lignée clonale (*spa type*) mais pas à la résistance à la méticilline (Naicker *et al.*, 2016).

De la même façon, l’équipe lyonnaise de Tasse *et al.* a mis en évidence une association entre le phénotype de formation de biofilm et la lignée clonale chez 30 souches de SASM responsables d’IOA sur matériel (Tasse *et al.*, 2018). La formation précoce de biofilm, évaluée par la technique Biofilm Ring Test<sup>®</sup> (mesure de la mobilité de microbilles magnétiques mélangées à la culture bactérienne en microplaque) (Olivares *et al.*, 2016), était significativement plus lente pour les souches du CC30 que celles des CC5, CC15 et CC45. L’immobilisation des billes en présence de DNase ou protéinase K ajouté dès l’initiation de la culture montrait que la formation de biofilm était fortement dépendante de la présence d’ADNe pour les souches des CC5, CC15 et CC30 alors qu’elle était principalement dépendante de la présence de protéines pour celles du CC45. Enfin, la coloration du biofilm mature au cristal violet mettait en évidence que les souches du CC45 produisaient significativement plus de biofilm que les souches des autres CC (Figure 30) (Tasse *et al.*, 2018).



**Figure 30 : Comparaison de la formation du biofilm par les principaux complexes clonaux (CC) de *S. aureus* (Tasse *et al.*, 2018).**

Quantités de biofilm formées par les souches d’un même CC après 24 heures, déterminées par coloration au cristal violet et mesure de la densité optique à 620 nm : moyennes et écart-type correspondant à répliquats techniques et quatre répliquats biologiques en microplaque.

## 2. Biofilm de *S. lugdunensis*

La capacité de formation de biofilm constitue un facteur crucial de la pathogénèse des infections à *S. lugdunensis*, notamment des IOAs sur matériel (Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017b)(Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023). Cependant, seulement quelques études menées *in vitro* se sont intéressées à la caractérisation de ce dernier.

### 2.1. Formation de biofilm, composition de sa matrice et régulation

#### 2.1.1. Capacité de formation de biofilm

La capacité de formation de biofilm *in vitro* de *S. lugdunensis* est une caractéristique fréquente de l'espèce, variant entre 36,8% et 100% des souches (Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Missineo *et al.*, 2014; Giormezis *et al.*, 2015; Tseng *et al.*, 2015a; Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017b; Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023). Selon les études, cette capacité peut être associée au type d'infection, à la présence de matériel, à la notion de rechute après chirurgie ou encore à l'aspect des colonies (Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017b; Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023).

Par la méthode de BioFilm Ring Test<sup>®</sup>, qui évalue la formation précoce de biofilm, Argemi *et al.* ont montré que les 28 souches isolées au CHU de Strasbourg entre novembre 2013 et mars 2016 et responsables d'IOA (dont 16 d'infections sur matériel, majoritairement des prothèses de genou) formaient du biofilm. Vingt souches initiaient la formation de biofilm dans les deux heures suivant la mise en culture, et les huit autres dans les huit heures. 25 des 28 souches avaient atteint leur production maximale de biofilm dans les six heures (Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017b).

De nombreuses études ont analysé la formation de biofilm mature de 24h en microplaques de polystyrène et coloration au cristal violet ou à la safranine. 100 % des souches testées formaient du biofilm dans les études menées par Hagstrand Aldman *et al.* (36 souches responsables d'IOA sur matériel, dont 20 prothèses de genou) Frank et Patel (15 souches d'infection, dont 8 souches d'infections sur matériel), et Missineo *et al.* (9 souches d'infection, dont 3 d'IOA avec 2 sur matériel), à des niveaux variables selon les souches (Frank and Patel, 2007; Missineo *et al.*, 2014; Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023).

Une étude italienne a montré que 77% des 22 souches testées responsables d'infections diverses (incluant des souches isolées d'IOAs [7], d'IPTM [7], d'infections post-opératoires[5],

d'endocardites [3]) produisaient du biofilm (Ravaioli *et al.*, 2020), pourcentage proche de l'étude de Pereira *et al.*, dans laquelle 60,9 % (14 des 23 souches isolées de bactériémies, d'IPTM, d'infections post-opératoires, d'infections urinaires et d'infections sur prothèse) formaient du biofilm (Pereira *et al.*, 2012). D'autre part, Pereira *et al.* ont montré que les 3 souches de *S. lugdunensis* formant des « *rough colony* » (deux souches isolées de bactériémies et une souche d'infection post chirurgicale) produisaient plus de biofilm que les souches formant des colonies lisses (Figure 31). De plus, les souches formant des « *rough colony* » étaient les seules capables d'adhérer à des cellules humaines carcinomateuses pulmonaire de la lignée A549. Les auteurs ont également constaté que les souches produisant le plus de biofilm avaient le même profil PFGE (génotype A, le plus fréquemment retrouvé parmi ceux des souches de l'étude).

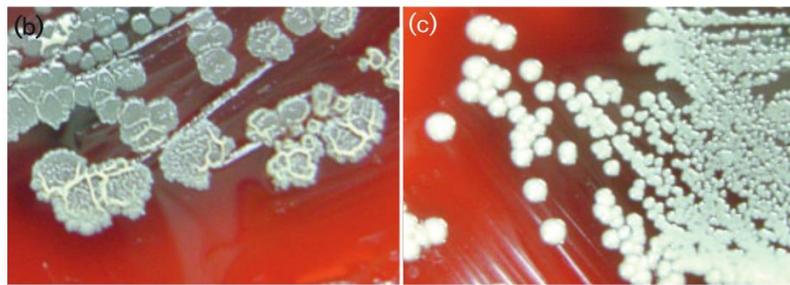


Figure 31 : Exemple de « *rough colony* » (b) et colonies lisses de *S. lugdunensis* (Adapté de (Pereira *et al.*, 2012))

Enfin, dans l'étude de Giormezis *et al.*, la production de biofilm n'a été mise en évidence que chez 36,8% des souches, et était plus fréquente pour les isolats d'infections sur matériel (14 souches des 38 isolées d'IPTM, de bactériémies et infections profondes, et d'infections associées à des dispositifs médicaux [cathéters intraveineux et péritonéal]) (Giormezis *et al.*, 2015).

### 2.1.2. Composition de la MEC

Contrairement à ce qui a été décrit pour *S. aureus* ou *S. epidermidis*, la MEC du biofilm de *S. lugdunensis* n'est à ce jour pas caractérisée finement. Les données disponibles proviennent de tests de dispersion de la matrice et/ou marquage des composés puis révélation par microscopie. La matrice du biofilm de *S. lugdunensis* a ainsi été décrite à ce jour comme majoritairement composée de protéines, mais contient également des polysaccharides et de l'ADNe, en proportions variables selon les souches (Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Ravaioli *et al.*, 2012; Missineo *et al.*, 2014; Tseng *et al.*, 2015a; Qian *et al.*, 2021).

#### 2.1.2.1. Matrice exopolysaccharidique

Comme évoqué précédemment, l'exopolysaccharide le plus fréquemment présent dans les biofilms staphylococciques est le PNAG, dont la synthèse résulte de l'expression du locus *icaADBC*. *S. lugdunensis* possède un locus homologue du locus *icaADBC* de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Frank and Patel, 2007).

Ce locus a été décrit en 2007 par Frank *et al.*, révélant sa présence par PCR et séquençage Sanger (Frank and Patel, 2007). L'annotation des produits d'amplification a permis d'identifier des cadres de lecture ouverts (ORF) présentant une similitude avec l'opéron *icaADBC* des autres staphylocoques. Étonnamment, le gène régulateur *icaR* n'a pas été détecté en amont d'*icaA* (Figure 32). A la place, un ORF dépourvu d'homologie avec des séquences staphylococciques connues a été identifié dans la même orientation que *icaA*, codant une glycosyl hydrolase putative. (Figure 32) (Frank and Patel, 2007).

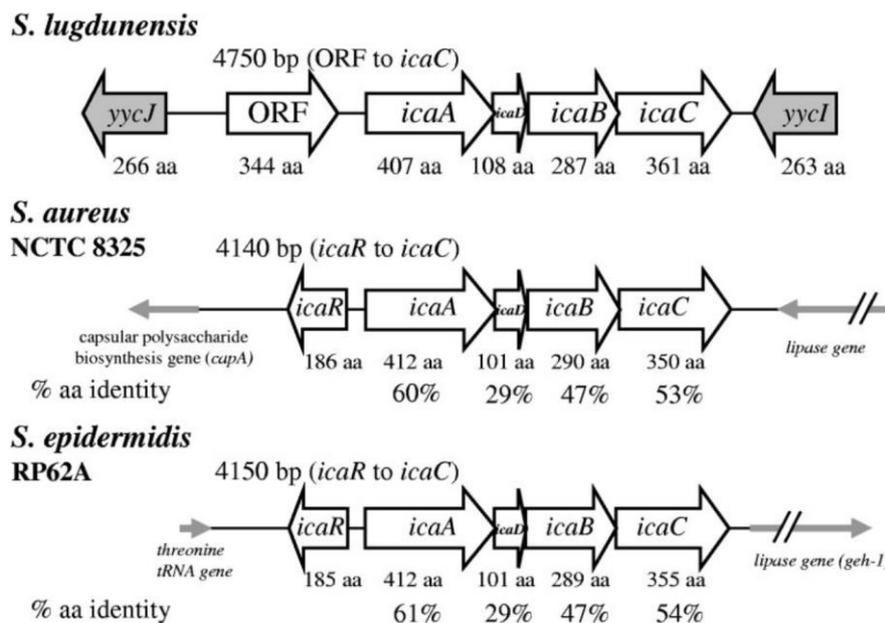


Figure 32 : Organisation génétique du locus *icaADBC* de *S. lugdunensis* en comparaison à celui de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Frank and Patel, 2007).

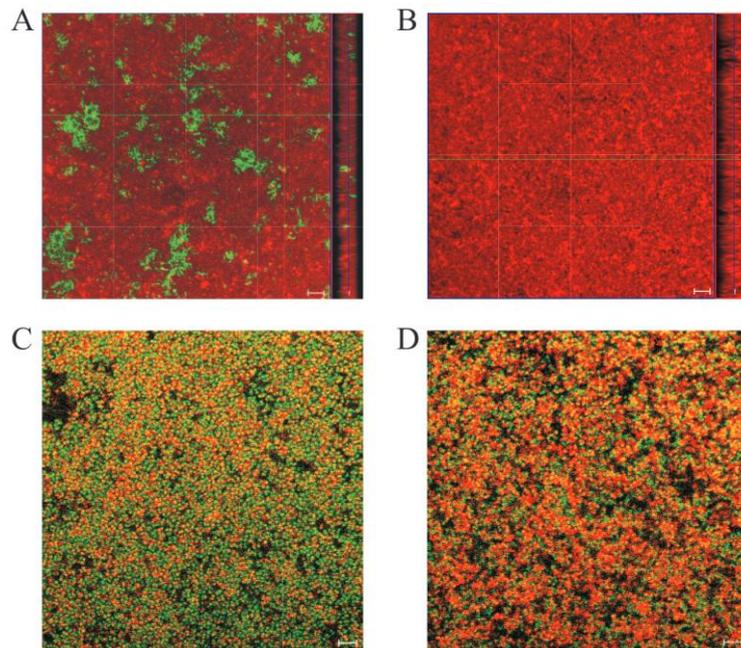
Dans cette étude, le locus était identifié chez les quinze souches cliniques de *S. lugdunensis* analysées (isolées d'endocardites, d'IPTM et d'IOAs sur matériel). Cependant, le PNAG, recherché par immunoblotting et microscopie confocale à balayage laser (CLSM) après marquage par agglutinine de germe de blé, n'a été détecté dans aucun des biofilms des quinze isolats. De la même façon, d'autres études ont révélé que la présence du locus *icaADBC* ne prédit pas la capacité de formation de biofilm chez *S. lugdunensis*. En effet, les onze souches de *S. lugdunensis*

isolées de bactériémies d'un hôpital à Taiwan possédaient le gène *icaA* mais ne produisaient pas de PNAG (détecté par géloses contenant du rouge Congo) (Tseng *et al.*, 2015b). Dans l'étude de Chokr *et al.*, six des 11 souches de *S. lugdunensis* possédaient le locus *ica* (détection du locus par PCR avec 4 couples d'amorces), mais aucune ne produisait de PNAG (Chokr *et al.*, 2006). Ainsi, malgré la présence du locus *icaADBC*, la formation de biofilm serait contrôlée par une voie *ica*-indépendante chez *S. lugdunensis*.

Cependant, une étude canadienne a révélé que *S. lugdunensis* pouvait produire une faible quantité de PNAG. Les auteurs se sont intéressés à la production de PNAG de treize souches de staphylocoques dont une de *S. lugdunensis* par analyse chromatographique et mesure du biofilm formé après traitement par dispersine B (une enzyme dégradant le PNAG). Alors que le biofilm de *S. lugdunensis* n'était pas dégradé par la dispersine, il contenait du PNAG mais en plus faible quantité que les deux autres espèces étudiées, dont le biofilm était dégradé par la dispersine B de manière significative  $p < 0,001$ . De façon surprenante, le locus *ica*, dont la présence était évaluée par quatre couples d'amorces différents, n'était pas présent chez la souche de *S. lugdunensis* (Sadovskaya *et al.*, 2006).

#### 2.1.2.2. Matrice protéique

Contrairement au biofilm de *S. epidermidis* et malgré la présence du locus *ica* codant pour le PNAG, le biofilm de *S. lugdunensis* a été décrit comme majoritairement protéique dans plusieurs études. En effet, l'utilisation de traitements enzymatiques et chimiques du biofilm par DNase (dégradant l'ADNe), métapériodate ou dispersine (dégradant le PNAG), et protéinase K ou trypsine (dégradant les protéines), a permis de montrer que la MEC du biofilm de *S. lugdunensis* était fortement dégradée par la protéinase K, mais pas par les autres traitements (Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Missineo *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2021). Ces résultats ont été confirmés par analyse du biofilm de 24h (plaques de 4 puits avec fond verre) en CLSM après marquage des protéines avec le SYPRO Ruby (Frank and Patel, 2007; Ravaioli *et al.*, 2020) (Figure 33).



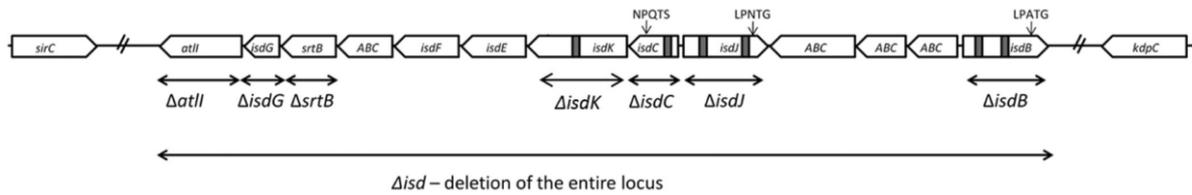
**Figure 33 : Analyse de la composition de la MEC de *S. lugdunensis* obtenues par CLSM (Frank and Patel, 2007).**

A et B : Le PNAG est coloré en vert par une wheat germ agglutinin dans la MEC du biofilm d'une souche de *S. epidermidis* (A) ou de *S. lugdunensis* (B). De grandes structures de PNAG ont été observées parmi les cellules (rouges), colorées avec le colorant membranaire FM 4-64, dans les biofilms de *S. epidermidis* mais pas dans les biofilms de *S. lugdunensis*. Les images montrent une seule tranche x-y du centre du biofilm et le profil du biofilm de l'axe y-z (à droite). C et D : Détection de protéines extracellulaires dans les biofilms d'une souche de *S. epidermidis* (C) et de *S. lugdunensis* (D). Les protéines (rouges) ont été colorées avec du SYPRO Ruby. Les bactéries ont été colorées avec du Syto-9, colorant de l'acide nucléique des cellules vivantes. Les zones jaunes indiquent la colocalisation des protéines et des cellules.

Même si la composition en protéines de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis* reste inconnue, certaines protéines jouant un rôle dans la formation de celui-ci ont été identifiées.

Tout d'abord, deux études se sont intéressées à la caractérisation de l'autolysine bifonctionnelle **AtIL** (Gibert *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015). L'analyse de la formation de biofilm en microplaque (coloration par le cristal violet ou la safranine) et par CLSM révélait que le mutant du gène *atlL* produisait significativement moins de biofilm par rapport à la souche sauvage (Gibert *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015). Hussain *et al.* ont montré, grâce à des tests d'adhérence ELISA, que l'autolysine était impliquée dans le processus d'initiation de la formation de biofilm en se liant au fibrinogène, à la fibronectine et à la vibronectine, protéines humaines impliquées dans l'étape initiale d'adhésion du biofilm (processus décrit dans les paragraphes précédents).

Une deuxième protéine, impliquée dans la formation de biofilm en milieu carencé en fer, est la protéine **IsdC**, appartenant au complexe protéique *Iron-regulated surface determinant* (Isd) (Figure 34) (Missineo *et al.*, 2014).



**Figure 34 : Schéma du locus *isd* et des gènes mutés** (Missineo *et al.*, 2014).

Les cases vides indiquent les gènes individuels et les flèches indiquent la direction de leur transcription. Les tirets inclinés indiquent le début et la fin du lieu *isd*. Les mutations sont indiquées par des flèches horizontales à deux têtes.

Missineo *et al.*, ont comparé la production de biofilm en microplaque en milieu riche (TSB + 0,3 % de glucose) et carencé en fer (RPMI + 0,3 % de glucose et 2mM de glutamine) de divers mutants du locus *isd* et de la souche sauvage *S. lugdunensis* N920143, isolée d'un abcès du sein. Ils ont montré que le locus *isd*, et plus particulièrement *isdC*, était impliqué dans les étapes d'adhésion (tests d'attachement au polystyrène) et d'accumulation de biofilm en milieu carencé en fer. Cette accumulation cellulaire est permise par des interactions homophiles entre les protéines IsdC des cellules adjacentes (Missineo *et al.*, 2014).

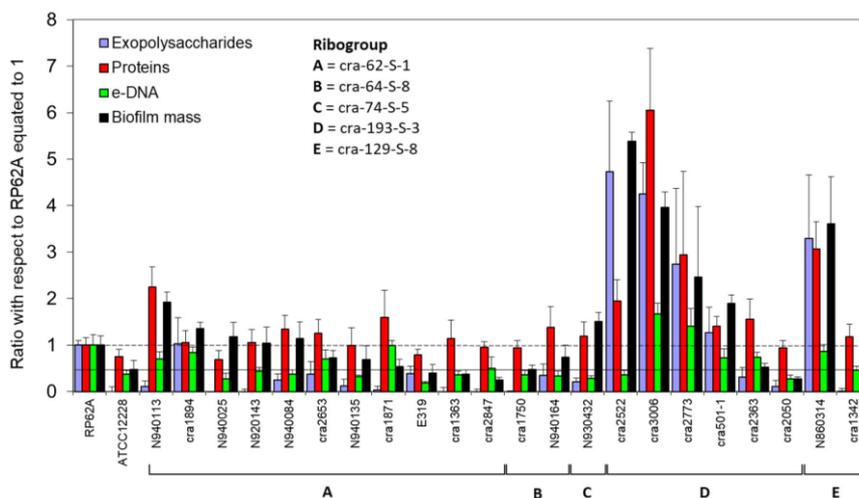
Plus récemment, Aubourg *et al.* ont confirmé que la souche *S. lugdunensis* N920143 formait significativement plus de biofilm en milieu carencé en fer (*brain heart infusion* [BHI] avec 350  $\mu$ M de 2,2-dipyridyl [DIP]) (Aubourg *et al.*, 2020). La caractérisation de son protéome par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine a révélé que 222 protéines étaient plus abondantes dans des conditions de limitation du fer. Plus particulièrement, les protéines suivantes étaient retrouvées plus abondantes en milieu carencé en fer qu'en milieu riche : IsdJ (x 8,7), IsdG (x 8,1), IsdC (x 4,8) et IsdE (x 5,7) (Aubourg *et al.*, 2020).

Enfin, une étude s'est intéressée aux rôles de la Sortase A (**SrtA**) de *S. lugdunensis*, et notamment son importance dans la formation de biofilm (Hussain, Kohler and Becker, 2020). Les sortases ont pour rôle d'attacher de manière covalente à la paroi cellulaire les protéines de surface contenant le motif d'ancrage LPXTG. L'analyse de la formation du biofilm par coloration au cristal violet a montré que les deux mutants délétés pour le gène *srtA* produisaient significativement moins de biofilm que les souches sauvages. De plus, un test d'adhérence ainsi que des tests ELISA ont montré une adhérence diminuée des mutants aux protéines de la MEC de l'hôte (fibronectine, fibrinogène et vitronectine). Ainsi, SrtA joue un rôle important dans la formation de biofilm et la colonisation bactérienne (Hussain, Kohler and Becker, 2020).

## 2.1.2.3. ADNe

L'ADNe est décrit comme un composant important de la matrice extracellulaire des biofilms staphylococciques. Chez *S. lugdunensis*, l'ADNe s'est également avéré être présent et important pour la formation du biofilm (Ravaioli *et al.*, 2020).

Dans une étude chinoise, la formation de biofilm de 24 isolats cliniques de *S. lugdunensis* (isolés d'IPTM, d'infections sur cathéter, d'urine et de bactériémies) a été étudiée par coloration au cristal violet, et la composition de la MEC par traitements enzymatiques et chimique puis par microscopie électronique et CLSM. Des protéines, des polysaccharides et de l'ADNe ont été détectés dans la MEC des 24 isolats, mais l'ADNe était identifié en quantité marginale par rapport aux autres composés (Qian *et al.*, 2021). De la même façon, Ravaioli *et al.* ont analysé la composition en exopolysaccharides, protéines et ADNe de 22 souches cliniques de *S. lugdunensis* (principalement d'IOA) en CLSM. Pour la plupart des souches (82 %), l'ADNe était détecté en quantité significativement inférieure à celle de la souche contrôle productrice de biofilm *S. epidermidis* RP62A (Figure 35). Deux souches, fortement productrices de biofilm, présentaient des quantités d'ADNe significativement supérieures à la souche contrôle. Cependant, alors que la teneur en exopolysaccharides était fortement associée à la masse du biofilm, la teneur en ADNe n'était que très faiblement associée à la biomasse. Ces résultats suggéraient que la quantité d'ADNe nécessaire à l'intégrité du biofilm de *S. lugdunensis* était modeste par rapport à ce qui était observé pour la souche contrôle *S. epidermidis* RP62A (Ravaioli *et al.*, 2020).



**Figure 35 :** Proportion d'exopolysaccharides, protéines, ADNe et biomasse de biofilm dans les différentes souches de *S. lugdunensis* par rapport à la souche de référence formant un biofilm RP62A (Ravaioli *et al.*, 2020).

Le graphe rapporte les valeurs de masse de biofilm, et de la teneur en exopolysaccharides, eDNA et protéines, pour toutes les souches bactériennes testées, après normalisation avec RP62A. Le trait continu indique le niveau de biomasse de biofilm observé pour la souche de référence ATCC 12228, tandis que la ligne pointillée indique le niveau de biomasse de biofilm trouvé pour la souche productrice de biofilm RP62A.

La présence d'ADNe dans la MEC peut être liée à la lyse cellulaire, notamment celle dépendante de l'action d'autolysines ou d'hydrolases du peptidoglycane (Vollmer *et al.*, 2008). Le mutant *atlL* présentant une formation de biofilm diminuée, une hypothèse était que cette altération soit liée à une lyse cellulaire réduite et donc à une diminution de l'ADNe (Gibert *et al.*, 2014). Cependant, des dosages de l'ADN par dosage nanodrop ne montraient pas de différence dans la libération d'ADNe entre la souche sauvage et le mutant *atlL* (Hussain *et al.*, 2015).

D'autre part, il existe chez *S. lugdunensis* un mécanisme de libération de l'ADN indépendant du processus de lyse par autolysine chez les souches de *S. lugdunensis*. En effet, Rajendran *et al.* ont générées plusieurs mutants par insertions aléatoires d'un transposon (*Tn917*) dans le génome de *S. lugdunensis* ; ils ont révélé qu'un seul mutant était incapable de produire du biofilm. La mutation était dans le gène *comEB*, impliqué dans la compétence bactérienne. Le biofilm du mutant *comEB* contenait significativement moins d'ADNe que celui de la souche sauvage et, grâce à des tests d'induction d'autolyse par Triton X-100, il été démontré que l'autolysine et la nucléase n'étaient pas responsables de lyse cellulaire et de la libération d'ADN chez la souche sauvage (Rajendran *et al.*, 2015).

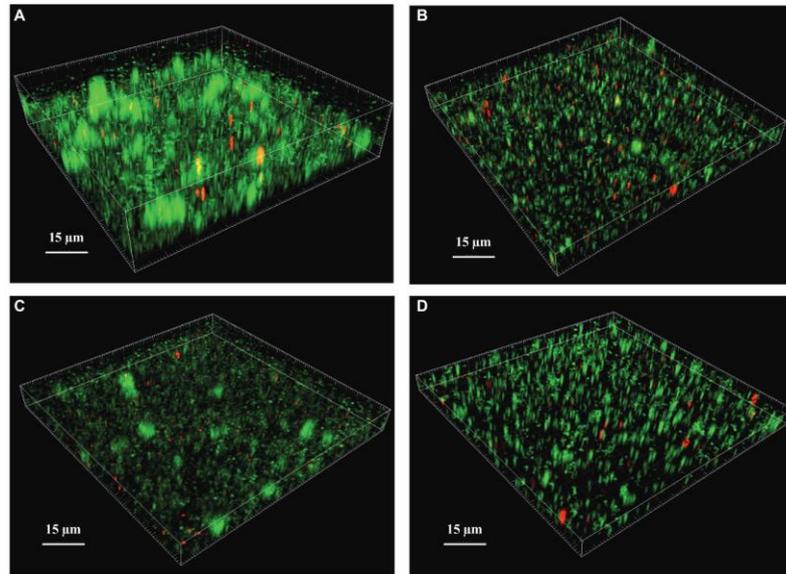
### 2.1.3. La régulation

Récemment, deux études françaises se sont intéressées à la description et la caractérisation de systèmes régulateurs de la production du biofilm chez *S. lugdunensis*, le système de QS *agr* (Aubourg *et al.*, 2022) et le TCS *LytSR* (Dahyot *et al.*, 2020).

Aubourg *et al.* ont construit un mutant *agrA* et ont analysé la production de biofilm par coloration au cristal violet et CLSM (Aubourg *et al.*, 2020). La souche mutante formait significativement moins de biofilm que la souche sauvage. Ainsi, contrairement à ce qui a été montré chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, *AgrA* serait un régulateur positif de la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*, et permettrait de former un biofilm plus dense. En effet, des analyses transcriptomiques et protéomiques révélèrent que chez le mutant *AgrA*, l'expression de *icaADBC*, *dltABCD* (codant pour une protéine impliquée dans la synthèse des acides teichoïques), *atlLE* et *fbl* n'était pas altérée, de même que la production des protéines correspondantes (Aubourg *et al.*, 2020).

Dahyot *et al.* ont quant à eux contribué à caractériser le rôle du TCS *LytSR* dans la formation de biofilm de *S. lugdunensis*. L'analyse comparative en CLSM d'un mutant *lytSR* et de la souche sauvage a montré que la biomasse du biofilm du mutant était moindre, que celui-ci présentait

moins de structures en tour et que le taux de cellules mortes était significativement plus élevé par rapport à la souche sauvage. *LytSR* est ainsi également un régulateur positif de la production de biofilm chez *S. lugdunensis*, potentiellement en lien avec la mort cellulaire dans le biofilm. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le niveau d'expression plus élevé de *cidC* chez le mutant *lytSR* (détecté par analyses transcriptomiques) pourrait expliquer en partie le taux plus élevé de cellules mortes observé dans le biofilm (Figure 36) (Dahyot *et al.*, 2020).



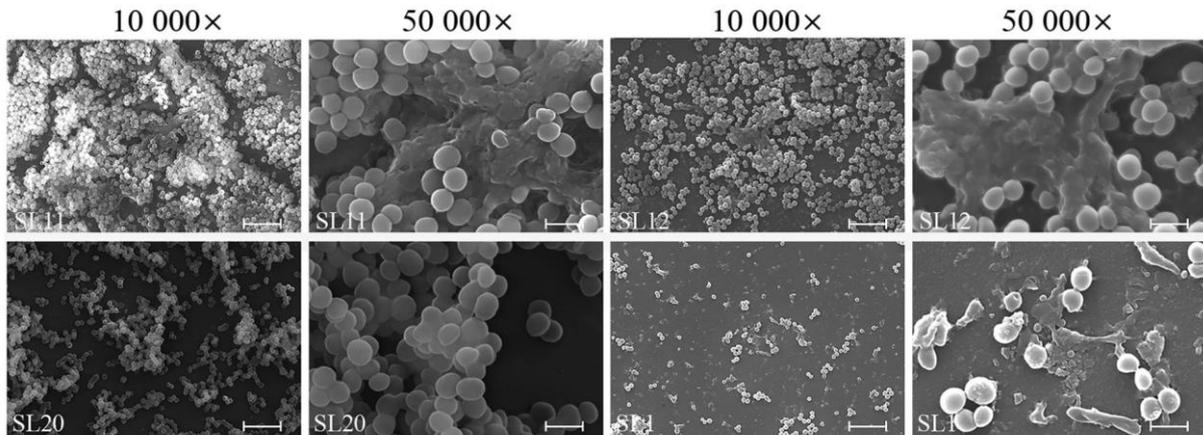
**Figure 36 : Analyse du biofilm de *S. lugdunensis* par CLSM (Dahyot *et al.*, 2020).**

Les biofilms matures de 24 h de (A) *S. lugdunensis* WT, (B)  $\Delta$ *lytSR*, (C)  $\Delta$ *lytSR* (*pCU1:lytSR*) et (D)  $\Delta$ *lytSR* (*pCU1*) ont été visualisés en CLSM après coloration Live/Dead. Les cellules vivantes colorées par le SYTO®9 apparaissent en vert, tandis que les cellules mortes colorées par l'iodure de propidium sont en rouge.

## 2.2. Facteurs influençant la formation de biofilm

Comme évoqué précédemment pour *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'influence de divers facteurs (glucose, pH, concentration en éthanol ou en fer et lignée phylogénétique) sur la formation de biofilm de *S. lugdunensis* a été étudiée.

L'étude de Qian *et al.* a montré que conformation du biofilm peut varier en fonction de l'origine clinique de l'isolat et si l'infection était sur matériel. Les degrés de porosité du biofilm différaient entre une souche isolée d'une sécrétion urétrale et une autre isolée d'un cathéter. Le premier était plat, rugueux et dispersé au contact de la surface tandis que le deuxième était filamenteux agrégé en grappes distinctes (Figure 37) (Qian *et al.* 2021).



**Figure 37 : Analyses par FESEM de biofilms de souches représentatives cultivées à la surface de lamelles de verre (Qian et al., 2021).**

Les souches étaient incubées pendant 24 h à 37 C dans du milieu TSB + 5% de glucose. SL11, fort producteur de biofilm ; SL12 (biofilm plat et rugueux) et SL20 (biofilm agrégé en grappe, producteur modéré de biofilm ; SL1, faible producteur de biofilm. Les barres d'échelle représentent 5  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$  pour les grossissements de 10 000 et 50 000, respectivement.

*In vitro*, la composition du milieu dans lequel la souche est cultivée peut influencer la capacité de formation de biofilm. Par exemple, les 24 souches cliniques de l'étude de Qian *et al.* formaient plus de biofilm en milieu trypticase soja (TSB) qu'en bouillon cœur cerveau (BHI) (Qian *et al.* 2021). Un milieu supplémenté en glucose (de 1 à 5 %) favorisait la production de biofilm des 24 souches (Qian *et al.* 2021). Cependant, l'étude de Tseng *et al.*, par des analyses de biofilm sur microplaque et coloration au crystal violet (comme dans l'étude précédente), ne montrait pas d'effet positif du glucose sur la formation de biofilm pour des concentrations comprises entre 0,5 et 4 % (Tseng *et al.* 2013). En conditions de stress (osmotique, acide ou en présence d'éthanol), la capacité de formation de biofilm de *S. lugdunensis* est réduite (Frank and Patel, 2007; Qian *et al.*, 2021). Cependant, cette tendance peut être souche dépendante. En effet, la formation de biofilm d'isolats de *S. lugdunensis* appartenant à *agr-I* (type d'*agr* déterminé par séquençage) était réduite lorsque le milieu contenait une concentration accrue de chlorure de sodium, alors que les isolats de type *agr-II* ne suivaient pas cette tendance (Tseng *et al.* 2013).

Des études se sont intéressées à un potentiel effet de la lignée phylogénétique sur la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*. Comme cela a été montré chez *S. aureus*, deux études suggèrent que la production de biofilm de *S. lugdunensis* pourrait différer selon le génotype des isolats (Naicker *et al.*, 2016; Tasse *et al.*, 2018). Ravaioli *et al.* ont montré dans leur collection de 22 souches cliniques de *S. lugdunensis* appartenant à 5 ribotypes que la quantité de biofilm variait

notablement au sein d'un même ribotype ; cependant, 67% des souches du génotype prédominant (ribotype cra-64-S-8) produisaient significativement plus de biofilm en microplaque (coloration au cristal violet) que les autres ribotypes (Ravaioli *et al.* 2020). Comparativement, chez les 23 souches cliniques de *S. lugdunensis* de l'étude monocentrique de Pereira *et al.* collectées de 1997 à 2008, les fortes productrices de biofilm avaient les mêmes profils PFGE. Cependant, la PFGE possédant un pouvoir discriminant plus faible que les méthodes de typages actuelles, les souches de cette étude classées avec le même profil pourraient différer avec des méthodes de typage plus récentes (Pereira *et al.* 2011).

Des molécules thérapeutiques peuvent également avoir un impact sur le biofilm. La nafcilline, un antibiotique de la famille des beta-lactamines, utilisée à concentrations subinhibitrices, favorise la production de biofilm (Frank *et al.* 2006). Un biocide utilisé pour ses propriétés désinfectantes, le métabisulfite de sodium, a lui démontré une activité inhibitrice de la production de biofilm (Frank *et al.* 2006). Enfin, Frank *et al.* se sont intéressés à l'influence sur le biofilm (étude en microplaque par coloration au cristal violet) chez quinze isolats cliniques de *S. lugdunensis* de catécholamines fréquemment administrées par voie intraveineuse (dopamine et dobutamine) et de l'héparine utilisée en tant que solution « verrou » antithrombotique de cathéters. Contrairement à ce qui a été montré chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Lyte *et al.* 2003, Shanks *et al.* 2005), la dopamine a stimulé la formation de biofilm pour les deux tiers des isolats (10/15), tandis que la dobutamine a inhibé l'adhésion au support en polystyrène de 87 % (13/15) des isolats de *S. lugdunensis*. L'héparine réduisait de manière significative la formation de biofilm de 87 % (13/15) des souches (Frank *et al.* 2007).

Finalement, de rares études portant sur un faible nombre de souches se sont intéressées au biofilm de *S. lugdunensis*. La capacité de formation de biofilm serait un mécanisme important associé notamment aux IOAs et infections sur matériel, pouvant avoir pour conséquences des adaptations dans la prise en charge de l'infection. Bien qu'il soit admis que la matrice du biofilm de *S. lugdunensis* est majoritairement protéique, sa composition en protéines n'a pas été caractérisée finement. De plus, seules deux études se sont intéressées aux systèmes régulateurs de la formation du biofilm. Ainsi, l'analyse de la capacité de formation de biofilm d'un grand nombre de souches de *S. lugdunensis* caractérisées avec des méthodes de typage actuelles apparaissent nécessaires, tout comme la caractérisation du protéome de la matrice du biofilm.

## Travaux personnels

### 1. Travail personnel : Etude de la sensibilité de *Staphylococcus lugdunensis* aux antiseptiques utilisés en milieu hospitalier

#### 1.1. Introduction et contexte de l'étude

*S. lugdunensis* est aujourd'hui reconnu comme une espèce dont le pouvoir pathogène est plus proche de celui de *S. aureus* que de celui des autres SCN (Xavier Argemi, Hansmann, *et al.*, 2017; Heilmann, Ziebuhr and Becker, 2018; Heilbronner and Foster, 2021). C'est un pathogène opportuniste capable de provoquer des infections potentiellement sévères, communautaires comme associées aux soins (Frank, del Pozo and Patel, 2008; Xavier Argemi, Hansmann, *et al.*, 2017).

Le développement de techniques de typage moléculaire, dont la MLST ainsi que le *fbl* typing, ont révélé une structure de population clonale, sans identifier de lignée phylogénétique associée aux infections invasives (Chassain *et al.*, 2012; Dahyot *et al.*, 2019). Depuis, les études épidémiologiques des infections liées à *S. lugdunensis* menées à l'échelon mondial ont montré que les souches isolées en milieu hospitalier sur plusieurs mois ou années, chez des patients sans lien épidémiologique, appartiennent principalement aux CC1 et CC3 (Cheng *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015; Yeh *et al.*, 2016; Dahyot *et al.*, 2018, 2019), et ce malgré l'utilisation de méthode de typage à fort pouvoir discriminant comme le *fbl*-typing (Dahyot *et al.*, 2019).

Une résistance aux antibiotiques ne peut expliquer l'émergence et l'expansion de ces CCs. En effet, en dehors de quelques clones asiatiques résistants à la méticilline (Yeh *et al.*, 2016), cette espèce reste actuellement très sensible aux antibiotiques (McHardy *et al.*, 2017; Taha, Stegger and Söderquist, 2019). Cependant, du fait de la large utilisation d'antiseptiques en milieu hospitalier dans la lutte contre les infections nosocomiales (Williamson, Carter and Howden, 2017), la prédominance des CC1 et CC3 pourrait être liée à une diminution de sensibilité ou une résistance aux antiseptiques (notamment au digluconate de chlorhexidine [CHX] et au chlorure de benzalkonium [BAC]), conduisant alors à une potentielle survie de ces souches dans l'environnement hospitalier et/ou sur la peau des patients.

La résistance, naturelle ou acquise, des staphylocoques aux antiseptiques est principalement médiée par des pompes d'efflux : NorA et QacA appartenant à la famille des MFS, et QacC,

QacG, QacH et QacJ appartenant à la famille des SMR. Ces pompes sont codées par le gène chromosomique *norA* chez *S. aureus*, et/ou par les gènes plasmidiques, *qacA*, *qacC*, *qacG*, *qacH* et *qacJ* (Wassenaar *et al.*, 2015; Lekshmi, 2018). Cette résistance est bien documentée chez *S. aureus* (Vali *et al.*, 2008), beaucoup moins étudiée chez les SCN, mais elle n'a pour ainsi dire jamais été investiguée chez *S. lugdunensis*.

Par conséquent, l'objectif de ce travail était d'étudier la prévalence de la résistance au CHX et au BAC chez 49 souches cliniques de *S. lugdunensis* représentatives des sept CCs connus à ce jour.

Pour cela, nous avons mis en œuvre des méthodes phénotypiques et moléculaires. La résistance phénotypique a été caractérisée par la détermination des CMI et CMB du CHX et du BAC par la méthode de microdilution en milieu liquide selon les recommandations du *Clinical Laboratory Standards Institute* ('Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07 11th Edition 2018', 2018). Par ailleurs, nous avons évalué par PCR la prévalence des principaux gènes de résistance *norA*, *qacA*, *qacC*, *qacG*, *qacH* et *qacJ*. Parallèlement, nous avons établi le profil de sensibilité aux antibiotiques de chacune de nos souches par diffusion en milieu gélosé (antibiogrammes) à la recherche de multi résistance pouvant expliquer la persistance d'une souche, ou d'éventuels phénomènes de résistance croisée aux antiseptiques et aux antibiotiques.

1.2. *Publication n°1 :*

**Impact of clonal lineages on susceptibility of *Staphylococcus lugdunensis* to  
chlorhexidine digluconate and chloride benzalkonium**

Laurie Destruel, Marine Lecomte, Maxime Grand, Martine Pestel-Caron, Sandrine Dahyot

Article soumis dans la revue *BMC microbiology* en mars 2023



1           **Impact of clonal lineages on susceptibility of *Staphylococcus lugdunensis* to**  
2                           **chlorhexidine digluconate and chloride benzalkonium**

3   Laurie Destruel<sup>1</sup>, Marine Lecomte<sup>1</sup>, Maxime Grand<sup>1</sup>, Martine Pestel-Caron<sup>2</sup>, Sandrine  
4   Dahyot<sup>2\*</sup>

5   <sup>1</sup> Univ Rouen Normandie, UNICAEN, INSERM, DYNAMICURE UMR 1311 F - 76000  
6   Rouen, France

7   <sup>2</sup> Univ Rouen Normandie, UNICAEN, INSERM, DYNAMICURE UMR 1311, CHU  
8   Rouen, Department of Bacteriology, F - 76000 Rouen, France

9   \*Corresponding author: sandrine.dahyot@chu-rouen.fr

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22 **Abstract**

23 **Background:** Little is known about susceptibility of *Staphylococcus lugdunensis* to  
24 antiseptics. The objective of this study was to evaluate, at the molecular and phenotypic  
25 level, the susceptibility of 49 clinical *S. lugdunensis* strains (belonging to the seven clonal  
26 complexes [CCs] defined by multilocus sequence typing) to two antiseptics frequently  
27 used in healthcare settings (chlorhexidine digluconate [CHX] and chloride benzalkonium  
28 [BAC]).

29 **Results:** The microdilution minimum inhibitory concentrations (MICs) varied for BAC  
30 from 0.25 mg/L to 8 mg/L (MIC<sub>50</sub> = 1 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 2 mg/L) and for CHX from 0.5  
31 mg/L to 2 mg/L (MIC<sub>50</sub> = 1 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 2 mg/L). The BAC and CHX minimum  
32 bactericidal concentrations (MBCs) varied from 2 mg/L to 8 mg/L (MBC<sub>50</sub> = 4 mg/L,  
33 MBC<sub>90</sub> = 8 mg/L) and from 2 mg/L to 4 mg/L (MBC<sub>50</sub> and MBC<sub>90</sub> = 4 mg/L),  
34 respectively. A reduced susceptibility to CHX (MIC = 2 mg/L) was observed for 12.2%  
35 of the strains and that to BAC (MIC ≥ 4 mg/L) for 4.1%. The *norA* resistance gene was  
36 detected in all the 49 isolates, whereas the *qacA* gene was rarely encountered (two strains;  
37 4.1%). The *qacC*, *qacG*, *qacH*, and *qacJ* genes were not detected. The two strains  
38 harboring the *qacA* gene had reduced susceptibility to both antiseptics and belonged to  
39 CC3.

40 **Conclusion:** The *norA* gene was detected in all the strains, suggesting that it could belong  
41 to the core genome of *S. lugdunensis*. *S. lugdunensis* is highly susceptible to both  
42 antiseptics tested. Reduced susceptibility to BAC and CHX was a rare phenomenon. Of  
43 note, a tendency to higher MICs of BAC was detected for CC3 isolates. These results  
44 should be confirmed on a larger collection of strains.

45

## 46 **Keywords**

47 *Staphylococcus lugdunensis*, chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride,  
48 resistance, antiseptics, MIC/MBC values, *qac*, *norA*

49

## 50 **Background**

51 *S. lugdunensis* is a particularly virulent species of coagulase-negative *Staphylococcus*  
52 (CoNS) (1). This microorganism is a skin commensal but is also an opportunistic  
53 pathogen able to cause potentially severe community-acquired infections as well as  
54 healthcare-associated infections (2,3).

55 Several molecular typing methods, including multilocus sequence typing (MLST) and  
56 *fbI*-typing, revealed a clonal population structure, with no phylogenetic lineage associated  
57 with invasive infections (4,5). To date, seven clonal complexes (CCs) have been  
58 described (<http://bigsdB.web.pasteur.fr/staphlugdunensis/>). Strains isolated worldwide  
59 from hospitalized patients mainly belong to CC1 and CC3 (6–8). Even if some methicillin  
60 resistant clones are circulating in Asia (8–10), this species currently remains highly  
61 sensitive to antibiotics (3). Predominance of some CCs could then be explained by the  
62 low genetic diversity of the species (11) or by an increased ability of these CCs to survive  
63 in the hospital environment by biofilm formation (1) and/or resistance to antiseptics.

64 Two antiseptics, chlorhexidine digluconate (CHX) and benzalkonium chloride (BAC),  
65 are widely used in health care settings including skin and wound antiseptics (12,13).  
66 Antiseptic resistance of *Staphylococcus aureus* and CoNS is mediated by efflux pumps:  
67 NorA and QacA belonging to the major facilitator superfamily, and QacC, QacG, QacH  
68 and QacJ belonging to the multidrug resistant transporter family (14–16). This resistance

69 is phenotypically characterized by high minimum inhibitory concentrations (MICs) to  
70 antiseptics, even if there is no consensual definition (17,18). Antiseptic resistance can be  
71 associated with the presence of resistance genes, which can belong to the core genome  
72 such as the *norA* gene in *S. aureus* (19), or be encoded by a plasmid like *qac* genes,  
73 identified in *S. aureus* and various species of CoNS (14).

74 So far, little is known about *S. lugdunensis* resistance to antiseptics (20,21). Therefore,  
75 the aim of this study was to investigate the prevalence of resistance to the widely used  
76 antiseptics BAC and CHX by using both phenotypic and genotypic methods, in a  
77 collection of *S. lugdunensis* clinical isolates representing the seven CCs described to date.

## 78 **Results**

### 79 **Antimicrobial susceptibility**

80 The antibiotic susceptibility results of the 49 *S. lugdunensis* strains are shown in Table 1.  
81 Eleven strains (22.4 %) were resistant to penicillin G. The rate of strains resistant to  
82 kanamycin, tobramycin, fusidic acid and tetracyclin was 4.1 % (2/49 strains) and that of  
83 strains resistant to gentamicin, erythromycin and clindamycin was 2 % (1/49 strains). One  
84 strain (2 %) was resistant to methicillin (methicillin-resistant *S. lugdunensis*, MRSL).  
85 This strain was multidrug resistant and belonged to CC3.

86

87

88

89

90

91 **Table 1.** Antibiotic susceptibility testing for the 49 *S. lugdunensis* strains

<b>Antibiotic</b> (49 strains)	<b>Susceptible</b> No. (%)	<b>Resistant</b> No. (%)
penicillin G	38 (77.6)	11 (22.4)
kanamycin	47 (95.9)	2 (4.1)
tobramycin	47 (95.9)	2 (4.1)
gentamicin	48 (98)	1 (2)
erythromycin	48 (98)	1 (2)
clindamycin	48 (98)	1 (2)
quinupristin/ dalfopristin	49 (100)	0 (0)
cefoxitin	48 (98)	1 (2)
norfloxacin	49 (100)	0 (0)
trimethoprim/ sulphamethoxazole	49 (100)	0 (0)
fusidic acid	47 (95.9)	2 (4.1)
rifampicin	49 (100)	0 (0)
levofloxacin	49 (100)	0 (0)
tetracyclin	47 (95.9)	2 (4.1)
minocyclin	49 (100)	0 (0)
linezolid	49 (100)	0 (0)

92

93 **Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration**  
 94 **determination**

95 The MICs of CHX ranged from 0.5 to 2 mg/L and those of BAC from 0.25 to 8 mg/L  
 96 (Table 2). The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 1 mg/L and 2 mg/L respectively, for both CHX  
 97 and BAC. Reduced susceptibility to CHX and BAC was observed for 12.2% (6/49) and  
 98 4.1% (2/49) of strains, respectively.

99

100

101

102

103

104 **Table 2.** Susceptibility testing of the 49 *S. lugdunensis* strains to CHX and BAC

Antiseptic resistance genes in strains (n=49)	CHX MIC (mg/L)			BAC MIC (mg/L)					
	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2	4	8
<i>norA</i> (n=49)	1	46	<b>6</b>	2	3	24	18	<b>1</b>	<b>1</b>
<i>qacA</i> (n=2)	0	0	<b>2*</b>	0	0	0	0	<b>1*</b>	<b>1*</b>
<i>qacC/qacG/qacH/qacJ</i> (n=0)	0	0	<b>0</b>	0	0	0	0	<b>0</b>	<b>0</b>

105 CHX, chlorhexidine digluconate; BAC, benzalkonium chloride; \*Clonal complex 3

106 Strains with a reduced susceptibility are in bold text.

107

108 The minimum bactericidal concentrations (MBCs) ranged from 2 to 4 mg/L and 2 to 8

109 mg/L for CHX and BAC, respectively. The MBC<sub>50</sub> and MBC<sub>90</sub> of CHX were 4 mg/L.

110 The MBC<sub>50</sub> and MBC<sub>90</sub> of BAC were 4 mg/L and 8 mg/L, respectively.

111 MIC and MBC distribution of CHX and BAC according to the CC is shown in Table 3.

112 BAC MICs tended to vary according to the CC of the strains. The BAC MICs of the CC5

113 and singleton (belonging to any of the CC described) strains (mean of 0.55 mg/L and 0.81

114 mg/L, respectively) appeared to be lower than those of the other CCs. On the contrary,

115 strains belonging to CC3 had the highest MICs (mean of 2.18 mg/L). No noticeable trend

116 was highlighted regarding the MBC distributions of either CHX or BAC.

117

118

119

120

121

122

123

124 **Table 3.** MIC and MBC values of CHX and BAC according to the CC

Clonal Complex (n=49 strains)	CHX				BAC			
	MIC range (mg/L)	MIC mean (mg/L) (SEM)	MBC range (mg/L)	MBC mean (mg/L) (SEM)	MIC range (mg/L)	MIC mean (mg/L) (SEM)	MBC range (mg/L)	MBC mean (mg/L) (SEM)
1 (n=11)	1-2	1.27 (0.14)	2-4	0.82 (0.30)	1-2	1.45 (0.16)	2-4	3.82 (0.18)
2 (n=5)	1	1.00 (0)	2-4	3.60 (0.40)	1-2	1.60 (0.24)	2-4	3.60 (0.40)
3 (n=11)	1-2	1.18 (0.12)	2-4	2.91 (0.31)	1-8	2.18 (0.64)	4-8	5.09 (0.56)
4 (n=4)	1	1.00 (0)	2-4	3.00 (0.58)	1-2	1.50 (0.29)	4-8	5.00 (1.00)
5 (n=5)	1-2	1.20 (0.2)	2-4	2.80 (0.49)	0.25-1	0.55 (0.12)	2-4	3.60 (0.40)
6 (n=5)	1	1.00 (0)	2-4	3.20 (0.49)	1-2	1.60 (0.24)	4-8	5.6 (0.98)
7 (n=4)	1	1.00 (0)	2-4	3.50 (0.50)	1-2	1.50 (0.29)	4-8	5 (1.00)
singleton ST (n=4)	0.5-1	0.88 (0.13)	2-4	3.00 (0.58)	0.25-1	0.81 (0.19)	4	4 (0)

125 BAC, benzalkonium chloride; CHX chlorhexidine digluconate

126

127 **Detection of *norA* and *qac* genes**

128 The *norA* gene was detected in all *S. lugdunensis* strains (Table 2). Two strains were  
 129 positive for the *qacA* gene. Interestingly, these two strains had decreased susceptibility to  
 130 both antiseptics (CHX and BAC) (Table 2) and belonged to CC3. The *qacC*, *qacG*, *qacH*  
 131 and *qacJ* genes were not detected.

132

133 **Discussion**

134 *S. lugdunensis* is recognized as a virulent species of CoNS responsible for severe  
 135 infections. In hospital settings, predominant clones (CC1 and CC3) have been described  
 136 (5,6,8), suggesting a potential adaptation to this environment. With the widespread use of  
 137 antiseptics in healthcare facilities, there are concerns about antiseptic tolerance and  
 138 resistance (17). However, little is known about *S. lugdunensis* susceptibility to antiseptics.

139 Only two previous studies on antiseptic susceptibility have included a small number of *S.*  
140 *lugdunensis* strains: four in Sommer *et al.*'s work (22) and eight in the study of Addetia  
141 *et al.* (20). Our study is the first to investigate the antiseptic susceptibility of such a large  
142 collection of *S. lugdunensis* strains from different clinical settings and geographical  
143 origins and representing the seven CCs described to date. Resistance was assessed by  
144 determining MIC and MBC by broth microdilution for the two commonly used antiseptics  
145 CHX and BAC. Standardized methods to determine MIC/MBC and consensus to define  
146 antiseptic resistance are missing (23). Therefore, we applied protocols and MIC  
147 breakpoints widely used in literature for *Staphylococcus spp.* and defined reduced  
148 susceptibility to CHX and BAC when MIC >1.5 mg/L and > 3 mg/L, respectively (18).  
149 In our study, lower BAC MICs were observed (0.25 mg/L to 8 mg/L) compared to  
150 previous studies using broth microdilution. Indeed, they have shown that BAC MICs for  
151 clinical CoNS strains and *S. aureus* varied similarly between 0.25 mg/L and 64 mg/L (24–  
152 28). The only two *S. lugdunensis* strains with reduced susceptibility to BAC in our study  
153 belonged to the CC3. In contrast, the CC5 and singleton ST strains tended to have lower  
154 MICs, suggesting a possible association between clonal lineage and BAC susceptibility.  
155 This phenomenon was previously described for *S. aureus*; strains belonging to the major  
156 human lineages CC22 and CC5 had significantly higher CHX MIC values than the main  
157 animal lineage ST398 (29).  
158 *S. lugdunensis* strains exhibited here low CHX MICs (MIC<sub>90</sub> = 2 mg/L) with a narrow  
159 value distribution, similar to that obtained by Addetia *et al.* for eight *S. lugdunensis* strains  
160 (CHX MICs determined by broth microdilution ranging from 0.5 to 1 mg/L) (20). In  
161 contrast, in literature, CHX MICs vary from 0.125 mg/L to 32 mg/L for other CoNS  
162 species (20,24,25,28,30), and from 0.25 mg/L to 8 mg/L for *S. aureus* (24,25).

163 The CHX and BAC MBC determined here were close to MIC values, and remained much  
164 below the antiseptic concentration used in practice. Considering the epidemiological cut-  
165 off values (ECOFFs) defined for *S. aureus* by Morissey *et al.* (i.e. MIC = 8 mg/L and  
166 MBC > 64 mg/L for CHX, and MIC = 16 mg/L and MBC = 32 mg/L for BAC), all the  
167 49 *S. lugdunensis* strains tested would be considered as wild-type (31).

168 In addition, resistance to CHX and BAC was assessed by a genotypic method. The *norA*  
169 gene was detected in all strains of our collection, suggesting that it belongs to the core  
170 genome of *S. lugdunensis*. Similarly, Costa *et al.* showed that *norA* is part of the core  
171 genome of *S. aureus*, but exists as multiple alleles (19). Increased antiseptic resistance of  
172 *S. aureus* strains has been associated with NorA-mediated efflux via the overexpression  
173 of the *norA* gene (32,33). Thus, it would be interesting to compare *norA* expression levels  
174 of the strains in our collection.

175 On the contrary, the prevalence of the *qacA* gene was low (4.1%) in this study. This result  
176 contrasts with the variations of the *qacA* prevalence previously described for CoNS  
177 (42.4% to 62.4%) (24,25,34) and for *S. aureus* (from 10.5% to 21.8% for methicillin-  
178 susceptible strains and from 8,3% to 83.3% for methicillin-resistant strains)  
179 (18,24,25,34–36). Here, the *qacC*, *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes were not detected. The  
180 prevalence of these genes in other CoNS species and in *S. aureus* varies greatly between  
181 studies (0% to 44.2% of isolates) (18,24,34–36). The low prevalence of these plasmid-  
182 encoded *qac* genes observed for *S. lugdunensis* could be explained by the multiple  
183 barriers of this species genome that prevent horizontal gene transfer by mobile genetic  
184 elements (11).

185 Interestingly, the two *S. lugdunensis* strains positive for the *qacA* resistance gene had  
186 reduced susceptibility for both CHX and BAC. This could suggest a relationship between  
187 *qac* genes and reduced susceptibility to antiseptics, as demonstrated in several studies for

188 *S. aureus* and CoNs (20,22–24). Whole genome studies of *S. lugdunensis* strains with  
189 reduced susceptibility to antiseptics could lead to identify mechanisms contributing to a  
190 reduced susceptibility to antiseptics in this species.

191 Cross-resistance to antibiotics and antiseptics remains controversial. Some studies have  
192 reported cross-resistance between CHX and antibiotics (e.g. ceftazidime, penicillin,  
193 ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, clindamycin, tetracyclin), especially for  
194 *S. epidermidis*, *S. warneri* and *S. aureus* (25,37,38). The only MRSL strain in our study  
195 showed reduced susceptibility to both CHX and BAC. MRSL, more prevalent in Asia  
196 (9,10,39), could represent a major health issue worldwide. Analysis of a larger number of  
197 MRSL strains would therefore be necessary to track such a putative link between  
198 methicillin resistance and reduced susceptibility to antiseptics.

199

## 200 **Conclusions**

201 This study conducted on a large collection of strains shows that, unlike other CoNS, *S.*  
202 *lugdunensis* is highly susceptible to CHX and BAC. However, the first description of a  
203 reduced susceptibility to these antiseptics in two CC3 strains, highlights a potential risk  
204 for infection control in healthcare settings.

205

## 206 **Materials and methods**

### 207 **Bacterial strains**

208 Forty-nine clinical strains of *S. lugdunensis* isolated from 49 patients were included in  
209 this study [see Additional file 1]. They were recovered from carriage ( $n = 12$ ) or infections  
210 ( $n = 35$ ) (clinical context unknown for two strains) and collected in seven French regions  
211 (Strasbourg, Rouen, Tours, Nancy, Montpellier, Nantes, Bordeaux) and Sweden (one

212 strain from Kronoberg) between 2013 and 2016. All 49 strains were identified by matrix-  
213 assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry  
214 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Strains were previously characterized by  
215 MLST and/or *fbl*-typing (5). Forty-five strains belonged to the 7 CCs described (11 CC1,  
216 5 CC2, 11 CC3, 4 CC4, 5 CC5, 5 CC6, and 4 CC7) and 4 were singleton STs (1 ST13  
217 and 2 ST28).

218 *S. aureus* ATCC 25923 was used as a quality control strain for all the susceptibility tests  
219 (20).

220

### 221 **Antibiotic susceptibility testing**

222 Antimicrobial susceptibility was assessed by the disk diffusion method on Mueller-  
223 Hinton agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the European  
224 Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendations ([https://www.  
225 eucast.org/](https://www.eucast.org/)). The following antibiotic disks were tested: penicillin G (1 µg), kanamycin  
226 (30 µg), tobramycin (10 µg), gentamicin (10 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2  
227 µg), quinupristin/dalfopristin (15 µg), cefoxitin (30 µg), norfloxacin (10 µg),  
228 trimethoprim/sulphamethoxazole (25 µg), fusidic acid (10 µg), rifampicin (5 µg),  
229 levofloxacin (5 µg), tetracyclin (30 µg), minocyclin (30 µg), and linezolid (10 µg) (I2A,  
230 Montpellier, France).

231

### 232 **Minimum inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration** 233 **determination**

234 The MIC of CHX (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and BAC (Sigma, Saint Louis,  
235 USA) was determined by broth microdilution method according to the Clinical and

236 Laboratory Standards Institute guidelines (40). The concentration range tested for CHX  
237 and BAC varied from 0.25 mg/L to 128 mg/L. Strains with MIC below or equal to 1 mg/L  
238 were categorized susceptible to CHX ; reduced susceptibility was defined for strains with  
239 MIC between 1.5 mg/L and 3 mg/L. Strains with MIC below 3 mg/L were considered  
240 susceptible to BAC (18).

241 For MBC determination, 10 µL of the suspension in MIC wells without visible microbial  
242 growth were subcultured onto Mueller-Hinton agar and incubated at 37°C for 24h. The  
243 MBC was noted as the lowest antiseptic concentration for which no growth was observed  
244 (33).

245 All MIC and MBC experiments were carried out in triplicate. MIC and MBC obtained  
246 twice were recorded as the final values.

247

#### 248 **Molecular detection of antiseptic resistance genes**

249 DNA extraction was performed using the InstaGene™ Matrix kit (Bio-Rad), according  
250 to the manufacturer's recommendations. Each strain's DNA was screened by PCR for the  
251 presence of *norA*, *qacA*, *qacC*, *qacG*, *qacH*, and *qacJ* genes using primers presented in  
252 Table 4 (41). PCR reaction was composed of 0.25 µL (0.50 µM) of each primer, 12.5 µL  
253 of Go Taq® G2 Green Master Mix, 5 µL of DNA and 7 µL of sterile water, for a final  
254 volume of 25 µL. PCRs were performed, using a Veriti Thermal Cycler (Applied  
255 Biosystems, Foster City, CA, USA), as follows: initial denaturation step at 94 °C for 3  
256 min, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and final extension  
257 step at 72 °C for 5 min. PCR products were visualized under UV after migration for 45  
258 minutes at 110 V on 1.5% gel containing 0.005 mg/L ethidium bromide.

259

260 **Table 4.** List of PCR primers

Primer	Target gene	Primer Sequence (5'-3')	Product size (pb)	Reference
norA1_F norA1_R	<i>norA</i>	TTTGTCACGCTTATCATTTC CCCGTCTGTTGTTTGTG	291	This study
norA2_F norA2_R	<i>norA</i>	TGCGATTGTGGGTGGAGG TCCAATAACCGTTTGCCAAGA	155	This study
qacA_F qacA_R	<i>qacA</i>	GCAGAAAGTGCAGAGTTCG CCAGTCCAATCATGCCTG	361	Noguchi <i>et al.</i> 1999
qacC_F qacC_R	<i>qacC</i>	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	195	Noguchi <i>et al.</i> 1999
qacG_F qacG_R	<i>qacG</i>	CAACAGAAATAATCGGAACT TACATTTAAGAGCACTACA	275	Ignak <i>et al.</i> 2017
qacH_F qacH_R	<i>qacH</i>	ATAGTCAGTGAAGTAATAG AGTGTGATGATCCGAATGT	295	Ignak <i>et al.</i> 2017
qacJ_F qacJ_R	<i>qacJ</i>	CTTATATTTAGTAATAGCG GATCCAAAAACGTTAAGA	306	Ignak <i>et al.</i> 2017

261

## 262 **Abbreviations**

263 BAC: Benzalkonium chloride; CC: clonal complex; CHX: Chlorhexidine digluconate;  
 264 CoNS: coagulase negative *Staphylococcus*; DNA: desoxyribonucleic acid; ECOFF:  
 265 epidemiological cut-off; MBC: minimum bactericidal concentration; MIC: minimum  
 266 inhibitory concentration; MLST: multilocus sequence typing; PCR: polymerase chain  
 267 reaction; QAC: quaternary ammonium compound; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*;  
 268 SLRM: *Staphylococcus lugdunensis* methicillin resistant.

269

## 270 **Declarations**

### 271 **Ethics approval and consent to participate**

272 Not applicable

### 273 **Consent for publication**

274 Not applicable

275 **Availability of data and materials**

276 All data of this study are included in this article [and in its supplementary information  
277 file]

278 **Competing interests**

279 The authors declare no conflict of interest

280 **Funding**

281 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the commercial  
282 or not-for-profit sectors.

283 **Authors' contributions**

284 LD, SD and MPC designed the study. LD and ML performed the experiments. LD, ML,  
285 MG, SD, MPC participated in analyzing and interpreting the results. LD, SD, MG, MPC  
286 wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

287 **Acknowledgments**

288 We thank X. Argemi, L. Bieber, V. Dubois, H. Marchandin, F. Mory, G. Prévost, A.  
289 Reynaud and N. van der Mee-Marquet for kindly supplying strains.

290

291 **References**

292 1. Argemi X, Hansmann Y, Riegel P, Prévost G. Is *Staphylococcus lugdunensis*  
293 Significant in Clinical Samples? Kraft CS, éditeur. J Clin Microbiol. nov  
294 2017;55(11):3167-3174.

295 2. Frank KL, del Pozo JL, Patel R. From Clinical Microbiology to Infection  
296 Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*. Clin  
297 Microbiol Rev. janv 2008;21(1):111-33.

- 298 3. Heilbronner S, Foster TJ. *Staphylococcus lugdunensis*: a Skin Commensal with  
299 Invasive Pathogenic Potential. Clin Microbiol Rev. 2021;34(2): e00205-20.
- 300 4. Chassain B, Lemée L, Didi J, Thiberge JM, Brisse S, Pons JL, *et al.* Multilocus  
301 Sequence Typing Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Implies a Clonal Population  
302 Structure. J Clin Microbiol. sept 2012;50(9):3003-9.
- 303 5. Dahyot S, Lebeurre J, Laumay F, Argemi X, Dubos C, Lemée L, *et al.* *fbl*-Typing  
304 of *Staphylococcus lugdunensis*: A Frontline Tool for Epidemiological Studies, but Not  
305 Predictive of Fibrinogen Binding Ability. Front Microbiol. 17 mai 2019;10:1109.
- 306 6. Dahyot S, Lebeurre J, Argemi X, François P, Lemée L, Prévost G, *et al.* Multiple-  
307 Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat  
308 Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*. Sci  
309 Rep. déc 2018;8(1):11669.
- 310 7. Kosecka-Strojek M, Wolska-Gębarzewska M, Podbielska-Kubera A, Samet A,  
311 Krawczyk B, Międzobrodzki J, *et al.* May *Staphylococcus lugdunensis* Be an Etiological  
312 Factor of Chronic Maxillary Sinuses Infection? Int J Mol Sci. 2022;23(12):6450.
- 313 8. Yeh CF, Chang SC, Cheng CW, Lin JF, Liu TP, Lu JJ. Clinical Features,  
314 Outcomes, and Molecular Characteristics of Community- and Health Care-Associated  
315 *Staphylococcus lugdunensis* Infections. Patel R, éditeur. J Clin Microbiol. août  
316 2016;54(8):2051-7.
- 317 9. Tan TY, Ng SY, He J. Microbiological Characteristics, Presumptive  
318 Identification, and Antibiotic Susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin  
319 Microbiol. juill 2008;46(7):2393-5.
- 320 10. Ho PL, Leung SMH, Chow KH, Tse CWS, Cheng VCC, Tse H, *et al.* Carriage  
321 niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-  
322 resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy.  
323 Diagn Microbiol Infect Dis. févr 2015;81(2):141-4.
- 324 11. Argemi X, Matelska D, Ginalski K, Riegel P, Hansmann Y, Bloom J, *et al.*  
325 Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-  
326 genome and multiple barriers to horizontal gene transfer. BMC Genomics. déc  
327 2018;19(1):621.
- 328 12. Williamson DA, Carter GP, Howden BP. Current and Emerging Topical  
329 Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns. Clin Microbiol  
330 Rev. juill 2017;30(3):827-860.
- 331 13. Merchel Piovesan Pereira B, Tagkopoulos I. Benzalkonium Chlorides: Uses,  
332 Regulatory Status, and Microbial Resistance. Vieille C, éditeur. Appl Environ Microbiol.  
333 juill 2019;85(13):e00377-19.
- 334 14. Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic  
335 analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in  
336 *Staphylococcus* species. Eur J Microbiol Immunol. 2015;5(1):44-61.
- 337 15. Lekshmi M. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator

- 338 superfamily in *Staphylococcus aureus*. AIMS Microbiol. 2018;4(1):1-18.
- 339 16. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 1  
340 juill 2005;56(1):20-51.
- 341 17. Van den Poel B, Saegeman V, Schuermans A. Increasing usage of chlorhexidine  
342 in health care settings: blessing or curse? A narrative review of the risk of chlorhexidine  
343 resistance and the implications for infection prevention and control. Eur J Clin  
344 Microbiol Infect Dis. mars 2022;41(3):349-62.
- 345 18. Shamsudin MN, Alreshidi MA, Hamat RA, Alshrari AS, Atshan SS, Neela V.  
346 High prevalence of *qacA/B* carriage among clinical isolates of meticillin-resistant  
347 *Staphylococcus aureus* in Malaysia. J Hosp Infect. 2012;81(3):206-8.
- 348 19. Costa SS, Sobkowiak B, Parreira R, Edgeworth JD, Viveiros M, Clark TG, *et al*.  
349 Genetic Diversity of *norA*, Coding for a Main Efflux Pump of *Staphylococcus aureus*.  
350 Front Genet. 9 janv 2019;9:710.
- 351 20. Addetia A, Greninger AL, Adler A, Yuan S, Makhsous N, Qin X, *et al*. A Novel,  
352 Widespread *qacA* Allele Results in Reduced Chlorhexidine Susceptibility in  
353 *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother. juin 2019;63(6):e02607-18.
- 354 21. Fleurette J, Bès M, Brun Y, Freney J, Forey F, Coulet M, Reverdy ME, Etienne J.  
355 Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological  
356 characteristics and susceptibility to antimicrobial agents. Res. Microbiol.  
357 1989;140(2):107-18.
- 358 22. Sommer LM, Krauss J, Hultén KG, Dunn J, Kaplan SL, McNeil JC. The  
359 Prevalence of Antiseptic Tolerance Genes Among Staphylococci and Enterococci in a  
360 Pediatric Population. Infect Control Hosp Epidemiol. mar 2019;40(3):333-340.
- 361 23. Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in  
362 staphylococci: is it increasing and does it matter? J Antimicrob Chemother. 1 nov  
363 2012;67(11):2547-59.
- 364 24. Taheri N, Ardebili A, Amouzandeh-Nobaveh A, Ghaznavi-Rad E. Frequency of  
365 Antiseptic Resistance Among *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative  
366 Staphylococci Isolated From a University Hospital in Central Iran. Oman Med J. 1 nov  
367 2016;31(6):426-432.
- 368 25. Zhang M, O'Donoghue MM, Ito T, Hiramatsu K, Boost MV. Prevalence of  
369 antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative  
370 staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. J Hosp Infect.  
371 juin 2011;78(2):113-7.
- 372 26. Kampf G. Adaptive microbial response to low level benzalkonium chloride  
373 exposure. J Hosp Infect. 2018 Nov;100(3):e1-e22.
- 374 27. Correa JE, Paulis AD, Predari S, Sordelli DO, Jeric PE. First report of *qacG*, *qacH*  
375 and *qacJ* genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates. J Antimicrob  
376 Chemother. nov 2008;62(5):956-60.

- 377 28. Lepointeur M, Royer G, Bourrel AS, Romain O, Duport C, Doucet-Populaire F,  
378 Decousser JW. Prevalence of resistance to antiseptics and mupirocin among invasive  
379 coagulase-negative staphylococci from very preterm neonates in NICU: the creeping  
380 threat? *J Hosp Infect.* 2013;83(4):333-6.
- 381 29. Kernberger-Fischer IA, Krischek C, Strommenger B, Fiegen U, Beyerbach M,  
382 Kreienbrock L, *et al.* Susceptibility of Methicillin-Resistant and -Susceptible  
383 *Staphylococcus aureus* Isolates of Various Clonal Lineages from Germany to Eight  
384 Biocides. Dudley EG, éditeur. *Appl Environ Microbiol.* juill 2018;84(13):e00799-18.
- 385 30. Duran N, Temiz M, Duran GG, Eryilmaz N, Jenedi K. Relationship between the  
386 resistance genes to quaternary ammonium compounds and antibiotic resistance in  
387 staphylococci isolated from surgical site infections. *Med Sci Monit.* avr 2014 2;20:544-  
388 50.
- 389 31. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, *et al.*  
390 Evaluation of Epidemiological Cut-Off Values Indicates that Biocide Resistant  
391 Subpopulations Are Uncommon in Natural Isolates of Clinically-Relevant  
392 Microorganisms. *PLOS ONE.* 2014;9(1):10.
- 393 32. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug Efflux Pumps in  
394 *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J.* 22 mars 2013;7(1):59-71.
- 395 33. LaBreck PT, Bochi-Layec AC, Stanbro J, Dabbah-Krancher G, Simons MP,  
396 Merrell DS. Systematic Analysis of Efflux Pump-Mediated Antiseptic Resistance in  
397 *Staphylococcus aureus* Suggests a Need for Greater Antiseptic Stewardship. Dunman P,  
398 éditeur. *mSphere.* 26 févr 2020;5(1):e00959-19.
- 399 34. Ignak S, Nakipoglu Y, Gurler B. Frequency of antiseptic resistance genes in  
400 clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey. *Antimicrob Resist Infect Control.*  
401 déc 2017;6(1):88.
- 402 35. Vali L, Davies SE, Lai LLG, Dave J, Amyes SGB. Frequency of biocide resistance  
403 genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical  
404 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 4 févr  
405 2008;61(3):524-32.
- 406 36. Mayer S, Boos M, Beyer A, Fluit AC, Schmitz FJ. Distribution of the antiseptic  
407 resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible  
408 European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1 juin  
409 2001;47(6):896-7.
- 410 37. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an  
411 ‘antiseptic stewardship’ initiative? *J Hosp Infect.* nov 2016;94(3):213-227.
- 412 38. El Sayed Zaki M, Bastawy S, Montasser K. Molecular study of resistance of  
413 *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *J Glob*  
414 *Antimicrob Resist.* juin 2019;17:94-97.
- 415 39. Chang SC, Lin LC, Lu JJ. Comparative Genomic Analyses Reveal Potential  
416 Factors Responsible for the ST6 Oxacillin-Resistant *Staphylococcus lugdunensis*  
417 Endemic in a Hospital. *Front Microbiol.* 25 nov 2021;12:765437.

- 418 40. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial  
419 Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07 11th Edition 2018.
- 420 41. Noguchi N, Hase M, Kitta M, Sasatsu M, Deguchi K, Kono M. Antiseptic  
421 susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant  
422 *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. mars 1999;172(2):247-53.
- 423

## Additional files

**Additional file 1.** Characteristics of the 49 clinical strains of *S. lugdunensis* studied

Strain	Clonal complex CC	Sequence typing (ST)	City	Clinical sources / sampling	Community- acquired infection (C)/Nosocomial infection (N)	Date of collection	Resistance genes	CHX		BAC	
								MIC	MBC	MIC	MBC
57FJM	1	1	Strasbourg	Infection	N	2015.06.03	<i>norA</i>	1	4	2	4
<b>SL_29</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>Rouen</b>	<b>Infection</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<i>norA</i>	<b>2</b>	4	2	4
SL_122	1	1	Tours	Carriage	ND	ND	<i>norA</i>	1	2	2	4
37BH	1	1	Strasbourg	Infection	C	2014.12.04	<i>norA</i>	1	2	1	4
SL_117	1	1	Kronoberg	Carriage	ND	ND	<i>norA</i>	1	2	2	4
<b>07SM</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>Strasbourg</b>	<b>Infection</b>	<b>N</b>	<b>2014.02.24</b>	<i>norA</i>	<b>2</b>	4	1	4
33RM	1	6	Strasbourg	Infection	N	2014.11.03	<i>norA</i>	1	2	1	4
SL_13	1	6	Rouen	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	2	4
<b>SL_74</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>Nancy</b>	<b>Infection</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<i>norA</i>	<b>2</b>	2	1	4
C60	1	12	Strasbourg	Carriage	N	2014.11.27	<i>norA</i>	1	2	1	4
27BC	1	12	Strasbourg	Infection	C	2014.10.15	<i>norA</i>	1	2	1	2
74KR	2	2	Strasbourg	Infection	C	2015.10.23	<i>norA</i>	1	4	1	4
SL_85	2	2	Montpellier	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	2	4
SL_56	2	14	Nantes	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	2	4
SL_73	2	19	Nancy	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	2	2	2
64865028	2	ND	Rouen	Carriage	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	1	4
<b>C47</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>Strasbourg</b>	<b>Carriage</b>	<b>N</b>	<b>2014.10.07</b>	<i>norA/qacA</i>	<b>2</b>	4	<b>4</b>	8
C85	3	3	Strasbourg	Carriage	C	2015.06.15	<i>norA</i>	1	4	1	4
50SD	3	3	Strasbourg	Infection	C	2015.04.02	<i>norA</i>	1	2	1	4
31FE	3	3	Strasbourg	Infection	C	2014.11.15	<i>norA</i>	1	4	1	4
C08	3	3	Strasbourg	Carriage	C	2013.11.05	<i>norA</i>	1	4	2	4

C27	3	3	Strasbourg	Carriage	N	2014.01.22	<i>norA</i>	1	2	2	8
03MC	3	3	Strasbourg	Infection	N	2013.12.28	<i>norA</i>	1	2	1	4
04SZ	3	3	Strasbourg	Infection	N	2013.11.14	<i>norA</i>	1	2	1	4
76LE	3	3	Strasbourg	Infection	N	2015.11.09	<i>norA</i>	1	4	1	4
16060354	3	ND	Rouen	Carriage	ND	ND	<i>norA</i>	1	2	2	4
<b>MétiR</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b><i>norA/qacA</i></b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
34SM	4	4	Strasbourg	Infection	C	2014.11.05	<i>norA</i>	1	4	1	4
48SA	4	4	Strasbourg	Infection	N	2015.03.25	<i>norA</i>	1	2	1	4
SL_62	4	17	Bordeaux	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	2	8
16084449	4	ND	Rouen	Infection	N	ND	<i>norA</i>	1	2	2	4
25AC	5	5	Strasbourg	Infection	C	2014.09.15	<i>norA</i>	1	2	0.5	4
<b>73KM</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>Strasbourg</b>	<b>Infection</b>	<b>C</b>	<b>2015.10.22</b>	<b><i>norA</i></b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0.5</b>	<b>4</b>
SL_66	5	18	Bordeaux	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	1	4
16035553	5	ND	Rouen	Infection	N	ND	<i>norA</i>	1	2	0.25	2
16103574	5	ND	Rouen	Infection	C	ND	<i>norA</i>	1	4	0.5	4
SL_118	6	10	Kronoberg	Carriage	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	1	4
SL_55	6	10	Nantes	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	2	4
SL_DSM 4804	6	24	ND	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	2	1	4
22FJ	6	24	Strasbourg	Infection	C	2014.08.09	<i>norA</i>	1	2	2	8
16084028	6	ND	Rouen	Infection	N	ND	<i>norA</i>	1	4	2	8
77HJ	7	26	Strasbourg	Infection	N	2015.11.11	<i>norA</i>	1	4	2	4
C42	7	26	Strasbourg	Carriage	N	2014.07.27	<i>norA</i>	1	4	2	8
70GR	7	27	Strasbourg	Infection	N	30/09/2015	<i>norA</i>	1	2	1	4
16043959	7	ND	Rouen	ND	C	ND	<i>norA</i>	1	4	1	4
SL_10	Singleton	13	Rouen	Infection	ND	ND	<i>norA</i>	1	4	1	4
65KN	Singleton	28	Strasbourg	Infection	N	2015.08.18	<i>norA</i>	1	2	1	4
69MP	Singleton	28	Strasbourg	Infection	C	2015.09.23	<i>norA</i>	1	4	1	4
16116446	Singleton	ND	Rouen	Carriage	ND	ND	<i>norA</i>	0.5	2	0.25	4

ND: No Data

Strains with a reduced susceptibility are in bold text





### 1.3. Principaux résultats

#### ***Profil de résistance aux antibiotiques***

Onze des 49 souches (22,4 %) étaient résistantes à la pénicilline G. Le taux de souches résistantes à la kanamycine, la tobramycine, l'acide fusidique et la tétracycline était de 4,1 % (2/49 souches) et celle des souches résistantes à la gentamicine, à l'érythromycine et à la clindamycine était de 2 % (1/49 souches). Une souche (2 %) était résistante à la méticilline ; cette souche était par ailleurs multirésistante et appartenait au CC3.

#### ***Résistance phénotypique aux antiseptiques***

Les CMI du CHX variaient de 0,5 à 2 mg/L et celles du BAC de 0,25 à 8 mg/L. Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> du CHX et du BAC étaient de 1 mg/L et 2 mg/L respectivement. Une sensibilité diminuée au CHX et au BAC a été observée pour 12,2 % (6/49) et 4,1 % (2/49) des souches, respectivement. Les CMB variaient de 2 à 4 mg/L et de 2 à 8 mg/L pour le CHX et le BAC, respectivement. Les CMB<sub>50</sub> et CMB<sub>90</sub> de CHX étaient de 4 mg/L. Les CMB<sub>50</sub> et CMB<sub>90</sub> du BAC étaient de 4 mg/L et 8 mg/L, respectivement.

Les CMI du BAC avaient tendance à varier en fonction du CC des souches. Les CMI du BAC des souches du CC5 et singleton (moyenne de 0,5 mg/L et 0,8 mg/L, respectivement) étaient inférieures à celles des autres CCs. Au contraire, les souches appartenant au CC3 avaient les CMI les plus élevées (moyenne de 2,2 mg/L). Aucune tendance notable n'a été mise en évidence concernant la distribution des CMB du CHX ou du BAC en fonction des CCs.

#### ***Résistance moléculaire aux antiseptiques***

Le gène *norA* a été détecté chez toutes les souches de *S. lugdunensis*. Le gène *qacA* a été détecté chez seulement 2 souches, qui présentaient toutes deux une sensibilité diminuée aux deux antiseptiques (CHX et BAC) et appartenaient au CC3. Les gènes *qacC*, *qacG*, *qacH* et *qacJ* n'ont pas été détectés.

Cette étude a montré que *S. lugdunensis* reste très sensible au CHX et au BAC. Le gène *norA* a été détecté chez toutes les souches, suggérant qu'il pourrait appartenir au *core genome* de *S. lugdunensis*. Cependant, nous avons décrit pour la première fois chez cette espèce une sensibilité diminuée à ces antiseptiques chez deux souches du CC3 (dont une résistante à la méticilline) et comportant le gène de résistance *qacA*.

#### 1.4. Discussion et perspectives

L'utilisation d'antiseptiques, même à faible concentration, exerce une pression sélective chez les staphylocoques, à l'origine d'une augmentation des CMI de ces antimicrobiens (Maillard, 2018; LaBreck *et al.*, 2020; Nicolae Dopcea *et al.*, 2020). Les conséquences cliniques de cette diminution de sensibilité ne sont pas bien connues, mais pourrait conduire à une persistance des souches dans l'environnement hospitalier et/ou à leur transmission croisée par manuportage, de patient à patient ou de l'environnement hospitalier au patient.

Ainsi, l'objectif de ce travail était d'explorer l'hypothèse d'une potentielle adaptation de *S. lugdunensis* à l'environnement hospitalier via l'acquisition de mécanisme de résistance aux antiseptiques pour expliquer la prédominance mondiale de certains clones.

La sensibilité aux antiseptiques de *S. lugdunensis* a été très peu étudiée. A ce jour, seules deux études incluant seulement un petit nombre de souches de *S. lugdunensis* ont été publiées : une seule souche dans les travaux de Sommer *et al.* (Sommer *et al.*, 2020) et huit dans l'étude d'Addetia *et al.* (Addetia *et al.*, 2019). Notre étude est ainsi la première à étudier la sensibilité aux antiseptiques d'une si grande collection de souches de *S. lugdunensis* provenant de différents contextes cliniques et origines géographiques et représentant les sept CC décrits à ce jour.

La résistance aux deux antiseptiques les plus couramment utilisés en milieu hospitalier, le CHX et BAC, a été évaluée en déterminant la CMI et la CMB par microdilution en milieu liquide selon les recommandations du CLSI (CLSI 2018). Cependant, comme il n'existe pas de méthodes standardisées pour déterminer la CMI/CMB ni de consensus pour définir la résistance aux antiseptiques (Horner, Mawer and Wilcox, 2012), nous avons appliqué les protocoles et les seuils de CMI largement utilisés dans la littérature pour les staphylocoques. Nous avons ainsi défini une sensibilité diminuée au CHX et au BAC par une CMI > 1,5 mg/L et > 3 mg/L, respectivement (Shamsudin, 2012).

Dans notre étude, les CMI du BAC se sont révélées plus faibles (0,25 mg/L à 8 mg/L) que celles observées dans les études précédentes utilisant la technique de microdilution en milieu liquide. En effet, ces études ont montré que les CMI du BAC vis-à-vis de souches cliniques de SCN et de *S. aureus* variaient entre 0,25 mg/L et 64 mg/L (Taheri *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021; Correa *et al.*, 2008; Kampf, 2018). Les deux seules souches de *S. lugdunensis* présentant une sensibilité réduite au BAC dans notre étude appartenaient au CC3. En revanche, les souches du

CC5 et singleton ST avaient tendance à avoir des CMI plus faibles, suggérant une association possible entre la lignée clonale et la sensibilité au BAC. Ce phénomène a déjà été décrit pour *S. aureus* ; les souches appartenant aux principales lignées humaines CC22 et CC5 avaient des valeurs de CMI du CHX significativement plus élevées que celles des souches appartenant à la principale lignée phylogénétique d'origine animale, le ST398 (Kernberger-Fischer *et al.*, 2018).

Les souches de *S. lugdunensis* présentaient de faibles valeurs de CMI pour le CHX (CMI<sub>90</sub> = 2 mg/L) avec une distribution de valeurs étroite, similaire à celle obtenue par Addetia *et al.* pour les huit souches de *S. lugdunensis* (CMI variant de 0,5 à 1 mg/L) (Addetia *et al.*, 2019). En revanche, dans la littérature, les CMI de CHX variaient de 0,125 mg/L à 32 mg/L pour les autres espèces de SCNs (Lepointeur, 2013; Jenedi, 2014; Taheri *et al.*, 2016; Addetia *et al.*, 2019; Aubourg *et al.*, 2022), et de 0,25 mg/L à 8 mg/L pour *S. aureus* (Taheri *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

Les valeurs de CMB de CHX et BAC déterminées dans notre étude étaient proches des valeurs de CMI, et restaient bien en deçà des concentrations d'antiseptiques utilisées en pratique. Si l'on tenait compte des valeurs seuils épidémiologiques (ECOFF) définies pour *S. aureus* par Morrissey *et al.* (CMI = 8 mg/L et CMB > 64 mg/L pour le CHX, et CMI = 16 mg/L et CMB = 32 mg/L pour le BAC), toutes nos 49 souches de *S. lugdunensis* testées seraient considérées comme sensibles (phénotype sauvage) (Morrissey *et al.*, 2014). Du fait du nombre trop faible de souches de notre étude, il nous n'était pas possible d'établir des ECOFF pour *S. lugdunensis*.

De plus, la résistance au CHX et au BAC a été recherchée par une méthode moléculaire. Le gène *norA* a été détecté dans toutes les souches de notre collection, suggérant qu'il appartient au *core genome* de *S. lugdunensis*, comme cela a été montré pour *S. aureus* (Costa *et al.*, 2019). En revanche, il reste à savoir si plusieurs allèles du gène *norA* existent chez *S. lugdunensis* comme cela existe chez *S. aureus* (LaBreck *et al.*, 2020). De plus, une augmentation des CMI des antiseptiques de souches de *S. aureus* a été associée à un efflux médié par NorA via la surexpression du gène *norA* (Costa *et al.*, 2019; LaBreck *et al.*, 2020). Ainsi, il serait intéressant de comparer les niveaux d'expression de *norA* des souches de notre collection.

De plus, nous avons recherché la présence d'autres gènes de résistance, d'acquisition plasmidique, dont l'expression permettrait de potentialiser la résistance de bas niveau liée à NorA (LaBreck *et al.*, 2020). Nous avons ainsi déterminé la prévalence des gènes *qac* appartenant à la famille MFS (*qacA*) ou SMR (*qacC*, *qacG*, *qacH*, *qacJ*). La prévalence du gène

*qacA* était faible (4,1 %) dans cette étude. Ce résultat contraste avec les variations de la prévalence de *qacA* précédemment décrites pour les SCN (42,4 % à 62,4 %) (Taheri *et al.*, 2016; Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017; Zhang *et al.*, 2021) et pour *S. aureus* (de 10,5 % à 21,8 % pour les souches sensibles à la méticilline et de 8,3 % à 83,3 % pour les souches résistantes à la méticilline) (Mayer, 2001; Vali *et al.*, 2008; Shamsudin, 2012; Taheri *et al.*, 2016; Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017; Zhang *et al.*, 2021). Dans notre étude, les gènes *qacC*, *qacG*, *qacH* et *qacJ* n'ont pas été détectés. La prévalence de ces gènes chez d'autres espèces de SCN et chez *S. aureus* varie considérablement d'une étude à l'autre (0 % à 44,2 % des isolats) (Mayer, 2001; Vali *et al.*, 2008; Shamsudin, 2012; Taheri *et al.*, 2016; Ignak, Nakipoglu and Gurler, 2017). La faible prévalence de ces gènes *qac* plasmidiques chez *S. lugdunensis* pourrait s'expliquer par les multiples barrières du génome de cette espèce (systèmes de restriction-modification, systèmes CRISPR-cas, systèmes toxine-antitoxine) qui empêchent le transfert horizontal de gènes et l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (Argemi *et al.*, 2018).

Fait intéressant, les deux souches de *S. lugdunensis* (une provenant de portage et l'autre d'infection) positives pour le gène de résistance *qacA* avaient une sensibilité diminuée au CHX et au BAC. Cela pourrait être expliqué par une corrélation positive des gènes *qac* et d'une sensibilité diminuée aux antiseptiques (CMI plus élevées), comme l'ont démontré plusieurs études sur *S. aureus* et les SCNs (Horner, Mawer and Wilcox, 2012; Taheri *et al.*, 2016; Addetia *et al.*, 2019; Sommer *et al.*, 2020). Par ailleurs, le séquençage du génome complet ou une analyse transcriptomique des souches de *S. lugdunensis* présentant une sensibilité diminuée aux antiseptiques pourraient permettre d'identifier les mécanismes contribuant à une sensibilité diminuée aux antiseptiques chez cette espèce.

La résistance croisée aux antibiotiques et aux antiseptiques reste controversée. Certaines études ont rapporté une résistance croisée entre le CHX et des antibiotiques (par exemple la méticilline, pénicilline, ciprofloxacine, triméthoprime-sulfaméthoxazole, clindamycine, tétracycline), en particulier pour des souches cliniques de *S. epidermidis*, *S. warneri* et *S. aureus* (Kampf, 2016; El Sayed Zaki, Bastawy and Montasser, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

La seule souche résistante à la méticilline de notre étude a montré une sensibilité diminuée à la fois au CHX et au BAC. Ces souches de *S. lugdunensis* résistantes à la méticilline, plus répandues en Asie (Tan, Ng and He, 2008; Chang *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2021), pourraient représenter à l'avenir un problème de santé publique majeur dans le monde. L'analyse d'un plus

grand nombre de souches de *S. lugdunensis* résistantes à la méticilline est donc nécessaire pour poursuivre la description du phénomène de sensibilité diminuée aux antiseptiques chez *S. lugdunensis* et détecter la survenue de résistance croisée avec les antibiotiques.

Nous nous sommes également intéressés à un autre antiseptique largement utilisé en milieu hospitalier, la povidone iodée, qui est utilisée dans la désinfection de la peau, notamment en pré-opératoire. Cet antiseptique est à large spectre ; il possède une action anti bactérienne (Gram positif et négatif), anti virale et anti fongique (Williamson, Carter and Howden, 2017). Nous avons voulu, de la même manière que pour le CHX et le BAC, déterminer les CMI et CMB de cet agent par microdilution en milieu liquide. Cependant, pour des raisons techniques, la solution colorée et la formation de précipités empêchant la lecture, nous n'avons pas pu mener à bien cette étude. Pour pallier cela, il faudrait mettre en œuvre une autre méthode, en milieu gélosé par exemple.

D'autre part, sachant que l'un des facteurs majeurs de virulence de *S. lugdunensis* est la capacité de formation de biofilm (Heilbronner and Foster, 2021), une des perspectives de ce travail serait l'étude de la capacité des antiseptiques à éradiquer le biofilm mature, et la détermination des concentrations minimales d'éradication du biofilm (CMEB). L'association d'une capacité forte à former du biofilm et d'une résistance (ou diminution de sensibilité) aux antiseptiques pourrait alors expliquer la persistance des clones.

Enfin, notre étude a porté sur des souches cliniques de *S. lugdunensis*, mais pour expliquer une persistance hospitalière, il serait pertinent de compléter ce travail par l'étude de la sensibilité aux antiseptiques de souches isolées de l'environnement hospitalier. Dans ce but, une étude avait été mise en place au printemps 2020 au CHU de Rouen, par une interne en bactériologie et en collaboration avec le service d'hygiène, visant à rechercher des souches de *S. lugdunensis* dans les chambres de patients ayant une infection à *S. lugdunensis* en effectuant des prélèvements de surface grâce à des géloses contact ou par écouvillonnage. Cette étude n'a pas pu se poursuivre du fait de la pandémie de Covid-19 mais pourrait garder un intérêt.

**Au total, à la différence des autres SCN, *S. lugdunensis* reste très sensible aux antiseptiques. Cependant, la description pour la première fois, de deux souches de CC3 (dont une résistante à la méticilline) présentant une sensibilité diminuée aux antiseptiques doit nous alerter sur le risque que ferait courir l'émergence de ce phénomène pour le contrôle des infections associées aux soins dans les établissements de santé.**



## 2. Travail personnel : La caractérisation du biofilm de *Staphylococcus lugdunensis* révèle des différences clés selon la lignée clonale et la disponibilité en fer

### 2.1. Introduction et contexte de l'étude

Deux études asiatiques ont récemment identifié des clones endémiques de *S. lugdunensis* résistants à la méticilline appartenant au CC3 et au CC1, en milieu hospitalier, sur une période de 4 mois (Ho *et al.*, 2015) ou de 40 mois (Yeh *et al.*, 2016). De la même façon, Dahyot *et al.* ont rapporté l'isolement de souches de ces mêmes CCs, mais sensibles à la méticilline, chez des patients hospitalisés au CHU de Rouen sur une période de 12 mois et au CHU de Strasbourg sur une période de 29 mois (Dahyot *et al.*, 2018, 2019). Ces études épidémiologiques suggèrent que certaines souches de *S. lugdunensis* pourraient s'implanter dans une niche écologique telle que le milieu hospitalier.

Parmi les éléments pouvant contribuer à favoriser la persistance de micro-organismes dans l'environnement figure la capacité à former du biofilm. Or, un des principaux facteurs de virulence et d'adaptation de *S. lugdunensis* connu à ce jour est sa capacité à former du biofilm. Celui-ci jouerait notamment un rôle dans les infections à *S. lugdunensis* associées aux dispositifs médicaux, en particulier les infections sur prothèse et sur cathéter (Becker, Heilmann and Peters, 2014; Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017b; Hagstrand Aldman, Thompson and Pählman, 2023).

Quelques études *in vitro* ont révélé, grâce à des traitements enzymatiques et chimiques de détachement, que le biofilm de *S. lugdunensis* était majoritairement protéique (Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Ravaioli *et al.*, 2020) et que sa production était stimulée en condition de carence en fer, via l'action des protéines IsdC (Missineo *et al.*, 2014; Aubourg *et al.*, 2020). Cependant, la matrice extracellulaire du biofilm de *S. lugdunensis* n'a pas encore été finement caractérisée.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail était :

- d'évaluer l'impact de la lignée phylogénétique et de la carence en fer sur le fitness et la capacité à produire du biofilm d'une large collection de 49 souches représentatives des sept CCs existants (il s'agit ici du même soucier que celui du travail personnel n°1 :

« Etude de la sensibilité de *Staphylococcus lugdunensis* aux antiseptiques utilisés en milieu hospitalier »)

- et de caractériser l'architecture et la composition de la matrice extracellulaire du biofilm par CLSM, ainsi que d'analyser le protéome de cette matrice en milieu riche, pour deux souches ayant un comportement différent en lien avec leur CC.

2.2. *Publication n°2 :*

**Characterization of *Staphylococcus lugdunensis* biofilm reveals key differences according to clonal lineage and iron availability**

Laurie Destruel, Sandrine Dahyot, Laurent Coquet, Magalie Barreau, Maxime Grand, Xavier Argemi, Gilles Prévost, Nicolas Nalpas, Emmanuelle Dé, Sylvie Chevalier, Martine Pestel-Caron

Article en préparation pour une soumission dans la revue *Frontiers in Microbiology*



1 **Characterization of *Staphylococcus lugdunensis* biofilm reveals key**  
2 **differences according to clonal lineage and iron availability**

3 **Laurie Destruel<sup>1</sup>, Sandrine Dahyot<sup>2\*</sup>, Laurent Coquet<sup>3</sup>, Magalie Barreau<sup>4</sup>, Marie Leoz<sup>1</sup>, Maxime**  
4 **Grand<sup>1</sup>, Xavier Argemi<sup>5</sup>, Gilles Prevost<sup>5</sup>, Nicolas Nalpas<sup>3</sup>, Emmanuelle Dé<sup>3</sup>, Sylvie Chevalier<sup>4</sup>,**  
5 **Martine Pestel-Caron<sup>2</sup>**

6 <sup>1</sup>Univ Rouen Normandie, Univ Caen Normandie, INSERM, Normandie Univ, DYNAMICURE UMR  
7 1311 F-76000 Rouen, France

8 <sup>2</sup>Univ Rouen Normandie, Univ Caen Normandie, INSERM, Normandie Univ, DYNAMICURE UMR  
9 1311, CHU Rouen, Department of Microbiology, F-76000 Rouen, France

10 <sup>3</sup>Univ Rouen Normandie, INSA Rouen Normandie, CNRS, Normandie Univ, PBS UMR6270, F-  
11 76000 Rouen, France

12 <sup>4</sup>Univ Rouen Normandie, Univ Caen Normandie, INSERM, Normandie Univ, CBSA, UR4312, F-  
13 76000 Rouen, France

14 <sup>5</sup>University of Strasbourg, UR7290, Virulence Bactérienne Précoce, Hôpitaux Universitaires de  
15 Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Institute of Bacteriology, Centre  
16 Hospitalier Régional Universitaire, Strasbourg, France

17 **\* Correspondence:**

18 Corresponding Author

19 [sandrine.dahyot@chu-rouen.fr](mailto:sandrine.dahyot@chu-rouen.fr)

20 **Keywords: *Staphylococcus lugdunensis*, biofilm, clonal complex, extracellular matrix, CLSM,**  
21 **proteins, mass spectrometry**

22

23 **Abstract**

24 Of the seven clonal complexes (CCs) identified by Multilocus sequence typing (MLST), CC1 and CC3  
25 are widely distributed and particularly prevalent in Asia and France. To investigate the mechanisms  
26 that might contribute to explain the prevalence of these major CCs, the aim of our study was therefore  
27 (i) to analyse and compare the fitness and biofilm formation ability of representative strains of the  
28 seven *S. lugdunensis* CCs in rich medium and in iron-restricted condition, and (ii) to characterize the  
29 extracellular matrix of the most biofilm-forming strains.

30 Biofilm formation was evaluated using crystal violet assay in rich medium for 49 *S. lugdunensis*  
31 clinical strains (belonging to seven CCs) and in iron restricted condition for 34 strains. For two of these  
32 strains, biofilm architecture and matrix composition were further investigated by inhibition assays and  
33 confocal laser scanning microscopy (CLSM) under rich and iron restricted conditions. Moreover,  
34 proteome of the biofilm extracellular matrix (ECM) of the two biofilm producing strains was analyzed  
35 and compared by LC-MS/MS.

36 No growth difference was observed neither according to the strains nor according to the CC, whatever  
37 the medium (trypticase soy broth [TSB] vs RPMI 1640 with 1% of casamino acids [RPMI]). 91.2 %  
38 (RPMI) to 95.9% (TSB with 1% glucose) of the strains produced a 24h-biofilm. CC2 strains produced  
39 significantly more biofilm in rich medium than CC4, CC5 and singleton STs strains, while in iron-  
40 restricted conditions, CC6 strains were significantly more biofilm producers than strains from CC1 to  
41 CC5. In rich medium, the biofilm of the strong biofilm-producing strain 03MC (CC3) contained  
42 significantly more viable cells and was more compact than that of the moderate-biofilm producing  
43 strain SL55 (CC6). The biofilm of 03MC was composed of similar amounts of proteins, eDNA and  
44 polysaccharides while that of SL-55 was predominantly proteinaceous. In iron-restricted conditions,  
45 biofilm of both strains exhibited a different composition, with a lower proportion of proteins. By LC-  
46 MS/MS, a total of 322 proteins were identified in the ECM of the two strains, with 148 proteins  
47 significantly more abundant in 03MC and 54 proteins more abundant in SL-55. In both strains, proteins  
48 were mostly implicated in metabolism, and more specifically in glycolysis/gluconeogenesis and  
49 pyruvate metabolism. A higher percentage of proteins involved in processing genetic information was  
50 identified for strain 03MC compared to SL55.

51 This study shows that biofilm-forming capacity of *S. lugdunensis* strains as well as composition of  
52 biofilm matrix are strongly correlated with CC affiliation and iron availability. The proteome of the  
53 ECM produced by two clinical *S. lugdunensis* strains was characterized for the first time; it is mainly  
54 composed of proteins mainly involved in carbohydrate metabolism.

## 55 1 Introduction

56 *Staphylococcus lugdunensis* is a particularly virulent species of coagulase-negative *Staphylococcus*  
57 (CoNS), with a pathogenic potential quite similar to that of *Staphylococcus aureus*. *S. lugdunensis* can  
58 cause a wide range of infections, including skin and soft tissue infections, bone and joint infections,  
59 catheter-related infections, and particularly aggressive and destructive infective endocarditis  
60 (Heilbronner et Foster 2021). To monitor epidemiology of these infections, typing methods have been  
61 developed, including multilocus sequence typing (MLST), which defines sequence types (STs)  
62 grouped into clonal complexes (CCs) (Chassain et al. 2012; Dahyot et al. 2019). More recently, the  
63 single locus sequence typing scheme “*fbl*-typing” has been developed, allowing to rapidly assign  
64 isolates to MLST CCs. Worldwide, seven CCs have been described, and interestingly, CC1 and CC3  
65 are mainly identified in hospital settings, both in Asia and in France (Dahyot et al. 2019; Yeh et al.  
66 2016; Ho et al. 2015; Cheng et al. 2015).

67 To date, *S. lugdunensis* pathogenesis remains unclear, with few well-characterized virulence factors  
68 (Argemi, Hansmann, et al. 2017; Heilbronner et Foster 2021). Biofilm formation ability appears as a  
69 frequent characteristic of the species, and seems to be of particular importance in bone and joint  
70 infections (notably prosthetic joint infections) (Argemi, Prévost, et al. 2017; Hagstrand Aldman,  
71 Thompson, et Pählman 2023). However, few studies have been conducted on *S. lugdunensis* biofilm  
72 characterization. Whole genome sequencing analyses have identified the presence of the *ica* locus in  
73 all *S. lugdunensis* genomes belonging to various CCs (Lebeurre et al. 2019). The *icaADBC* locus  
74 encodes for a polysaccharide, the poly-N-acetylglucosamine (PNAG), which is commonly constitutive  
75 of the biofilm of other CoNS and *S. aureus* strains. However, through biofilm dispersion assays and  
76 confocal laser scanning microscopy (CLSM) analyses, *in vitro* studies initially failed to detect the  
77 presence of PNAG and revealed that *S. lugdunensis* biofilm matrix was mainly composed of proteins  
78 (Frank et Patel 2007). However, recent studies have shown that proteins and polysaccharides were the  
79 major components of mature 24h-biofilm (Qian et al. 2021; Ravaioli et al. 2020).

80 To date, only the IsdC protein expressed under low-iron growth conditions, has been identified as  
81 playing a role in the biofilm accumulation phase involving cell-cell interactions (Missineo et al. 2014).  
82 The *isdC* gene is part of the *iron-regulated surface determinant (isd)* locus, encoding Isd proteins that  
83 cooperate to acquire iron by extracting heme from hemoproteins. In other staphylococci  
84 (*Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*), analyzes of the biofilm extracellular matrix proteome have  
85 been conducted using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry LC-MS/MS  
86 (Muthukrishnan et al. 2011; Graf et al. 2019; Lei, Gupta, et Lee 2017; Martínez-García et al. 2021; Gil  
87 et al. 2014). These studies revealed that the biofilm matrix could be composed of intracellular proteins  
88 (including ribosomal and metabolic proteins), surface proteins or secreted proteins in varying  
89 proportions depending on strains and culture conditions. For exemple, the *S.aureus* surface protein C  
90 and G (SasC and SasG), the clumping factor B (ClfB), the serine aspartate repeat protein (SdrC) the  
91 biofilm-associated protein (Bap), and the fibronectin/fibrinogen-binding proteins (FnBPA and FnBPB)  
92 have been individually implicated in biofilm matrix formation of *S. aureus* (Speziale et al. 2014).

93 In this context, analysis of the biofilm matrix proteome of *S. lugdunensis* as well as biofilm-forming  
94 ability of isolates belonging to all clonal complexes under *in vivo*-like conditions (iron-restricted  
95 medium) appears mandatory. The objectives of this study were then (i) to compare the impact of  
96 phylogenetic lineage and iron restriction on fitness and biofilm-forming ability of a large collection of  
97 *S. lugdunensis* clinical strains, and (ii) to further characterize the biofilm composition by CLSM as  
98 well as the ECM proteome by LC-MS/MS of two strains belonging to CC3 and CC6.



## 100 2 Materials and methods

### 101 2.1 Bacterial strains

102 Forty-nine *S. lugdunensis* strains were included in this study: 12 carriage strains and 37 responsible for  
103 human infections. Forty-eight strains originated from French University Hospitals (Bordeaux, Lyon,  
104 Montpellier, Nancy, Nantes, Rouen, Strasbourg, Tours) and one from Sweden (Kronoberg). Strains  
105 were previously characterized by MLST (Dahyot et al. 2018) and/or *fbl*-typing (Dahyot et al. 2019).  
106 Forty-five strains belonged to seven CCs (11 CC1, 5 CC2, 11 CC3, 4 CC4, 5 CC5, 5 CC6, and 4 CC7)  
107 and four were singleton STs (1 ST13 and 2 ST28) (**Supplementary Table 1**). *S. epidermidis* ATCC  
108 35984 (RP62A) strain was used as a biofilm producing control strain (Stepanović et al. 2007).

### 109 2.2 Fitness curve assays

110 Growth kinetics of the 49 *S. lugdunensis* strains were performed in rich medium (trypticase soy broth  
111 [TSB]) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette) and in iron-depleted medium (RPMI 1640 (Sigma R1145, UK)  
112 with 1% of casamino acids (Sigma, Saint-Louis), [RPMI]). Overnight cultures in TSB or RPMI were  
113 incubated under shaking (150 rpm) at 37°C and then diluted to OD<sub>600 nm</sub> of 0.01. Aliquots (200 µL per  
114 well) of standardized samples were inoculated in triplicate in a 96-well polystyrene microtiter plate.  
115 OD<sub>600 nm</sub> measurement was performed every 15 minutes with the *Spark*® multimode microplate reader  
116 (Tecan, Männedorf, Switzerland) over 24 hours at 37°C under continuous double-orbital (108 rpm).  
117 Data were obtained from biological triplicates. Generation time and maximal growth rate were  
118 determined with the R<sup>©</sup> software (v.3.6.0). Statistical analyses were performed by Kruskal-Wallis and  
119 post hoc Dunn's test on GraphPad Prism<sup>©</sup> software.

### 120 2.3 Biofilm formation

121 Biofilm formation was assessed by a crystal violet staining assay (adapted from Stepanovic *et al.*  
122 2007)(Stepanović et al. 2007) in TSB supplemented with 1% glucose (TSBG) for all the 49 *S.*  
123 *lugdunensis* strains and in RPMI for 34 strains. Overnight cultures were diluted to obtain an OD<sub>600 nm</sub>  
124 of 0.01. Microtiter plates (96-wells) were filled in triplicate with 200 µL of bacterial suspension and  
125 incubated for 24 hours at 37°C under static conditions. Supernatants were removed and wells were  
126 washed once with sterile water. Remaining adherent cells were stained with 0.1% crystal violet for 20  
127 minutes at room temperature, then washed twice with sterile water, and crystal violet was solubilized  
128 in ethanol 96% for 20 minutes. OD<sub>590 nm</sub> was measured with the *Spark*® multimode microplate reader  
129 (Tecan). Four biological replicates were performed. *S. epidermidis* ATCC 35984 was used as a biofilm  
130 producing control strain (Stepanovic *et al.* 2007) and for each plate three wells contained medium alone  
131 (blank). Statistical analyses were performed by Kruskal-Wallis and post hoc Dunn's test on Graphpad  
132 Prism<sup>©</sup> software and Wilcoxon Mann Whitney test on R<sup>©</sup> software.

133  
134 Strains were classified as non-producer (OD<sub>590 nm</sub> ≤ OD<sub>c</sub>), weak biofilm producer (OD<sub>c</sub> < OD<sub>590 nm</sub> ≤  
135 2 x OD<sub>c</sub>), moderate producer (2 x OD<sub>c</sub> < OD<sub>590 nm</sub> ≤ 4 x OD<sub>c</sub>) and strong producer (4 x OD<sub>c</sub> < OD<sub>590</sub>  
136 nm) as previously described by Stepanovic *et al.* (Stepanovic *et al.* 2007). OD<sub>c</sub> was obtained by the  
137 following formula: OD<sub>c</sub> = Average OD<sub>590 nm</sub><sup>blank</sup> + 3 x Standard Deviation<sup>blank</sup>.

### 138 2.4 Biofilm inhibition assays

139 Inhibition assays of biofilm were performed for the strains 03MC and SL-55, using a method adapted  
140 from Panda et Singh study (Panda et Singh 2018). The 24h-biofilm was grown in TSBG in 24-wells  
141 microplates with 100 µg/mL of proteinase K (Sigma, Saint-Louis), sodium metaperiodate (Sigma,

142 Saint-Louis) or DNase I (Sigma, Saint-Louis), to determine the amount of proteins,  
143 exopolysaccharides and eDNA, respectively. Wells without enzymatic or chemical treatment were used  
144 as controls. Wells were then treated and stained with 0.1 % crystal violet as described above. Data were  
145 obtained from three biological replicates. Results were expressed as ratio between mean of treated  
146 wells and mean of control wells. Statistical analyses were performed by Wilcoxon Mann Whitney test  
147 on R<sup>®</sup> software.

## 148 **2.5 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)**

149 The 48h-biofilm of two strains, 03MC (CC3) and SL-55 (CC6), was prepared in TSBG and RPMI as  
150 described above in 24-well glass bottomed microplates (Greiner bio-one, France). The initial OD<sub>600nm</sub>  
151 was adjusted to 0.08. After 48 hours of incubation at 37°C, cells were washed with 300 µL of 0.9%  
152 NaCl to remove planktonic cells. The membrane integrity of the cells embedded in the biofilm were  
153 stained by Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit<sup>®</sup> (molecular Probes, LifeTechnologies)  
154 according to the manufacturer' instructions. Separately, total cells were stained by adding 50 nM of  
155 Syto-9 (Invitrogen, Carlsbad, CA), a green fluorescent probe, and biofilm matrix components were  
156 stained using fluorescent dyes. SYPRO Ruby (red fluorescent dye) (Fisher Scientific, USA) was used  
157 to stain proteins. To assess the eDNA relative abundance, 1 µM of 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-  
158 dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO) was used (red fluorescent dye) (Euromedex, France). The  
159 exopolysaccharides β1-2 and β1-4 were labeled with 200 µg/mL of white calcofluor (blue fluorescent  
160 dye) (Sigma-Aldrich, USA).

161  
162 The CLSM observations of biofilms were performed using a Zeiss LSM710 microscope (Carl Zeiss  
163 Microscopy, Oberkochen, Germany) using a x63 oil immersion objective. Images were taken every 0.5  
164 µM. For visualization and processing of 3D images, the Zen 2.1 SP1 zen software (Carl Zeiss  
165 Microscopy Oberkochen, Germany) was used. Data were obtained from three biological replicates.  
166 Quantitative analysis of images was performed with COMSTAT software (Givskov *et al.* 2000).

## 167 **2.6 Proteins characterization of the biofilm extracellular matrix**

### 168 **2.6.1 Matrix extraction**

169 Proteins of the biofilm matrix were extracted according to an adaptation of the protocol of Chiba *et al.*  
170 2014 (Chiba *et al.* 2015) from the two strains 03MC and SL-55. Overnight cultures were diluted to  
171 obtain OD<sub>600 nm</sub> of 0.01. Briefly, the biofilm was grown in 100 mL of TSBG for 24h in an Erlenmeyer  
172 flask containing 2g of glass wool under agitation (30 rpm) at 37°C. Glass wool was rinsed in 100 mL  
173 of sterile water. The ExtraCellular Matrix (ECM) was extracted from the biofilm with 15 mL of 1.5 M  
174 NaCl. After gently shaking for 5 minutes on a roller shaker, bacterial cells were removed by  
175 centrifugation (5000 g for 15 minutes) and filtered through a 0.22 µM filter. Then, the ECM was  
176 precipitated overnight at 4°C in three volumes of 96% ethanol. Finally, the purified ECM was washed  
177 twice in 70% ethanol, air-dried and resuspended in water.

### 178 **2.6.2 Trypsin digestion and nano LC-MS/MS**

179 ECM extracts (25 µg) were incubated overnight at 37°C with dispersin (20 ng/µL) and loaded on SDS-  
180 PAGE gel constituted of 5% polyacrylamide for migration 45 min at 20 mA. Proteins were stained  
181 with Coomassie blue. A single band containing all the extracted proteins appeared for each sample.  
182 These bands were excised for the endoprotease digestion carried out with an automated system  
183 (MultiPROBE II, PerkinElmer). First, the protein bands were washed several times in water,  
184 dehydrated with acetonitrile, dried, incubated in a reductive solution (dithiothreitol 5 mM) and  
185 alkylated in iodoacetamide 25 mM. Then, the trypsin digestion was performed overnight with 1 µg of

186 trypsin (Promega). The resulting peptides were recovered from the gel by incubation twice for 15 min  
187 in acetonitrile and once for 15 min in a 0.1 % TFA (TriFluoroacetic Acid) solution. Peptides were  
188 dried, concentrated in 0.1% TFA solution and quantified by colorimetric peptide assay (Pierce  
189 Quantitative Peptide Assays, Thermo Scientific).

190  
191 For mass spectrometry analysis, 0.2 µg of protein digests were injected in an LTQ Orbitrap Elite mass  
192 spectrometer (Thermo Scientific) equipped with a nano-ESI source coupled to a nanoliquid  
193 chromatography (Easy-nLC II, Thermo Scientific). Peptides were separated by using a reversed phase  
194 C18 column (NikkyoTechnos, Japan) with a linear gradient of 15% to 55% of B (mobile phase A:  
195 water/0.1% TFA and phase B: Acetonitrile/0.1% TFA) over 120 min. The mass spectrometer was  
196 operated in data dependent mode to automatically switch between Orbitrap-MS (from m/z 300 to 2000)  
197 and LTQ-MS/MS acquisition.

### 198 **2.6.3 Protein identification and quantification**

199 Mass spectrometry data (raw data files) were processed using Progenesis QI software (Nonlinear  
200 Dynamics). Briefly, after the steps of peptide map alignment and normalization, the analysis of  
201 variance (ANOVA) with statistic filters were performed to select peptides that present significant and  
202 reproducible expression levels. The peptide signals exhibiting  $P$  value  $< 0.05$  were conserved and the  
203 associated MS/MS spectra were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science  
204 v2.6.0) against the NCBI database restricted to *S. lugdunensis* HKU09-01. The identification searches  
205 were performed with variable modifications for oxidation of methionines, carbamidomethylation of  
206 cysteines, pyro-glutamate (Q and E) and with a maximum of 2 missed cleavages. MS/MS spectra were  
207 searched with a mass tolerance of 5 ppm for precursor ions and 0.35 Da for MS/MS fragments. Only  
208 peptides exhibiting significant Mascot individual ion score were retained. Only proteins with a  $q$  value  
209  $< 0.05$ , a power  $> 0.8$  and quantified with at least 2 peptides were selected. The total cumulative  
210 abundance of the protein was calculated by summing the abundances of each identified peptide. A 1.8-  
211 fold ratio are considered for significant change in abundance. The experiments were performed in  
212 biological quadruplicate for each strain.

213  
214 Participation in biological functional pathways was determined using the Kyoto Encyclopedia of Genes  
215 and Genomes (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg>).

### 216 217 **2.7 DNA extraction and New Generation Sequencing**

218 The genome of 03MC strain was sequenced by the “Plateforme de Microbiologie Mutualisée P2M”  
219 (Institut Pasteur, Paris, France) using the Nucleobond AXG Columns et Macherey Buffer Set III  
220 (Macherey-Nagel) according to the manufacturer’s recommendations for genomic DNA extraction,  
221 and the Nextera XT library kit (Illumina Inc.), and the NextSeq 500 sequencing system (Illumina Inc.).  
222 Paired-end reads were submitted to pre-processing using fqCleaner and to *de novo* assembly using  
223 SPADES, with a 50X minimum average sequencing depth.

224  
225 The draft genome was annotated using Prokka. Annotated 03MC and SL55 (Acc Num CP041724.1)  
226 genomes were screened for the following genes: *feoA*, *feoB*, *fhuB*, *fhuC*, *fhuD*, *fhuG*, *isdB*, *htsA*, *htsB*,  
227 *htsC*, *isdC*, *isdE*, *isdF*, *isdG*, *isdJ*, *isdK*, *isdL*, *lhaA*, *lhaS*, *lhaT*, *sirA*, *sirB*, *sirC*, *srtB*, *sstA\_1*, *sstB\_1*,  
228 *sstC\_1*, *sstD\_1*, *sstA\_2*, *sstB\_2*, *sstC\_2* and *sstD\_2*. The respective protein sequences were pairwise  
229 compared between 03MC and SL55 to identify differences in amino-acid composition.

230

## 231 **3 Results**

### 232 **3.1 Iron restriction does not impact *S. lugdunensis* growth but affects biofilm formation** 233 **according to the clonal complex**

#### 234 **3.1.1 Fitness assays**

235 To evaluate the potential impact of lineages on strain fitness, we performed growth curves. The mean  
236 values of generation time and maximal growth rate of the 49 strains in TSB were  $37.3 \text{ min} \pm 4.1$  and  
237  $1.1 \pm 0.1$ , respectively, and  $80.7 \text{ min} \pm 33.1$  and  $0.6 \pm 0.2$  in RPMI. Overall, the generation time was  
238 2.2 times higher in iron-restricted medium, and the maximum growth rate was 1.9 times lower in this  
239 condition compared to growth in TSB. No growth difference was observed according to either the  
240 strains or the CCs, whatever the medium.

241  
242 In TSB the final stationary  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  was  $1.2 \pm 0.4$ , while it was lower in RPMI ( $0.5 \pm 0.2$ ). Although  
243 heterogeneous, the maximum  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  did not seem to depend on the CC of the strains.

#### 244 **3.1.2 Biofilm formation**

245 We searched for a correlation between clonal lineages and ability to form biofilm and investigated  
246 whether experimental condition of iron limitation was correlated to a greater ability to produce biofilm.  
247 In rich medium (TSBG), almost all strains (47/49, 95.9%) produced biofilm, among which 40.8% ( $n =$   
248 20) were strong-, 32.7% ( $n = 16$ ) moderate- and 22.5% ( $n = 11$ ) were weak-biofilm producers (**Figure**  
249 **1A**). The two strains that did not produce biofilm belonged to CC5. CC2 strains produced significantly  
250 more biofilm than CC4 ( $p = 0.0203$ ), CC5 ( $p = 0.0215$ ) and singleton STs ( $p = 0.0045$ ) strains  
251 (**Supplementary Figure 1A**).

252  
253 In iron-restricted conditions (RPMI), 31/34 strains (91.2%) produced biofilm. However, strains  
254 produced less biofilm than in TSBG ( $\text{OD}_{590\text{nm max}} = 0.363 \pm 0.069$  in RPMI *versus*  $0.897 \pm 0.072$  in  
255 TSBG). 20.6% ( $n = 7$ ) were strong-, 50% ( $n = 17$ ) moderate- and 20.6% ( $n = 7$ ) weak-biofilm producers  
256 (**Figure 1B**). Strains from CC6 formed significantly more biofilm than those from CC1 ( $p = 0.016$ ),  
257 CC2 ( $p = 0.008$ ), CC3 ( $p = 0.004$ ), CC4 ( $p = 0.016$ ) and CC5 ( $p = 0.032$ ) (**Supplementary Figure 1B**).

258  
259 Whatever the medium, the biofilm production was not correlated with the clinical context (infection *vs*  
260 carriage) or the presence of medical devices, (**Supplementary Table 1**). However, when comparing  
261 biofilm formation in TSBG and RPMI, 2 behaviors depending on the CCs were observed. CC1 ( $p =$   
262  $0.0079$ ), CC2 ( $p = 0.0079$ ) and CC3 ( $p = 0.026$ ) strains produced significantly more biofilm in rich  
263 medium than in iron-restricted conditions, while CC6 ( $p = 0.0079$ ) strains were significantly more  
264 productive in RPMI (**Figure 2**).

### 266 **3.2 Variations of biofilm matrix composition of 03MC and SL-55 *S. lugdunensis* strains**

267 The biofilm composition of two *S. lugdunensis* strains selected for their different behavior in TSBG  
268 and iron-restricted conditions was further analyzed: the 03MC strain (CC3) (strong-biofilm producer  
269 in rich medium and weak-producer in iron-restricted conditions) and SL-55 strain (CC6) (moderate-  
270 producer in rich medium and strong-producer in iron-restricted conditions).

### 271 **3.2.1 Biofilm formation of 03MC and SL-55 strains was inhibited by DNase I and proteinase** 272 **K, but metaperiodate only affected that of 03MC**

273 The composition of the biofilm matrix was analyzed with a chemical and enzymatic inhibition  
274 approach. Both strains showed a significantly reduced capacity ( $p < 0.05$ ) to form biofilm in the  
275 presence of DNase I and proteinase K when added at the initial point of inoculation in rich medium  
276 (TSBG) (**Figure 3**). The biofilm formation of 03MC strain was more affected than that of SL-55 by  
277 these treatments. When using a pretreatment by metaperiodate, biofilm formation was significantly  
278 reduced for 03MC strain ( $p = 0.0049$ ), but not for SL-55 strain. Of note, the *icaADBC* locus was  
279 identified in the genome of both strains. Altogether, these results suggest that the matrix of the strong  
280 biofilm-producing strain 03MC was composed of polysaccharides, eDNA and proteins while that of  
281 the moderate-biofilm producing SL-55 strain was mainly composed of eDNA and proteins.

### 282 **3.2.2 Confocal Laser Scanning Microscopy analysis**

283 The architecture, the cell viability and ECM composition of a 48-hour biofilm was studied using CLSM  
284 for both strains. In TSBG, the biofilm of 03MC contained significantly more viable cells than that of  
285 SL-55 ( $p < 0.05$ ) (**Figure 4A**) and was more compact (roughness coefficient [Ra] = 0.12 for 03MC  
286 *versus* 0.32 for SL-55). Moreover, the biofilm of 03MC contained a significantly larger thickness of  
287 live-cells than dead cells ( $18.66 \pm 0.41 \mu\text{m}$  *versus*  $15.06 \pm 0.49 \mu\text{m}$ , respectively). The opposite  
288 phenomenon was observed for SL-55 ( $16.81 \pm 0.93 \mu\text{m}$  of living cells *versus*  $20.33 \pm 1.01 \mu\text{m}$  of dead  
289 cells) (**Figure 5A**). The biofilm of 03MC contained significantly more dead cells in iron-restricted  
290 medium than in rich medium ( $p < 0.05$ ) (**Figure 4A**), with a live-cell thickness of  $15.02 \pm 1.04 \mu\text{m}$   
291 *versus* a dead cell layer of  $19 \pm 1.29 \mu\text{m}$ , resulting in a significantly higher rate of eDNA ( $p < 0.05$ ). In  
292 addition, the 03MC biofilm exhibited greater heterogeneity (Ra = 0.61). On the contrary, SL-55 strain  
293 exhibited a more compact biofilm (Ra = 0.16) in RPMI with significantly more viable cells ( $p < 0.05$ )  
294 compared to rich medium (**Figure 4A**), and showed a significantly greater thickness in live-cell ( $24.82$   
295  $\pm 1.07 \mu\text{m}$ ) than in dead cells ( $20.2 \pm 1.39 \mu\text{m}$ ) (**Figure 6A**).

296  
297 In rich medium, the ECM of 03MC strain was composed of relatively similar amounts of proteins,  
298 eDNA and polysaccharides, while the ECM of SL-55 strain was predominantly proteinaceous (**Figure**  
299 **4B, Figure 5B, 5C, 5D**). In iron-restricted medium, 03MC produced significantly larger amounts of  
300 proteins, eDNA, and exopolysaccharides than in TSBG ( $p < 0.05$ ), but with a lower proportion of  
301 proteins compared to eDNA and exopolysaccharides than in rich medium. SL-55 produced slightly  
302 lower amounts of ECM in RPMI, with a lower proportion of proteins (**Figure 4B, Figure 6B, 6C, 6D**).

### 303 **3.2.3 Protein characterization in the biofilm matrix**

304 ECM proteomes of the 24-hour biofilm of 03MC and SL-55 strains were obtained after analysis of the  
305 matrix extracts by LC-MS/MS. A total of 322 proteins were identified in the biofilm matrix  
306 (**supplementary table 2**); 62 were unique to 03MC and 21 were exclusive to SL-55. Proteins were  
307 mainly identified as intracellular (71%), then as membrane proteins (13.4%), and a few were  
308 extracellular (5.2%). Ribosomal proteins accounted for 12.4% ( $n = 40$ ) of total proteins. Among  
309 membrane proteins, eight were ABC transporters, six were two-component systems and three were  
310 LPXTG-containing surface proteins (SLGD\_00094, IsdA; SLGD\_0090, IsdB and SLGD\_00478, a  
311 triacylglycerol lipase). In addition, 12 transcriptional regulators were identified, including two from  
312 the LytR family (SLGD\_01820 and SLGD\_00719). Of the 20 most abundant matrix proteins, 11 were  
313 common to both strains (**Table 1**). Among them, there were a LTA synthase family protein  
314 (SLGD\_02116, lipoteichoic acid synthase), metabolism proteins (like phosphopyruvate hydratase or  
315 ornithine decarboxylase), a LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein (SLGD\_02450,

316 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) and an autolysin (SLGD\_02076, N-acetylmuramoyl-L-alanine  
317 amidase).  
318

319 Functional pathways of the 322 proteins were identified by KEGG (**Figure 7**). The main functional  
320 pathway was metabolism (72% of proteins), followed by genetic information processing (22%) and  
321 environmental information processing (4%). The most represented pathway in the metabolism category  
322 was the carbohydrate metabolism ( $n = 98$  proteins); in this pathway, proteins were strongly involved  
323 in glycolysis/gluconeogenesis ( $n = 22$ ) and pyruvate metabolism ( $n = 14$ ), but more rarely in citrate  
324 cycle and tricarboxylic acid (TCA) cycle ( $n = 9$ ). When comparing differential protein abundance  
325 within the ECM of the strains, 148 proteins were significantly more abundant in 03MC while 54  
326 proteins were more abundant in SL-55. In both strains, the most represented pathway was metabolism  
327 (74% and 92% of proteins for 03MC and SL-55, respectively), and more specifically carbohydrate  
328 metabolism. A higher percentage of proteins involved in processing genetic information was identified  
329 for strain 03MC compared to SL55 (22% vs 6%, respectively), with most proteins (35/39) being  
330 involved in translation. In addition, five membrane transport proteins (three ABC transporters and two  
331 phosphotransferase systems) were significantly more abundant in 03MC and a protein involved in  
332 glycolysis/gluconeogenesis (SLGD\_02054, type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)  
333 (**Figure 7**).  
334  
335

## 336 4 Discussion

337 Biofilm is strongly associated with persistence and difficult-to-treat infections (Lebeaux, Ghigo, et  
338 Beloin 2014; Herry et al. 2022). On the other hand iron acquisition is critical for pathogenic bacteria  
339 to survive, colonize and invade host tissues. We therefore hypothesized that a best fitness and/or an  
340 increased capacity for biofilm production might explain the high prevalence of CC1 and CC3 clinical  
341 *S. lugdunensis* clones worldwide (Dahyot et al. 2019; Ho et al. 2015; Cheng et al. 2015; Yeh et al.  
342 2016). To test this hypothesis, we evaluated the impact of iron-restricted conditions, compared to a  
343 rich medium, on fitness and biofilm-forming capacity of a large selection of strains belonging to the 7  
344 CCs defined by MLST to date.

345 *S. lugdunensis* growth was greatly impaired in iron-restricted medium (RPMI) by comparison with rich  
346 medium (TSB), unlike what was observed by Aubourg *et al.* who described only a slightly reduced cell  
347 density in stationary phase for the *S. lugdunensis* N920143 strain in Brain-Heart Infusion (BHI) broth  
348 with 2,2'-dipyridyl (DIP) as iron chelator (Aubourg et al. 2020). This result may be due to a difference  
349 in residual iron and other metal concentrations between the two stress conditions. On the other hand,  
350 there were no significant growth differences in rich medium and in iron-restricted conditions according  
351 to the CCs.

352 The present study confirms that *S. lugdunensis* is a biofilm-producing species. In rich medium, 96% of  
353 the 49 strains studied formed biofilm, which is similar to what was observed in previous studies using  
354 a microtiter plate assay, such as Frank and Patel (15 strains, 100% producers), Qian *et al.* (24 strains,  
355 100% producers), Missineo *et al.* (9 strains, 100% producers), and Hagstrand Aldman *et al.* (36 strains,  
356 100%) but greatly higher than the findings of Pereira *et al.* (23 strains, 60.9% producers) (Frank et  
357 Patel 2007; Pereira et al. 2012; Missineo et al. 2014; Qian et al. 2021; Hagstrand Aldman, Thompson,  
358 et Pålman 2023). Of note, nearly 41% of our strains were strong biofilm formers; this result is between  
359 the percentages (21 to 94.4%) previously reported in studies using the same method of quantification  
360 (Stepanović et al. 2007; Pereira et al. 2012; Qian et al. 2021; Hagstrand Aldman, Thompson, et  
361 Pålman 2023). In contrast to Argemi *et al.* and Frank and Patel, no correlation between the source of  
362 infection and the degree of biofilm production was observed (Argemi, Prévost, et al. 2017; Frank et  
363 Patel 2007).

364 In iron-restricted medium, 31 out of the 34 strains studied (91%) formed biofilm. This is consistent  
365 with the findings of Missineo *et al.* where the 9 strains (100%) were biofilm producers in similar  
366 conditions (RPMI with 0.3% glucose and 2 mM glutamine) (Missineo et al. 2014). However, our  
367 strains formed less biofilm in these iron-limitation conditions ( $OD_{590nm} = 0.363$ ) than in rich medium  
368 ( $OD_{590nm} = 0.897$ ), probably in connection with a reduced growth rate in RPMI. In contrast, Aubourg  
369 *et al.* reported that iron limitation promoted biofilm formation of the strain *S. lugdunensis* N920143,  
370 but this was obtained in different conditions (BHI broth with DIP) (Aubourg et al. 2020).

371 This study shows for the first time that biofilm formation of *S. lugdunensis* was CC-dependent in both  
372 rich- and iron-restricted medium with CC2 and CC6 being significantly the most biofilm producing  
373 CCs in TSBG and RPMI, respectively. Similarly, a correlation between *S. aureus* clonal lineages  
374 defined by MLST and/or *spa* typing and biofilm phenotype has been described (Tasse et al. 2018;  
375 Naicker et al. 2016; Yu et al. 2020). Interestingly, two CC-dependent behaviors were observed with *S.*  
376 *lugdunensis* strains from CC1, CC2 and CC3 producing significantly more biofilm in rich medium than  
377 in iron restricted medium, whereas strains from CC6 were significantly more biofilm producers in  
378 RPMI than in TSBG.

380 To date, *S. lugdunensis* biofilm is not well characterized. Thanks to chemical and enzymatic assays and  
381 CLSM studies, often involving only a limited number of strains, it has long been accepted that *S.*  
382 *lugdunensis* biofilm is mainly proteinaceous (Frank et Patel 2007; Kogan et al. 2006; Missineo et al.  
383 2014; Pereira et al. 2012). However, in contrast to other CoNS and *S. aureus*, the extracellular matrix  
384 of *S. lugdunensis* biofilm has not been accurately characterized. To further investigate the composition,  
385 the structure and the proteome of *S. lugdunensis* biofilm, we selected one CC3 strain (03MC,  
386 representative of strong biofilm producer in rich medium) and one CC6 strain (SL-55, representative  
387 of strong biofilm producer in RPMI).

388 The inhibition biofilm formation assay revealed a strain-dependent composition. Indeed, enzymatic  
389 and chemical treatments suggest the critical role of proteins, polysaccharides and eDNA in  
390 development and structure of 03MC biofilm in rich medium. In contrast, SL-55 biofilm formation was  
391 not impacted by a metaperiodate pretreatment that degrades  $\beta$ -1,6-linked polysaccharides. These  
392 findings suggest that proteins and eDNA are the primary components of the *S. lugdunensis* biofilm  
393 matrix, which is consistent with previous studies using detachment biofilm assays (Frank et Patel 2007;  
394 Missineo et al. 2014; Pereira et al. 2012). In contrast, although the *icaADBC* locus (encoding PNAG  
395 production in staphylococci) (Arciola et al. 2015) was found in the genomes of 03MC and SL-55  
396 strains, polysaccharide production appears to be a strain-dependent phenomenon. The role of  
397 polysaccharides in *S. lugdunensis* biofilm in rich medium (TSB with 1 or 5% glucose) has been only  
398 recently shown using inhibition biofilm assays by extracellular polymeric substances-degrading agents  
399 (Qian et al. 2021) or fluorimetric methods (Ravaioli et al. 2020). Interestingly, detection of  
400 exopolysaccharides in the biofilm of 03MC and not in that of SL55 could explain the greater biomass  
401 of the biofilm of the 03MC strain, as demonstrated by Ravaioli et al (Ravaioli et al. 2020).

402 The characterization of the mature biofilm matrix of 03MC and SL-55 by CLSM combined with  
403 fluorescent dyes confirmed that composition of *S. lugdunensis* biofilm vary according to strains and  
404 highlighted that it also depends on the *in vitro* culture conditions, as previously pointed out (Ravaioli  
405 et al. 2020; Qian et al. 2021). CLSM images revealed opposite biofilm phenotype for the two strains  
406 in terms of structural organization with biofilm by 03MC (CC3) more compact in rich medium than in  
407 RPMI and conversely for SL-55 (CC6). In addition, CLSM indicated that the ECM of 03MC was  
408 composed of similar amounts of proteins, eDNA and polysaccharides while that of SL-55 was  
409 predominantly proteinaceous in rich medium in agreement with findings of Frank and Patel and  
410 Ravaioli *et al.* (Frank et Patel 2007; Ravaioli et al. 2020). Missineo *et al.* as well as Aubourg *et al.* have  
411 previously demonstrated that under iron-restricted conditions, expression of IsdC promotes biofilm  
412 accumulation. Here, we showed for the first time that in RPMI, the biofilm ECM of the both strains  
413 contained proportionally less proteins but more polysaccharides than in rich medium, suggesting that  
414 polysaccharides play a more relevant role in the structural integrity of the biofilm in iron restricted  
415 conditions. It should be emphasized that white calcofluor labels  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 polysaccharide  
416 linkages, whereas staphylococcal ECM has been described as mainly composed of PNAG which  
417 contain  $\beta$ -1-6 linkages(Arciola et al. 2015). Thus, this suggests that polysaccharides other than PNAG  
418 would compose the biofilm matrix of some *S. lugdunensis* strains (Vandana et Das 2022).

419 While DNase and proteinase K equally inhibited biofilm formation of SL-55 strain in the same way  
420 in rich medium, the proportion of DNA detected by DDAO labeling in CLSM images was much lower  
421 than protein labeling by SYPRO ruby. This could suggest that eDNA plays a key role during the early  
422 stages of biofilm formation in this strain, but is not an abundant component in the final matrix. This  
423 result is in line with that of Qian *et al.* who did not detected eDNA as a major biofilm component for

424 their 24 clinical strains studied (Qian et al. 2021). The presence of eDNA detected by DDAO staining  
425 was different for the two strains and correlated with the rate of dead cells detected in the biofilm ECM  
426 of 03MC in both media. As a result, the accumulation of eDNA in the biofilm of these two strains  
427 seems to be linked to different mechanisms, mainly related to cell-lysis for 03MC (Gibert et al. 2014;  
428 Hussain et al. 2015) and to an alternative cell-lysis-independent mechanisms for SL-55, as proposed  
429 by Rajendran et al. (Rajendran et al. 2015).

430 Studying the protein composition of the matrix is important for understanding bacterial lifestyle and  
431 developing new therapeutic options against biofilm-associated infections. Very few studies have  
432 investigated the protein composition of staphylococcal biofilm matrix and none involved *S.*  
433 *lugdunensis*. The ECM proteome analysis was carried out for the biofilm producer strains 03MC (CC3)  
434 and SL-55 (CC6). A total of 322 proteins were identified, which was in agreement with previous studies  
435 on staphylococcal ECM reporting between 33 and 488 proteins according to the methodology and  
436 significance score used, as well as species studied (*S. aureus* or *S. epidermidis*) (Gil et al. 2014;  
437 Muthukrishnan et al. 2011; Hiltunen et al. 2019; Lei, Gupta, et Lee 2017; Martínez-García et al. 2021).

438 The vast majority of the proteins identified in this study were intracytoplasmic proteins (71%) in  
439 accordance with Martínez-García *et al.* who reported 86.2% of intracellular proteins in static *S.*  
440 *epidermidis* biofilm using LC-MS/MS (Martínez-García et al. 2021). Similar results were obtained for  
441 *S. aureus* flow biofilms (60% intracellular proteins) (Graf et al. 2019) and *S. aureus* biofilm in a rat  
442 implant model (Lei, Gupta, et Lee 2017). These intracellular proteins may originate from cell lysis  
443 within the biofilm, which can be autolysis-dependant (Speziale et al. 2014) (one extracellular autolysin  
444 identified in the ECM of our strains), from non-classical protein export by a yet unknown pathway or  
445 from mechanical cell lysis during ECM extraction, e.g. by excessive agitation. Of the intracellular  
446 proteins identified here, 12.4% only were ribosomal proteins compared to Martínez *et al.*' study (27%  
447 of total ECM proteins). The accumulation of cytoplasmic proteins, such as ribosomal proteins or  
448 virulence factors, on the cell surface under biofilm-inducing conditions could correspond to a  
449 "moonlighting" strategy to stabilize biofilm structure by electrostatic bonds with other ECM  
450 compounds, and/or to mediate host attachment or facilitate interspecies interactions (Graf et al. 2019;  
451 Foulston et al. 2014).

452 Among the 20 most abundant matrix proteins identified in both strains was LytR, a transcriptional  
453 regulator belonging to the two-component regulatory system LytSR that has been shown to be involved  
454 in biofilm formation in *S. lugdunensis* (Lehman et al. 2015; Dahyot et al. 2020). Furthermore, a LysM  
455 peptidoglycan-binding domain-containing protein was identified. In *S. aureus*, the LysM (Lysin Motif)  
456 domain of proteins mediates adherence to the extracellular matrix fibrinogen, fibronectin and  
457 vitronectin (Hirschhausen et al. 2012). Interestingly, an LTA synthase was also found, necessary for  
458 the synthesis of teichoic acids, which is important for initial adhesion to biotic surfaces (Schilcher et  
459 Horswill 2020).

460 KEGG analyzes revealed the enrichment of the two *S. lugdunensis* strains biofilm matrix in proteins  
461 involved in the metabolic pathway, and particularly the carbohydrate metabolism, as previously  
462 described in *S. aureus* and *S. epidermidis* (Gil et al. 2014; Martínez-García et al. 2021; Malviya et al.  
463 2023). In particular, we have identified a large number of proteins involved in glycolysis and  
464 gluconeogenesis, whereas few TCA cycle proteins were found. Studies comparing planktonic and  
465 biofilm cell proteomes have shown that biofilms exhibit unique metabolic patterns with significant  
466 metabolic reprogramming. In particular, glycolytic enzymes have been identified in biofilm, such as  
467 the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which is highly expressed in *S.*  
468 *aureus* biofilm (Malviya et al. 2023). This enzyme has also been identified as highly abundant in the

469 *S. lugdunensis* biofilm matrix, especially that of the 03MC strain (**Table 1**). Martinez *et al.* did not  
470 identified any TCA cycle proteins in *S. epidermidis* biofilm matrix. They proposed that because  
471 pyruvate dehydrogenase was not enriched or not present, the TCA cycle was not active and did not  
472 affect the transcription of the *icaADBC* operon to drive biofilm formation (Martínez-García *et al.*  
473 2021). On the contrary, in *S. aureus* biofilm formation was initiated by metabolites produced by the  
474 TCA cycle by activating the transcription of *icaADBC* operon (Malviya *et al.* 2023). It would be  
475 interesting in a future study to compare proteomes of planktonic versus biofilm cultures to confirm the  
476 involvement of these metabolic pathways in *S. lugdunensis* biofilm formation, and also to carry out  
477 metabolomic studies using metabolic techniques such as nuclear magnetic resonance (Malviya *et al.*  
478 2023).

479  
480 Membrane proteins accounted for 13% of the proteins identified in the matrix biofilm of *S. lugdunensis*,  
481 a rate higher than that of Martinez *et al.* who identified 6.9% of membrane proteins in the biofilm of  
482 *S. epidermidis* (Martínez-García *et al.* 2021). Among the membrane proteins, 8 were ABC transporters,  
483 whose could be involved in excretion of cytoplasmic proteins or in nutrient acquisition. Also found  
484 were LPXTG anchor domain surface proteins, which could be involved in initial adhesion to biotic  
485 supports (Foster 2019). Three LPXTG-containing surface proteins were identified in *S. lugdunensis*  
486 matrix biofilm, including two Isd proteins (IsdA and IsdB). These proteins belongs to the microbial  
487 surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) family, previously  
488 described in *S. aureus* biofilm. Muthukrishnan *et al.* identified SasD and SrdH in the *S. aureus* carrier  
489 exoproteome and Lei *et al.* the IsdA protein in the proteome of *S. aureus* biofilm matrix in a rat model  
490 of orthopedic implant-associated infection (Lei, Gupta, et Lee 2017). IsdC from *S. lugdunensis* has  
491 been shown to induce biofilm formation under low-iron growth conditions (Missineo *et al.* 2014). The  
492 identification in our study of Isd proteins in the proteome of the matrix biofilm cultured in TSBG  
493 suggests that the expression of the locus would not be limited to the iron-restricted conditions but  
494 extended to conditions encountered in the biofilm.

495 Our study was the first to investigate the biofilm-forming capacity for such a large collection of *S.*  
496 *lugdunensis* strains in rich- and iron-restricted media. We demonstrated that biofilm formation and  
497 composition were strongly correlated with CC affiliation and iron availability. Characterization of the  
498 *S. lugdunensis* biofilm exoproteome revealed that the extracellular matrix proteins were predominantly  
499 metabolic proteins and more specifically carbohydrate metabolism proteins. This study is important  
500 because, given the pathogenicity of this species, understanding biofilm formation and composition  
501 would enable to define new therapeutic targets to eradicate it.

KEGG accession number (slg)	Description	03MC mean normalized abundance	KEGG accession number (slg)	Description	SL55 mean normalized abundance
<b>SLGD_02212</b>	<b>hypothetical protein</b>	<b>4 103 058</b>	<b>slg:SLGD_02450</b>	<b>LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein</b>	<b>2 822 056</b>
<b>SLGD_00206</b>	<b>hypothetical protein</b>	<b>3 764 841</b>	<i>NA</i>	<b>hypothetical protein, partial</b>	<b>2 452 216</b>
<b>SLGD_02116</b>	<b>LTA synthase family protein</b>	<b>1 503 790</b>	<b>slg:SLGD_02212</b>	<b>hypothetical protein</b>	<b>2 434 684</b>
SLGD_02520	hypothetical protein	876 603	<b>slg:SLGD_00206</b>	<b>hypothetical protein</b>	<b>1 802 608</b>
<i>NA</i>	<b>hypothetical protein, partial</b>	<b>757 157</b>	slg:SLGD_01434	HU family DNA-binding protein	801 404
SLGD_00424	transglycosylase	692 462	<b>slg:SLGD_00246</b>	<b>ornithine decarboxylase</b>	<b>721 059</b>
SLGD_00799	50S ribosomal protein L17	453 072	slg:SLGD_00154	hypothetical protein	656 332
SLGD_01782	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha	442 000	<b>slg:SLGD_02076</b>	<b>autolysin</b>	<b>469 340</b>
<b>SLGD_02050</b>	<b>phosphopyruvate hydratase</b>	<b>438 039</b>	<b>slg:SLGD_02329</b>	<b>alanine dehydrogenase</b>	<b>463 263</b>
SLGD_02054	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	433 877	<b>slg:SLGD_02116</b>	<b>LTA synthase family protein</b>	<b>463 015</b>
<b>SLGD_00246</b>	<b>ornithine decarboxylase</b>	<b>369 162</b>	<b>slg:SLGD_02481</b>	<b>peroxiredoxin</b>	<b>342 631</b>
<b>SLGD_01781</b>	<b>alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta</b>	<b>361 848</b>	<b>slg:SLGD_02050</b>	<b>phosphopyruvate hydratase</b>	<b>284 882</b>
<b>SLGD_02450</b>	<b>LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein</b>	<b>358 060</b>	slg:SLGD_01896	glucose-6-phosphate isomerase	284 526
<b>SLGD_02329</b>	<b>alanine dehydrogenase</b>	<b>241 270</b>	slg:SLGD_00449	CHAP domain-containing protein	257 182
<b>SLGD_02076</b>	<b>autolysin</b>	<b>229 638</b>	slg:SLGD_02252	hypothetical protein	242 309
SLGD_00388	fructose biphosphate aldolase	219 062	slg:SLGD_00924	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	231 844
<b>SLGD_02481</b>	<b>peroxiredoxin</b>	<b>146 527</b>	slg:SLGD_00048	L-lactate dehydrogenase	201 321
SLGD_01592	glycerol kinase	133 189	<b>slg:SLGD_01781</b>	<b>alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta</b>	<b>183 694</b>
SLGD_00876	DNA starvation/stationary phase protection protein	131 670	slg:SLGD_01582	type I glutamate--ammonia ligase	183 598
SLGD_02472	IMP dehydrogenase	126 077	slg:SLGD_00876	DNA starvation/stationary phase protection protein	174 306

503

504

505

**Table 1. The 20 most abundant proteins identified in the biofilm matrix of 03MC and SL-55 strains.** In bold proteins common to the two strains.

506

## 507 6 Figure legends

508 **Figure 1.** Biofilm formation (A) in rich medium (TSBG) for 49 *S. lugdunensis* strains and (B) in iron  
509 deficient medium (RPMI + 1 % CAS) for 34 *S. lugdunensis* strains. Biofilm formation was evaluated  
510 by crystal violet in 96-well microtiter plates. Strains were classified as strong ( $4 \times \text{ODc} < \text{OD}$ ),  
511 moderate ( $2 \times \text{ODc} < \text{OD} \leq 4 \times \text{ODc}$ ), weak ( $\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \times \text{ODc}$ ) and non-biofilm producers ( $\text{OD}$   
512  $\leq \text{ODc}$ ) according to the final OD value.  $\text{ODc} = \text{Average OD}_{590 \text{ nm}}^{\text{blank}} + 3 * \text{Standard Deviation}^{\text{blank}}$ .  
513 Strains were classified by CC, and within each CC by decreasing order of biofilm formation.

514  
515 **Figure 2.** Comparison of biofilm formation for 34 *S. lugdunensis* strains according to the CCs in rich  
516 (TSBG, full bars) and iron-restricted (RPMI, dotted bars) medium. Error bars represent the standard  
517 deviation within each CC. Significance was identified as  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*) by Kruskal–  
518 Wallis test and post hoc Dunn test.

519  
520 **Figure 3.** Biofilm inhibition assay with DNase I (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), proteinase K (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) and  
521 metaperiodate (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) for 03MC and SL-55 strains. Error bars represent the standard deviation of  
522 stained biofilm. Significance was identified as  $p < 0.01$  (\*\*) by Wilcoxon Mann Whitney test.

523  
524 **Figure 4.** *S. lugdunensis* biofilm assessed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) for 03MC  
525 and SL-55 strains in rich medium (TSBG) and iron restricted condition (RPMI). (A) Biofilm  
526 composition in terms of living (green) and dead (red) cells (live/dead staining). (B) Biofilm matrix  
527 composition in proteins, polysaccharides and eDNA, labeled by SYPRO Ruby, calcofluor and 1,3-  
528 dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO), respectively.

529 **Figure 5.** Analysis of *S. lugdunensis* biofilm by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in rich  
530 medium (TSBG) for 03MC and SL-55 strains. Biofilms were visualized after (A) live (green)/ dead  
531 (red) (B) SYPRO ruby (red) (C) 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO)  
532 (red) and (D) white calcofluor (blue) staining. Three-dimensional structural images were reconstructed  
533 using Zen 2.1 SP1 zen software.

534  
535 **Figure 6.** Analysis of *S. lugdunensis* biofilm by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in iron  
536 restricted medium (RPMI) for 03MC and SL-55 strains. Biofilms were visualized after (A) live (green)/  
537 dead (red) (B) SYPRO ruby (red) (C) 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO)  
538 (red) and (D) white calcofluor (blue) staining. Three-dimensional structural images were reconstructed  
539 using Zen 2.1 SP1 zen software.

540  
541 **Figure 7.** Functional classification according to KEGG pathways of proteins identified in the biofilm  
542 matrix of *S. lugdunensis* 03MC and SL-55 strains (full bars), and overexpressed in 03MC (hatched  
543 bars) and SL-55 (dotted bars).

544

545 **7 Conflict of Interest**

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

548 **8 Author Contributions**

549 Conceptualization of this work : SD, MPC, LD, SC, and ED. XA and GP provided 26 strains.  
550 Methodology, experimental tests and acquisition of data: LD, LC, MB, and MG. Analysis and  
551 interpretation of data: LD, SD, LC, MB, NN, ED; SC and MPC. Writing-original draft preparation:  
552 LD, SD, and MPC.

553 **9 Funding**

554 This study was supported by funding from University of Rouen Normandie

555 **10 Acknowledgments**

556 The authors would like to thank the PISSARO Platform HERACLES US 51 UAR 2026 of Rouen  
557 Normandy University for LC-MS/MS analyses

558 **11 Supplementary Material**

559 The Supplementary material for this article can be found online at XXX

560 **12 Data Availability Statement**

561 The datasets [GENERATED/ANALYZED] for this study can be found in the [NAME OF  
562 REPOSITORY] [LINK]. Please see the “Availability of data” section of [Materials and data policies in  
563 the Author guidelines](#) for more details.

564

565 **13 References**

- 566 Arciola, Carla Renata, Davide Campoccia, Stefano Ravaioli, et Lucio Montanaro. 2015.  
567 « Polysaccharide Intercellular Adhesin in Biofilm: Structural and Regulatory Aspects ». *Frontiers in*  
568 *Cellular and Infection Microbiology* 5 (février). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007>.
- 569 Argemi, Xavier, Yves Hansmann, Philippe Riegel, et Gilles Prévost. 2017. « Is Staphylococcus  
570 Lugdunensis Significant in Clinical Samples? » Édité par Colleen Suzanne Kraft. *Journal of Clinical*  
571 *Microbiology* 55 (11): 3167-74. <https://doi.org/10.1128/JCM.00846-17>.
- 572 Argemi, Xavier, Gilles Prévost, Philippe Riegel, Christian Provot, Stéphanie Badel-Berchoux,  
573 François Jehl, Elodie Olivares, et Yves Hansmann. 2017. « Kinetics of Biofilm Formation by  
574 Staphylococcus Lugdunensis Strains in Bone and Joint Infections ». *Diagnostic Microbiology and*  
575 *Infectious Disease* 88 (4): 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002>.
- 576 Aubourg, Marion, Anne Dhalluin, François Gravey, Marine Pottier, Nicolas Thomy, Benoit Bernay,  
577 Didier Goux, Matthieu Martineau, et Jean-Christophe Giard. 2020. « Phenotypic and Proteomic  
578 Approaches of the Response to Iron-Limited Condition in Staphylococcus Lugdunensis ». *BMC*  
579 *Microbiology* 20 (1): 328. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02016-x>.
- 580 Chassain, Benoît, Ludovic Lemée, Jennifer Didi, Jean-Michel Thiberge, Sylvain Brisse, Jean-Louis  
581 Pons, et Martine Pestel-Caron. 2012. « Multilocus Sequence Typing Analysis of Staphylococcus  
582 Lugdunensis Implies a Clonal Population Structure ». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (9): 3003-9.  
583 <https://doi.org/10.1128/JCM.00988-12>.
- 584 Cheng, Chun-wen, Tsui-ping Liu, Chun-fu Yeh, Ming-hsun Lee, Shih-cheng Chang, et Jang-jih Lu.  
585 2015. « Persistence of a Major Endemic Clone of Oxacillin-Resistant Staphylococcus Lugdunensis  
586 Sequence Type 6 at a Tertiary Medical Centre in Northern Taiwan ». *International Journal of*  
587 *Infectious Diseases* 36 (juillet): 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.05.022>.
- 588 Chiba, Akio, Shinya Sugimoto, Fumiya Sato, Seiji Hori, et Yoshimitsu Mizunoe. 2015. « A Refined  
589 Technique for Extraction of Extracellular Matrices from Bacterial Biofilms and Its Applicability ». *Microbial Biotechnology* 8 (3): 392-403. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12155>.
- 591 Dahyot, Sandrine, Jérémie Lebeurre, Xavier Argemi, Patrice François, Ludovic Lemée, Gilles Prévost,  
592 et Martine Pestel-Caron. 2018. « Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)  
593 and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), Helpful Tools for Subtyping Staphylococcus  
594 Lugdunensis ». *Scientific Reports* 8 (1): 11669. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30144-y>.
- 595 Dahyot, Sandrine, Jérémie Lebeurre, Floriane Laumay, Xavier Argemi, Charline Dubos, Ludovic  
596 Lemée, Gilles Prévost, Patrice François, et Martine Pestel-Caron. 2019. « Fbl-Typing of  
597 Staphylococcus Lugdunensis: A Frontline Tool for Epidemiological Studies, but Not Predictive of  
598 Fibrinogen Binding Ability ». *Frontiers in Microbiology* 10 (mai): 1109.  
599 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01109>.
- 600 Dahyot, Sandrine, Virginie Oxaran, Maïté Niepceon, Eddy Dupart, Stéphanie Legris, Laurie Destruel,  
601 Jennifer Didi, et al. 2020. « Role of the LytSR Two-Component Regulatory System in Staphylococcus  
602 Lugdunensis Biofilm Formation and Pathogenesis ». *Frontiers in Microbiology* 11 (janvier): 39.  
603 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00039>.

- 604 Foster, Timothy J. 2019. « The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-  
605 Positive Cocci ». *Trends in Microbiology* 27 (11): 927-41. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.007>.
- 606 Foulston, Lucy, Alexander K. W. Elsholz, Alicia S. DeFrancesco, et Richard Losick. 2014. « The  
607 Extracellular Matrix of Staphylococcus Aureus Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That  
608 Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing PH ». Édité par B. Brett Finlay. *MBio* 5 (5):  
609 e01667-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01667-14>.
- 610 Frank, Kristi L., et Robin Patel. 2007. « Poly- N -Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the  
611 Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *IcaADBC* -Positive *Staphylococcus Lugdunensis*  
612 Isolates ». *Infection and Immunity* 75 (10): 4728-42. <https://doi.org/10.1128/IAI.00640-07>.
- 613 Gibert, Laure, Jennifer Didi, Lennart Marlinghaus, Olivier Lesouhaitier, Stéphanie Legris, Florian  
614 Szabados, Jean-Louis Pons, et Martine Pestel-Caron. 2014. « The Major Autolysin of *Staphylococcus*  
615 *Lugdunensis*, AtlL, Is Involved in Cell Separation, Stress-Induced Autolysis and Contributes to  
616 Bacterial Pathogenesis ». *FEMS Microbiology Letters* 352 (1): 78-86. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12374>.
- 618 Gil, Carmen, Cristina Solano, Saioa Burgui, Cristina Latasa, Begoña García, Alejandro Toledo-Arana,  
619 Iñigo Lasa, et Jaione Valle. 2014. « Biofilm Matrix Exoproteins Induce a Protective Immune Response  
620 against Staphylococcus Aureus Biofilm Infection ». Édité par A. Camilli. *Infection and Immunity* 82  
621 (3): 1017-29. <https://doi.org/10.1128/IAI.01419-13>.
- 622 Graf, Alexander C., Anne Leonard, Manuel Schäuble, Lisa M. Rieckmann, Juliane Hoyer, Sandra  
623 Maass, Michael Lalk, Dörte Becher, Jan Pané-Farré, et Katharina Riedel. 2019. « Virulence Factors  
624 Produced by Staphylococcus Aureus Biofilms Have a Moonlighting Function Contributing to Biofilm  
625 Integrity ». *Molecular & Cellular Proteomics* 18 (6): 1036-53.  
626 <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001120>.
- 627 Hagstrand Aldman, Malin, Olof Thompson, et Lisa I. Pählman. 2023. « Biofilm Formation Is  
628 Associated with Poor Outcome in Prosthetic Joint Infections Caused by *Staphylococcus Lugdunensis* ». *Infectious Diseases*, février, 1-5. <https://doi.org/10.1080/23744235.2023.2180534>.
- 630 Heilbronner, Simon, et Timothy J Foster. 2021. « Staphylococcus Lugdunensis: A Skin Commensal  
631 with Invasive Pathogenic Potential ». *Clinical Microbiology Reviews* 34 (2): 18.
- 632 Herry, Yannick, Olivier Lesens, Gaele Bourgeois, Mylène Maillet, Romain Bricca, Céline Cazorla,  
633 Judith Karsenty, et al. 2022. « Staphylococcus Lugdunensis Prosthetic Joint Infection: A Multicentric  
634 Cohort Study ». *Journal of Infection* 85 (6): 652-59. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.10.025>.
- 635 Hiltunen, Anna K., Kirsi Savijoki, Tuula A. Nyman, Ilkka Miettinen, Petri Ihalainen, Jouko Peltonen,  
636 et Adyary Fallarero. 2019. « Structural and Functional Dynamics of Staphylococcus Aureus Biofilms  
637 and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials ». *Microorganisms* 7 (12): 584.  
638 <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120584>.
- 639 Hirschhausen, Nina, Tim Schlesier, Georg Peters, et Christine Heilmann. 2012. « Characterization of  
640 the Modular Design of the Autolysin/Adhesin Aaa from Staphylococcus Aureus ». Édité par Michael  
641 Hensel. *PLoS ONE* 7 (6): e40353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040353>.

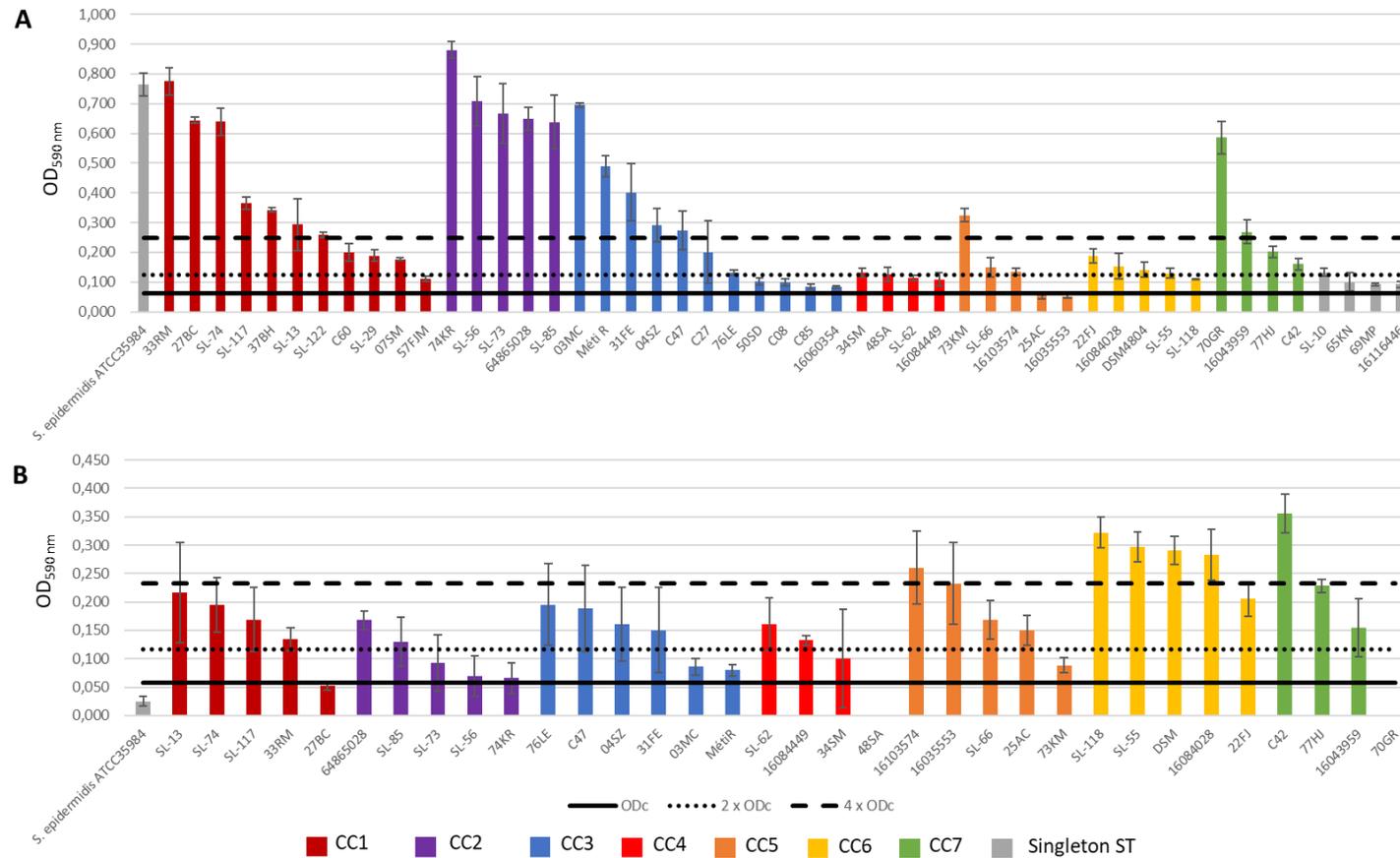
- 642 Ho, Pak-Leung, Sammy Man-Him Leung, Kin-Hung Chow, Cindy Wing-Sze Tse, Vincent Chi-Chung  
643 Cheng, Herman Tse, Siu-Ka Mak, et Wai-Kei Lo. 2015. « Carriage Niches and Molecular  
644 Epidemiology of *Staphylococcus Lugdunensis* and Methicillin-Resistant *S. Lugdunensis* among  
645 Patients Undergoing Long-Term Renal Replacement Therapy ». *Diagnostic Microbiology and*  
646 *Infectious Disease* 81 (2): 141-44. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.10.004>.
- 647 Hussain, Muzaffar, Tim Steinbacher, Georg Peters, Christine Heilmann, et Karsten Becker. 2015.  
648 « The Adhesive Properties of the *Staphylococcus Lugdunensis* Multifunctional Autolysin AtlL and Its  
649 Role in Biofilm Formation and Internalization ». *International Journal of Medical Microbiology* 305  
650 (1): 129-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.010>.
- 651 Kogan, Grigorij, Irina Sadovskaya, Philippe Chaignon, Ali Chokr, et Saïd Jabbouri. 2006. « Biofilms  
652 of Clinical Strains of *Staphylococcus* That Do Not Contain Polysaccharide Intercellular Adhesin ». *FEMS Microbiology Letters* 255 (1): 11-16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00043.x>.
- 654 Lebeaux, D., J.-M. Ghigo, et C. Beloin. 2014. « Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between  
655 Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics ». *Microbiology*  
656 *and Molecular Biology Reviews* 78 (3): 510-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>.
- 657 Lebeurre, Jérémie, Sandrine Dahyot, Seydina Diene, Amandine Paulay, Marion Aubourg, Xavier  
658 Argemi, Jean-Christophe Giard, Isabelle Tournier, Patrice François, et Martine Pestel-Caron. 2019.  
659 « Comparative Genome Analysis of *Staphylococcus Lugdunensis* Shows Clonal Complex-Dependent  
660 Diversity of the Putative Virulence Factor, Ess/Type VII Locus ». *Frontiers in Microbiology* 10  
661 (octobre): 2479. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02479>.
- 662 Lehman, McKenzie K., Jeffrey L. Bose, Batu K. Sharma-Kuinkel, Derek E. Moormeier, Jennifer L.  
663 Endres, Marat R. Sadykov, Indranil Biswas, et Kenneth W. Bayles. 2015. « Identification of the Amino  
664 Acids Essential for LytSR-Mediated Signal Transduction in *S. Taphylococcus Aureus* and Their Roles  
665 in Biofilm-Specific Gene Expression: Defining LytSR Signal Transduction ». *Molecular Microbiology*  
666 95 (4): 723-37. <https://doi.org/10.1111/mmi.12902>.
- 667 Lei, Mei G., Ravi Kr. Gupta, et Chia Y. Lee. 2017. « Proteomics of *Staphylococcus Aureus* Biofilm  
668 Matrix in a Rat Model of Orthopedic Implant-Associated Infection ». Édité par Mohamed N. Seleem.  
669 *PLOS ONE* 12 (11): e0187981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187981>.
- 670 Malviya, Jitendra, Ameer A. Alameri, Saif S. Al-Janabi, Omar Faridh Fawzi, Ahmed L. Azzawi, Rasha  
671 Fadhel Obaid, Ali A Alsudani, et al. 2023. « Metabolomic Profiling of Bacterial Biofilm: Trends,  
672 Challenges, and an Emerging Antibiofilm Target ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology*  
673 39 (8): 212. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03651-y>.
- 674 Martínez-García, Sergio, Humberto Peralta, Gabriel Betanzos-Cabrera, Leslie Chavez-Galan, Sandra  
675 Rodríguez-Martínez, Mario E. Cancino-Díaz, et Juan C. Cancino-Díaz. 2021. « Proteomic Comparison  
676 of Biofilm vs. Planktonic *Staphylococcus Epidermidis* Cells Suggests Key Metabolic Differences  
677 between These Conditions ». *Research in Microbiology* 172 (2): 103796.  
678 <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.103796>.
- 679 Missineo, Antonino, Antonella Di Poto, Joan A. Geoghegan, Simonetta Rindi, Simon Heilbronner,  
680 Valentina Gianotti, Carla Renata Arciola, Timothy J. Foster, Pietro Speziale, et Giampiero Pietrocola.  
681 2014. « IsdC from *Staphylococcus Lugdunensis* Induces Biofilm Formation under Low-Iron Growth

- 682 Conditions ». Édité par A. Camilli. *Infection and Immunity* 82 (6): 2448-59.  
683 <https://doi.org/10.1128/IAI.01542-14>.
- 684 Muthukrishnan, Gowrishankar, Gerry A. Quinn, Ryan P. Lamers, Carolyn Diaz, Amy L. Cole, Sixue  
685 Chen, et Alexander M. Cole. 2011. « Exoproteome of *Staphylococcus Aureus* Reveals Putative  
686 Determinants of Nasal Carriage ». *Journal of Proteome Research* 10 (4): 2064-78.  
687 <https://doi.org/10.1021/pr200029r>.
- 688 Naicker, Preneshni R., Karayem Karayem, Kim G.P. Hoek, Justin Harvey, et Elizabeth Wasserman.  
689 2016. « Biofilm Formation in Invasive *Staphylococcus Aureus* Isolates Is Associated with the Clonal  
690 Lineage ». *Microbial Pathogenesis* 90 (janvier): 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.023>.
- 691 Panda, Sasmita, et Durg Vijai Singh. 2018. « Biofilm Formation by Ica-Negative Ocular Isolates of  
692 *Staphylococcus Haemolyticus* ». *Frontiers in Microbiology* 9 (novembre): 2687.  
693 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02687>.
- 694 Pereira, Eliezer M., Cesar Augusto A. Teixeira, Ana Luiza M. Alvarenga, Ricardo P. Schuenck, Márcia  
695 Giambiagi-deMarval, Carla Holandino, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, et Kátia R. N. dos Santos. 2012.  
696 « A Brazilian Lineage of *Staphylococcus Lugdunensis* Presenting Rough Colony Morphology May  
697 Adhere to and Invade Lung Epithelial Cells ». *Journal of Medical Microbiology* 61 (4): 463-69.  
698 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033001-0>.
- 699 Qian, Weidong, Wenjing Wang, Jianing Zhang, Miao Liu, Yuting Fu, Mingming Li, Jing Jin, Wei Cui,  
700 et Chengbin Wang. 2021. « Equivalent Effect of Extracellular Proteins and Polysaccharides on Biofilm  
701 Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus Lugdunensis* ». *Biofouling* 37 (3): 327-40.  
702 <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1914021>.
- 703 Rajendran, Nithya Babu, Julian Eikmeier, Karsten Becker, Muzaffar Hussain, Georg Peters, et  
704 Christine Heilmann. 2015. « Important Contribution of the Novel Locus *ComEB* to Extracellular DNA-  
705 Dependent *Staphylococcus Lugdunensis* Biofilm Formation ». Édité par A. Camilli. *Infection and*  
706 *Immunity* 83 (12): 4682-92. <https://doi.org/10.1128/IAI.00775-15>.
- 707 Ravaioli, Stefano, Davide Campoccia, Pietro Speziale, Giampiero Pietrocola, Beata Zatorska,  
708 Alessandra Maso, Elisabeth Presterl, Lucio Montanaro, et Carla Renata Arciola. 2020. « Various  
709 Biofilm Matrices of the Emerging Pathogen *Staphylococcus Lugdunensis*: Exopolysaccharides,  
710 Proteins, EDNA and Their Correlation with Biofilm Mass ». *Biofouling* 36 (1): 86-100.  
711 <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1716217>.
- 712 Schilcher, Katrin, et Alexander R. Horswill. 2020. « Staphylococcal Biofilm Development: Structure,  
713 Regulation, and Treatment Strategies ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 84 (3): e00026-  
714 19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>.
- 715 Speziale, Pietro, Giampiero Pietrocola, Timothy J. Foster, et Joan A. Geoghegan. 2014. « Protein-  
716 Based Biofilm Matrices in Staphylococci ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4  
717 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00171>.
- 718 Stepanović, Srdjan, Dragana Vuković, Veronika Hola, Giovanni Di Bonaventura, Slobodanka Djukić,  
719 Ivana Ćirković, et Filip Ruzicka. 2007. « Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of  
720 Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by  
721 *Staphylococci* ». *APMIS* 115 (8): 891-99. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x).

- 722 Tasse, Jason, Sophie Trouillet-Assant, Jérôme Josse, Patricia Martins-Simões, Florent Valour, Carole  
723 Langlois-Jacques, Stéphanie Badel-Berchoux, et al. 2018. « Association between Biofilm Formation  
724 Phenotype and Clonal Lineage in Staphylococcus Aureus Strains from Bone and Joint Infections ». Édité  
725 par Christophe Beloin. *PLOS ONE* 13 (8): e0200064.  
726 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200064>.
- 727 Vandana, et Surajit Das. 2022. « Genetic Regulation, Biosynthesis and Applications of Extracellular  
728 Polysaccharides of the Biofilm Matrix of Bacteria ». *Carbohydrate Polymers* 291 (septembre):  
729 119536. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119536>.
- 730 Yeh, Chun-Fu, Shih-Cheng Chang, Chun-Wen Cheng, Jung-Fu Lin, Tsui-Ping Liu, et Jang-Jih Lu.  
731 2016. « Clinical Features, Outcomes, and Molecular Characteristics of Community- and Health Care-  
732 Associated Staphylococcus Lugdunensis Infections ». Édité par R. Patel. *Journal of Clinical  
733 Microbiology* 54 (8): 2051-57. <https://doi.org/10.1128/JCM.00847-16>.
- 734 Yu, Shengpeng, Bei Jiang, Chao Jia, Hongri Wu, Jie Shen, Xiaomei Hu, et Zhao Xie. 2020.  
735 « Investigation of Biofilm Production and Its Association with Genetic and Phenotypic Characteristics  
736 of OM (Osteomyelitis) and Non-OM Orthopedic Staphylococcus Aureus ». *Annals of Clinical  
737 Microbiology and Antimicrobials* 19 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00352-4>.
- 738

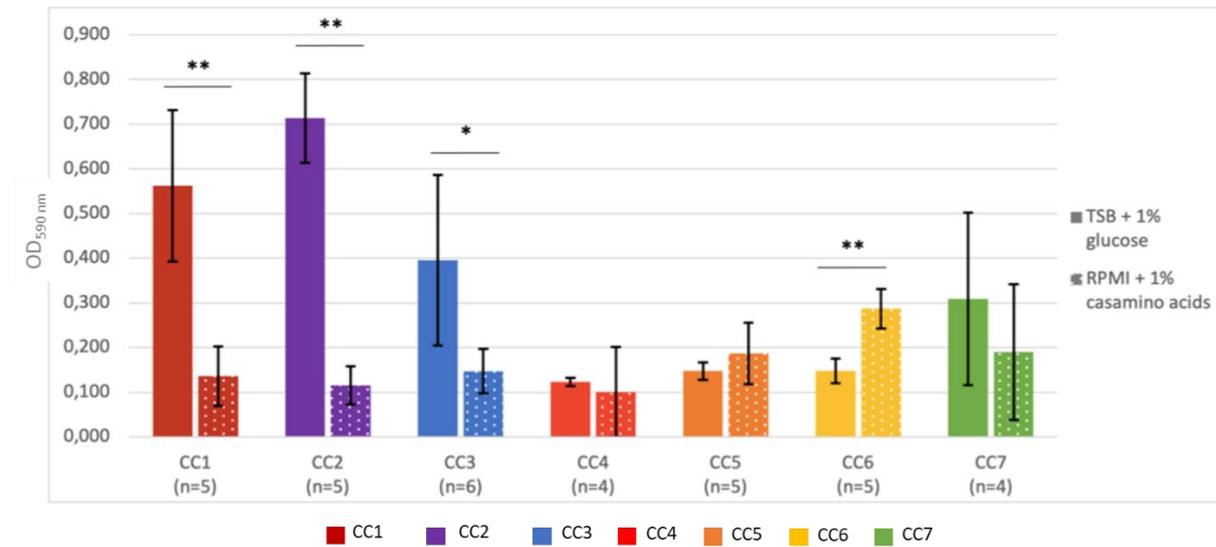
**Figure 1. Biofilm formation (A) in rich medium (TSBG) for 49 *S. lugdunensis* strains and (B) in iron deficient medium (RPMI + 1 % CAS) for 34 *S. lugdunensis* strains.**

Biofilm formation was evaluated by crystal violet in 96-well microtiter plates. Strains were classified as strong ( $4 \times \text{ODc} < \text{OD}$ ), moderate ( $2 \times \text{ODc} < \text{OD} \leq 4 \times \text{ODc}$ ), weak ( $\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \times \text{ODc}$ ) and non-biofilm producers ( $\text{OD} \leq \text{ODc}$ ) according to the final OD value.  $\text{ODc} = \text{Average OD}_{590 \text{ nm}}^{\text{blank}} + 3 * \text{Standard Deviation}^{\text{blank}}$ . Strains were classified by CC, and within each CC by decreasing order of biofilm formation.



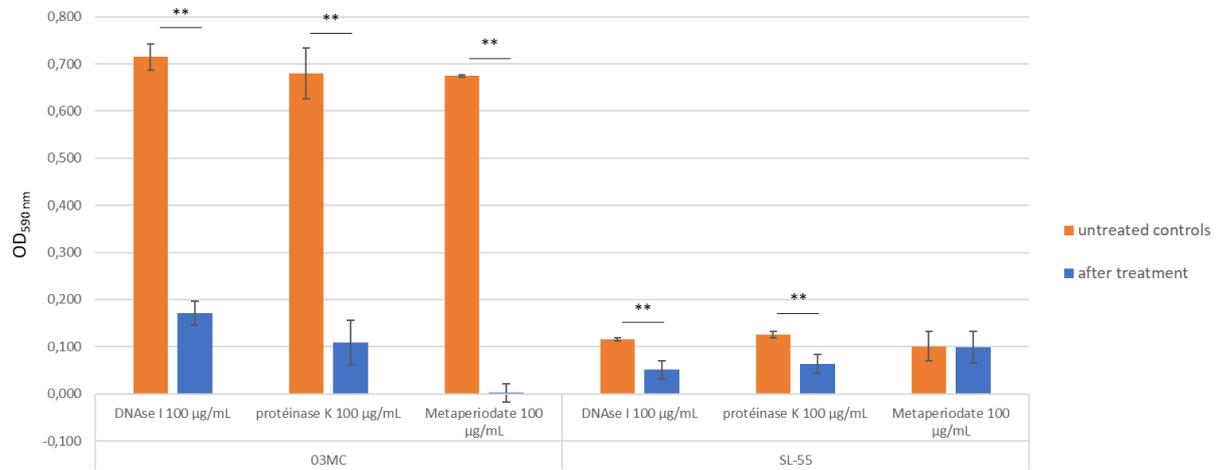
**Figure 2. Comparison of biofilm formation for 34 *S. lugdunensis* strains according to the CCs in rich (TSBG, full bars) and iron-restricted (RPMI, dotted bars) medium.**

Error bars represent the standard deviation within each CC. Significance was identified as  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*) by Kruskal–Wallis test and post hoc Dunn test.



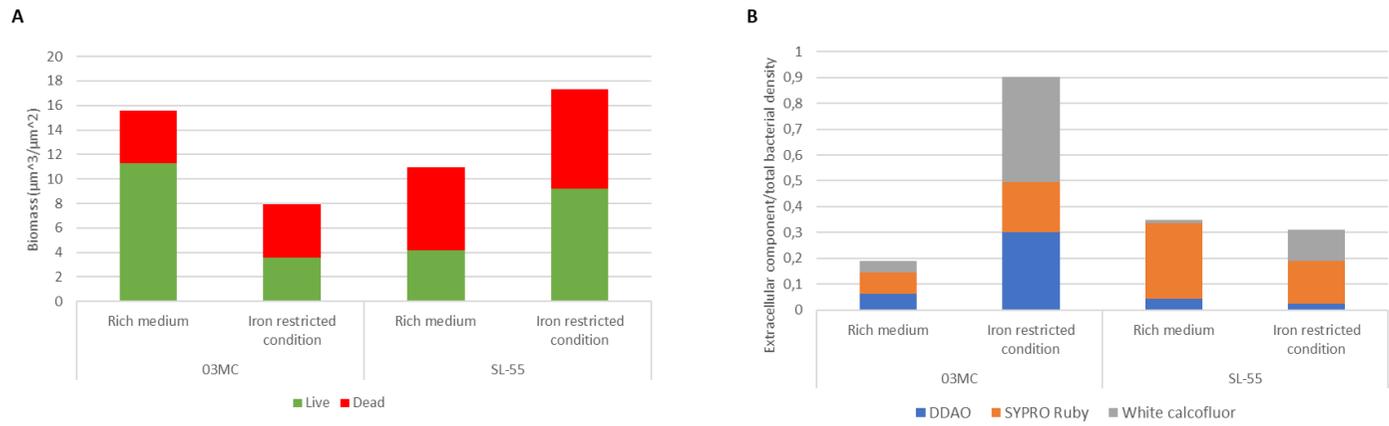
**Figure 3. Biofilm inhibition assay with DNase I (100µL/mL), proteinase K (100µL/mL) and metaperiodate (100µL/mL) for 03MC and SL-55 strains.**

Error bars represent the standard deviation of stained biofilm. Significance was identified as  $p < 0.01$  (\*\*) by Wilcoxon Mann Whitney test.



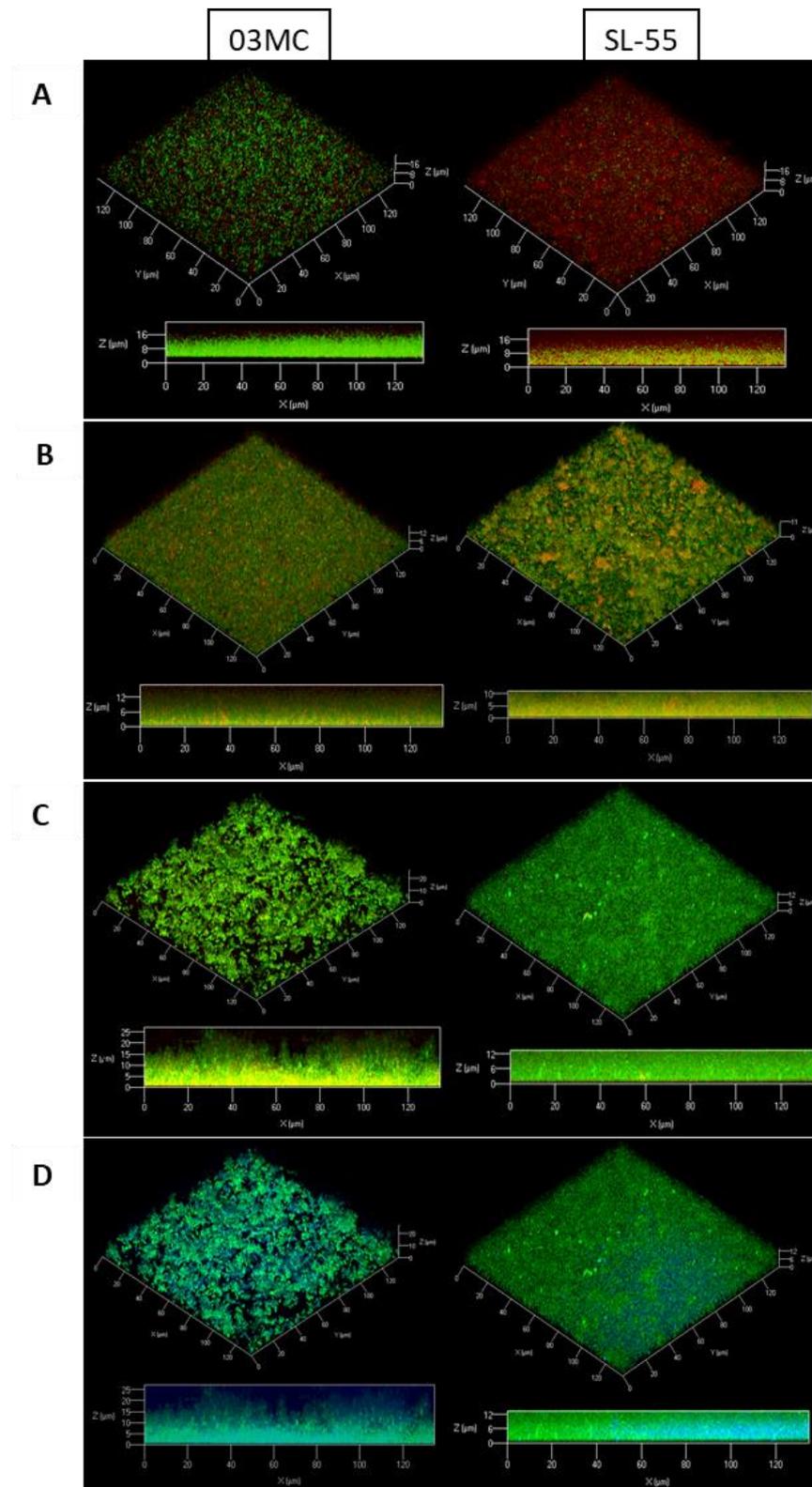
**Figure 4. *S. lugdunensis* biofilm assessed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) for 03MC and SL-55 strains in rich medium (TSBG) and iron restricted condition (RPMI).**

(A) Biofilm composition in terms of living (green) and dead (red) cells (live/dead staining). (B) Biofilm matrix composition in proteins, polysaccharides and eDNA, labeled by SYPRO Ruby, calcofluor and 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO), respectively.



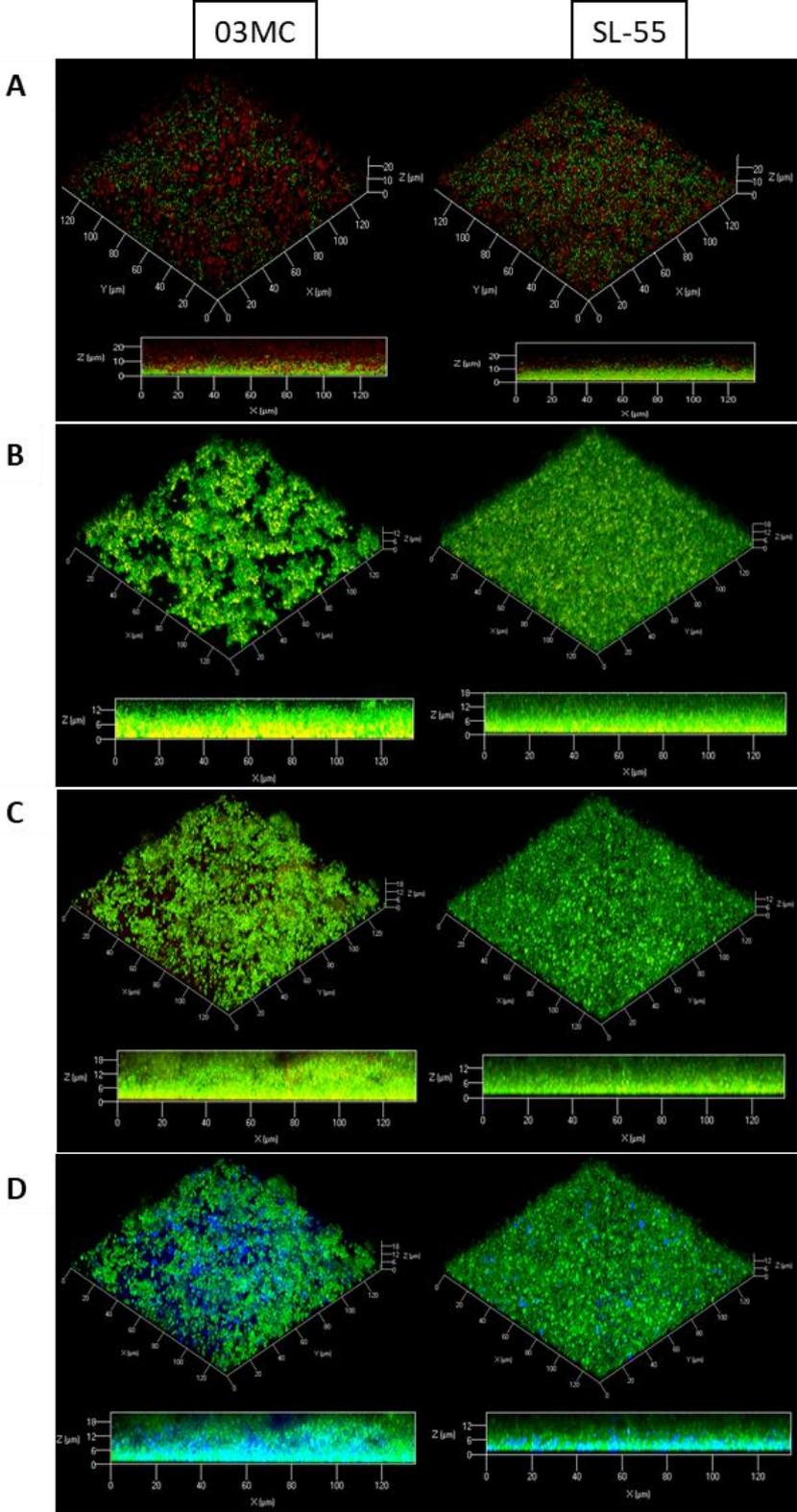
**Figure 5. Analysis of *S. lugdunensis* biofilm by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in rich medium (TSBG) for 03MC and SL-55 strains.**

Biofilms were visualized after (A) live (green)/ dead (red) (B) SYPRO ruby (red) (C) 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO) (red) and (D) white calcofluor (blue) staining. Three-dimensional structural images were reconstructed using Zen 2.1 SP1 zen software.

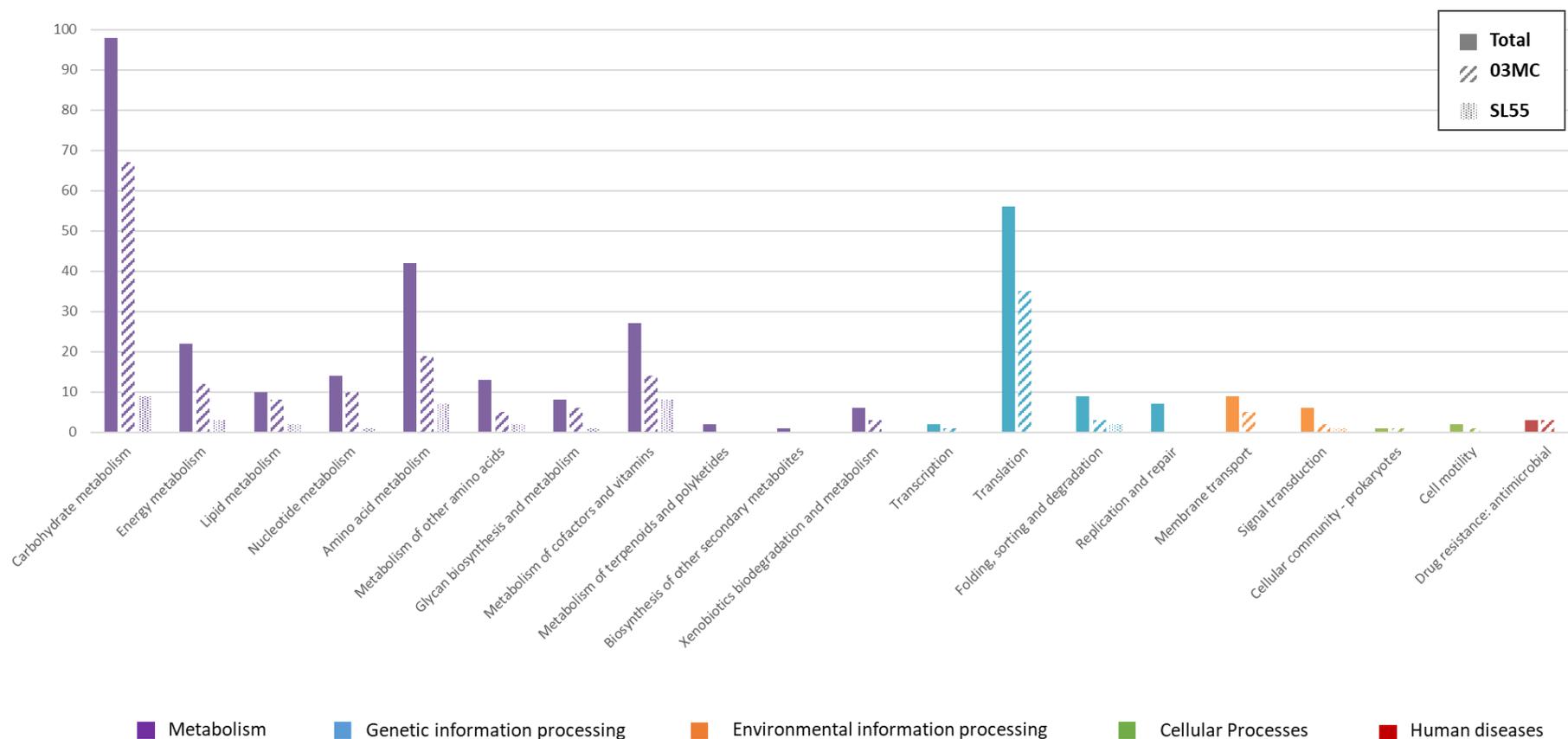


**Figure 6. Analysis of *S. lugdunensis* biofilm by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in iron restricted medium (RPMI) for 03MC and SL-55 strains.**

Biofilms were visualized after (A) live (green)/ dead (red) (B) SYPRO ruby (red) (C) 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO) (red) and (D) white calcofluor (blue) staining. Three-dimensional structural images were reconstructed using Zen 2.1 SP1 zen software.



**Figure 7. Functional classification according to KEGG pathways of proteins identified in the biofilm matrix of *S. lugdunensis* 03MC and SL-55 strains (full bars), and overexpressed in 03MC (hatched bars) and SL-55 (dotted bars).**





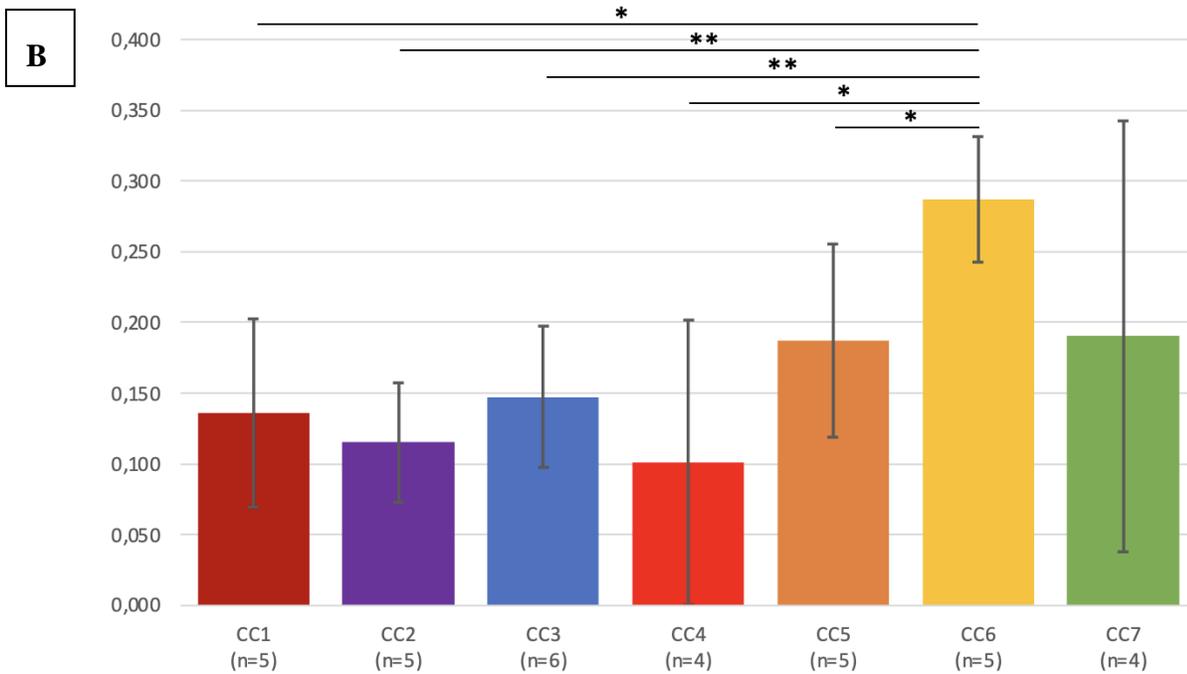
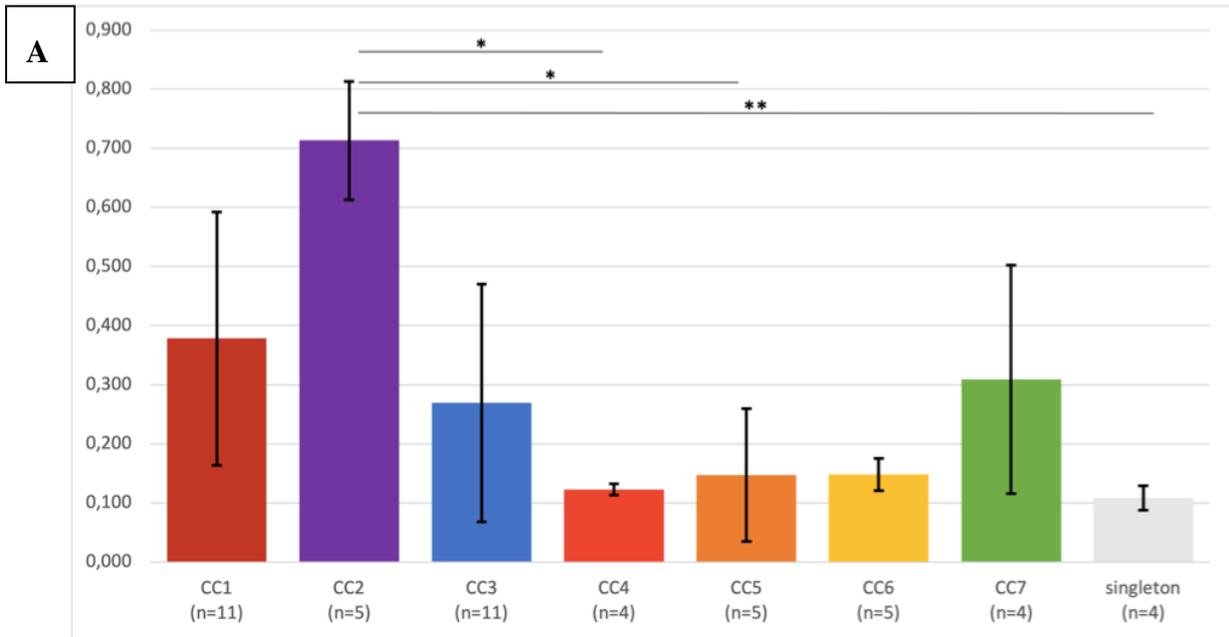
## *Supplementary Material*

### **Characterization of *Staphylococcus lugdunensis* biofilm reveals key differences according to clonal lineage and iron availability**

**Laurie Destruel<sup>1</sup>, Sandrine Dahyot<sup>2\*</sup>, Laurent Coquet<sup>3</sup>, Magalie Barreau<sup>4</sup>, Marie Leoz<sup>1</sup>, Maxime Grand<sup>1</sup>, Xavier Argemi<sup>5</sup>, Gilles Prevost<sup>5</sup>, Nicolas Nalpas<sup>3</sup>, Emmanuelle Dé<sup>3</sup>, Sylvie Chevalier<sup>4</sup>, Martine Pestel-Caron<sup>2</sup>**

\*Corresponding author: [sandrine.dahyot@chu-rouen.fr](mailto:sandrine.dahyot@chu-rouen.fr)

#### **1. Supplementary Figures**



**Supplementary Figure 1.** Biofilm formation of the 49 *S. lugdunensis* strains according to the CC in rich medium (A) and iron deficient medium (B). Significance was identified as  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*) by Kruskal–Wallis test and the post hoc Dunn Test.

## 2. Supplementary Tables

**Supplementary Table 1.** Characteristics and levels of biofilm production of the 49 clinical strains of *S. lugdunensis* studied. ND: No Data, -: no production of biofilm, +: weak production, ++: moderate production, +++: strong production, TSBG: Trypticase Soy Broth supplemented with 1% of glucose), RPMI: RPMI supplemented with 1% of casamino acids.

Strain	Clonal complex CC	Sequence typing (ST)	City	Clinical sources / sampling	Device (Y) or not (N)	Date of collection	Biofilm production (TSBG)	Biofilm production (RPMI)
57FJM	1	1	Strasbourg	Infection	N	2015	+	ND
SL_29	1	1	Rouen	Infection	Y	2007	++	ND
SL_122	1	1	Tours	Carriage	N	ND	+++	ND
37BH	1	1	Strasbourg	Infection	N	2014	+++	ND
SL_117	1	1	Kronoberg	Carriage	ND	ND	+++	++
07SM	1	6	Strasbourg	Infection	N	2014	++	ND
33RM	1	6	Strasbourg	Infection	N	2014	+++	++
SL_13	1	6	Rouen	Infection	ND	2001	+++	++
SL_74	1	12	Nancy	Infection	N	ND	+++	++
C60	1	12	Strasbourg	Carriage	Y	2014	++	ND
27BC	1	12	Strasbourg	Infection	Y	2014	+++	-
74KR	2	2	Strasbourg	Infection	N	2015	+++	+
SL_85	2	2	Montpellier	Infection	Y	2011	+++	++
SL_56	2	14	Nantes	Infection	N	ND	+++	+
SL_73	2	19	Nancy	Infection	N	ND	+++	+
64865028	2	ND	Rouen	Carriage	ND	2016	+++	++
C47	3	3	Strasbourg	Carriage	Y	2014	+++	++
C85	3	3	Strasbourg	Carriage	N	2015	+	ND
50SD	3	3	Strasbourg	Infection	Y	2015	+	ND
31FE	3	3	Strasbourg	Infection	N	2014	+++	++
C08	3	3	Strasbourg	Carriage	N	2013	+	ND
C27	3	3	Strasbourg	Carriage	N	2014	++	ND
03MC	3	3	Strasbourg	Infection	N	2013	+++	+
04SZ	3	3	Strasbourg	Infection	Y	2013	+++	++
76LE	3	3	Strasbourg	Infection	N	2015	++	++
16060354	3	ND	Rouen	Carriage	ND	2016	+	ND

## Supplementary Material

83815155	3	3	Rouen	Infection	Y	2018	+++	+
34SM	4	4	Strasbourg	Infection	N	2014	++	+
48SA	4	4	Strasbourg	Infection	N	2015	++	-
SL_62	4	17	Bordeaux	Infection	N	ND	+	++
16084449	4	ND	Rouen	Infection	ND	2016	+	++
25AC	5	5	Strasbourg	Infection	Y	2014	-	++
73KM	5	5	Strasbourg	Infection	Y	2015	+++	+
SL_66	5	18	Bordeaux	Infection	N	ND	++	++
16035553	5	ND	Rouen	Infection	ND	2016	-	+++
16103574	5	ND	Rouen	Infection	ND	2016	++	+++
SL_118	6	10	Kronoberg	Carriage	ND	ND	+	+++
SL_55	6	10	Nantes	Infection	ND	ND	++	+++
SL_DSM 4804	6	24	Lyon	Infection	N	ND	++	+++
22FJ	6	24	Strasbourg	Infection	N	2014	++	++
16084028	6	ND	Rouen	Infection	ND	2016	++	+++
77HJ	7	26	Strasbourg	Infection	Y	2015	++	++
C42	7	26	Strasbourg	Carriage	Y	2014	++	+++
70GR	7	27	Strasbourg	Infection	Y	2015	+++	-
16043959	7	ND	Rouen	Infection	N	2016	+++	++
SL_10	Singleton	13	Rouen	Infection	Y	2000	++	ND
65KN	Singleton	28	Strasbourg	Infection	N	2015	+	ND
69MP	Singleton	28	Strasbourg	Infection	N	2015	+	ND
16116446	Singleton	ND	Rouen	Carriage	ND	2016	+	ND

**Supplementary Table 2.** List of the 322 proteins identified in the biofilm matrix of *S. lugdunensis* 03MC and SL-55 strains. Significantly more abundant proteins in 03MC are in blue and those of SL-55 in orange.

Accession number RefSeq	Accession number KEGG	Description	Mass	Max fold change	Highest mean condition	Normalized abundance 03MC	Normalized abundance SL-55	Strain-specific proteins
WP_002461102.1	slg:SLGD_02492	single-stranded DNA-binding protein	18736	1,69955336	03MC	36886,2184	21703,4777	
WP_002478110.1	slg:SLGD_01335	molecular chaperone DnaK	66328	1,66875128	03MC	103310,85	61909,0758	
WP_000387527.1	slg:SLGD_00777	50S ribosomal protein L22	12827	1,50893834	SL55	61264,7803	92444,7756	
WP_001118667.1	slg:SLGD_00771	30S ribosomal protein S10	11569	1,65581344	03MC	40029,5427	24175,1526	
WP_002433901.1	slg:SLGD_01496	cold-shock protein CspA	7333	1,19319913	03MC	8205,61031	6876,98316	
WP_002435373.1	slg:SLGD_01746	50S ribosomal protein L32	6497	1,29094118	SL55	108217,344	139702,225	
WP_002448459.1	slg:SLGD_00783	50S ribosomal protein L24	11513	3,42659549	03MC	20876,5605	6092,50802	
WP_002458757.1	slg:SLGD_01107	glucosamine-6-phosphate isomerase	22606	1,48960819	03MC	33554,2979	22525,5863	
WP_002458764.1	slg:SLGD_01115	transcriptional regulator	17782	1,14757209	SL55	3094,42175	3551,07205	
WP_002458821.1	slg:SLGD_01180	D-amino-acid transaminase	31931	1,00527053	03MC	6932,06599	6895,72191	
WP_002458855.1	slg:SLGD_01211	30S ribosomal protein S4	23149	1,49785816	03MC	7946,06035	5304,94847	
WP_002458895.1	slg:SLGD_01251	50S ribosomal protein L20	13709	2,66634288	03MC	1720,2505	645,172274	
WP_002458920.1	slg:SLGD_01276	50S ribosomal protein L27	10321	1,74292098	03MC	15728,638	9024,29782	
WP_002458966.1	slg:SLGD_01322	HD domain-containing protein	22142	1,09189654	SL55	2057,26455	2246,32004	
WP_002459006.1	slg:SLGD_01362	superoxide dismutase	22957	1,27093802	03MC	54312,4832	42734,1712	
WP_002459095.1	slg:SLGD_01451	asparagine--tRNA ligase	49267	2,71374834	03MC	1390,83643	512,514888	
WP_002459288.1	slg:SLGD_01638	elongation factor Ts	32257	1,22307876	03MC	71182,2201	58199,2122	
WP_002459290.1	slg:SLGD_01640	GTP-sensing pleiotropic transcriptional regulator CodY	28816	1,00332697	SL55	27982,0419	28075,1373	
WP_002459324.1	slg:SLGD_01682	50S ribosomal protein L28	6967	2,83194826	03MC	4618,40326	1630,8219	
WP_002459379.1	slg:SLGD_01737	thioredoxin	11488	2,85752495	03MC	2910,7634	1018,63097	
WP_002459622.1	slg:SLGD_01979	cystatin-like fold lipoprotein	16387	1,27485835	03MC	1726,03319	1353,90194	
WP_002459651.1	slg:SLGD_02011	MetQ/NlpA family ABC transporter substrate-binding protein	30141	1,24604145	03MC	4373,26265	3509,72484	
WP_002459661.1	slg:SLGD_02021	organic hydroperoxide resistance protein	15327	1,04666743	SL55	993,069178	1039,41316	
WP_002459691.1	slg:SLGD_02050	phosphopyruvate hydratase	47403	1,53761496	03MC	438039,304	284882,312	
WP_002459784.1	slg:SLGD_02142	MarR family transcriptional regulator	16816	1,33359135	03MC	5614,88493	4210,34895	
WP_002459854.1	slg:SLGD_02209	transcriptional regulator	14398	3,36313412	03MC	118361,622	35193,8452	
WP_002459857.1	slg:SLGD_02212	hypothetical protein	18569	1,6852528	03MC	4103058,25	2434684,13	

## Supplementary Material

WP_002459935.1		DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	135172	1,40115049	03MC	4848,56927	3460,42006
WP_002459936.1	slg:SLGD_02347	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	133273	1,57029197	SL55	6527,05831	10249,3872
WP_002459941.1	slg:SLGD_02352	50S ribosomal protein L11	14895	2,8787806	03MC	10999,9057	3821,02955
WP_002459942.1	slg:SLGD_02353	transcription termination/antitermination protein NusG	20613	2,05820042	SL55	7156,07284	14728,6321
WP_002459951.1	slg:SLGD_02361	glutamate--tRNA ligase	56233	1,46077653	03MC	17786,9081	12176,3375
WP_002460052.1	slg:SLGD_00791	50S ribosomal protein L15	15524	1,97237236	03MC	13225,7374	6705,49725
WP_002460053.1	slg:SLGD_00790	50S ribosomal protein L30	6550	1,38196642	03MC	1723,2212	1246,93421
WP_002460060.1	slg:SLGD_00784	50S ribosomal protein L5	20232	1,55917142	03MC	8837,80476	5668,27012
WP_002460061.1	slg:SLGD_00782	50S ribosomal protein L14	13128	1,94522664	03MC	39658,9296	20387,8195
WP_002460063.1	slg:SLGD_00779	50S ribosomal protein L16	16303	1,75128217	03MC	764,291486	436,418243
WP_002460067.1	slg:SLGD_00775	50S ribosomal protein L2	30237	1,57685856	SL55	8587,4127	13541,1353
WP_002460281.1	slg:SLGD_00597	nitrate reductase subunit alpha	139173	1,45255733	SL55	5193,56632	7543,95281
WP_002460303.1	slg:SLGD_00581	amino acid ABC transporter substrate-binding protein phosphate/phosphite/phosphonate ABC transporter substrate-binding protein	28676	1,51870599	03MC	2463,5881	1622,16263
WP_002460367.1	slg:SLGD_00528	L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	35060	1,87768922	03MC	11560,9353	6157,00147
WP_002460496.1	slg:SLGD_00435	L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	56679	2,79384106	SL55	1465,99426	4095,75495
WP_002460725.1	slg:SLGD_00246	ornithine decarboxylase	82770	1,95323309	SL55	369161,833	721059,109
WP_002460790.1	slg:SLGD_00196	hypothetical protein	56508	1,07630898	SL55	57889,2934	62306,7661
WP_002460813.1	slg:SLGD_00178	3-oxoacyl-ACP reductase	28023	2,80429013	03MC	3617,31013	1289,92007
WP_002460922.1		heme uptake protein IsdC	24638	1,98102112	SL55	19694,1728	39014,5723
WP_002461227.1	slg:SLGD_00920	FOF1 ATP synthase subunit beta	51472	1,13351798	SL55	111764,61	126687,196
WP_002461229.1	slg:SLGD_00919	FOF1 ATP synthase subunit gamma	31908	1,11196024	03MC	13696,3055	12317,2619
WP_002461230.1	slg:SLGD_00918	FOF1 ATP synthase subunit alpha	54607	1,21128166	SL55	85621,0185	103711,17
WP_002461247.1	slg:SLGD_00904	type B 50S ribosomal protein L31	9787	5,17297912	SL55	281,274384	1455,02651
WP_002461308.1	slg:SLGD_01066	thioredoxin-dependent thiol peroxidase	17336	1,314107	03MC	5715,39013	4349,25781
WP_002461333.1	slg:SLGD_01045	DNA-binding response regulator	23643	1,9169765	03MC	386,158658	201,44152
WP_002477932.1	slg:SLGD_01006	hypothetical protein	38589	1,78043957	SL55	4799,37587	8544,99872
WP_002477941.1	slg:SLGD_01018	adenylosuccinate lyase	49822	1,49463619	03MC	13873,2795	9282,04443
WP_002477954.1	slg:SLGD_01035	ferritin	19585	1,04647051	SL55	7837,80198	8202,02863
WP_002478004.1	slg:SLGD_01155	transaldolase	25698	1,66378955	SL55	18770,9697	31230,9432
WP_002478011.1	slg:SLGD_01172	leucine--tRNA ligase	91856	1,09363601	SL55	10342,4088	11310,8307
WP_002478014.1	slg:SLGD_01178	YtxH domain-containing protein	15214	1,58821191	03MC	5871,31551	3696,80865
WP_002478015.1	slg:SLGD_01179	dipeptidase PepV	52641	1,03772565	03MC	12015,4897	11578,6766

WP_002478041.1	slg:SLGD_01221	alanine dehydrogenase	40167	1,09480057	SL55	16582,1868	18154,1876
WP_002478123.1	slg:SLGD_01358	deoxyribonuclease IV	32877	1,93313287	SL55	14618,3152	28259,1456
WP_002478128.1	slg:SLGD_01368	glucokinase	34923	4,09840717	SL55	418,80226	1716,42219
WP_002478149.1	slg:SLGD_01404	phosphogluconate dehydrogenase (NADP(+)-dependent, decarboxylating)	51854	1,53686712	SL55	27574,0563	42377,6604
WP_002478153.1	slg:SLGD_01408	glucose-6-phosphate dehydrogenase	56947	2,02462861	SL55	37575,3611	76076,1509
WP_002478172.1	slg:SLGD_01434	HU family DNA-binding protein	9636	7,47426441	SL55	107221,74	801403,635
WP_002478201.1	slg:SLGD_01478	oligoendopeptidase F	69058	1,41064866	03MC	4155,05391	2945,49169
WP_002478224.1	slg:SLGD_01520	thymidylate synthase	36781	1,04202417	03MC	8620,94849	8273,27112
WP_002478237.1	slg:SLGD_01547	hypothetical protein	11612	1,39820262	03MC	1464,10559	1047,13407
WP_002478269.1	slg:SLGD_01615	insulinase family protein	50067	3,27416574	03MC	4194,35072	1281,04411
WP_002478272.1	slg:SLGD_01620	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	76961	1,29423429	03MC	57303,6557	44276,107
WP_002478284.1		type I DNA topoisomerase	79268	1,78500947	SL55	14791,7238	26403,3671
WP_002478333.1	slg:SLGD_01725	division/cell wall cluster transcriptional repressor MraZ	17226	1,0791109	SL55	26899,9449	29028,0238
WP_002478342.1	slg:SLGD_01739	DNA polymerase/3'-5' exonuclease PolX	64809	1,42680878	03MC	2030,44094	1423,06451
WP_002478360.1	slg:SLGD_01768	DUF1054 domain-containing protein	23947	1,57441176	SL55	42781,9605	67356,4218
WP_002478372.1	slg:SLGD_01791	phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase	63541	1,02479367	03MC	21083,0539	20572,9743
WP_002478390.1	slg:SLGD_01823	mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase	139417	1,36244254	SL55	25989379,9	35409036,8
WP_002478394.1	slg:SLGD_01827	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase	30319	1,85699264	03MC	3475,11326	1871,3662
WP_002478410.1	slg:SLGD_01853	hypothetical protein	19314	1,95003715	03MC	10085,6276	5172,01819
WP_002478415.1	slg:SLGD_01862	NAD kinase	30603	2,35150172	SL55	5273,33725	12400,2616
WP_002478537.1	slg:SLGD_00364	CHAP domain-containing protein	27154	1,01040531	SL55	15338,3466	15497,9468
WP_002478566.1	slg:SLGD_00399	acetolactate synthase AlsS	60562	1,11278049	SL55	5084,59566	5658,03884
WP_002478592.1	slg:SLGD_00438	hypothetical protein	18049	1,29143695	SL55	2425,36412	3132,20484
WP_002478597.1	slg:SLGD_00446	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	43549	1,34904276	03MC	15436,1636	11442,3087
WP_002478654.1	slg:SLGD_00519	exopolyphosphatase	58338	1,43519121	SL55	7481,01449	10736,6862
WP_002478655.1	slg:SLGD_00522	M42 family peptidase	39205	1,41014096	SL55	12218,3152	17229,5467
WP_002478659.1	slg:SLGD_00529	DNA-binding protein	54586	1,24295399	03MC	11562,5301	9302,46021
WP_002478684.1	slg:SLGD_00566	hypothetical protein	35406	1,73734292	03MC	21069,4895	12127,4213
WP_002478811.1	slg:SLGD_00741	ferrichrome ABC transporter substrate-binding protein	33976	1,73312847	03MC	13753,7722	7935,80652
WP_002478830.1	slg:SLGD_00773	50S ribosomal protein L4	22416	1,36943309	03MC	5077,37713	3707,64893
WP_002478848.1	slg:SLGD_00822	antibiotic biosynthesis monooxygenase	25413	1,27908423	03MC	343,784743	268,774124
WP_002478917.1	slg:SLGD_00837	Asp23/Gls24 family envelope stress response protein	18958	2,09683108	03MC	40965,0359	19536,6409
WP_002478940.1	slg:SLGD_00876	DNA starvation/stationary phase protection protein	16876	1,32380519	SL55	131670,426	174305,993

## Supplementary Material

WP_002478986.1	slg:SLGD_00301	hypothetical protein	73364	1,59308155	SL55	48397,8198	77101,6737	
WP_002478996.1	slg:SLGD_00289	SMP-30/gluconolactonase/LRE family protein	35897	6,30203474	SL55	241,600781	1522,57652	
WP_002479038.1	slg:SLGD_00229	dihydrolipoyl dehydrogenase	48244	1,00809774	03MC	5909,24691	5861,77974	
WP_002479137.1	slg:SLGD_00094	YSIRK signal domain/LPXTG anchor domain surface protein	71495	1,3326474	03MC	22169,9429	16636,0155	
WP_002479199.1	slg:SLGD_02551	DNA gyrase subunit A	99890	2,2379141	03MC	9258,06311	4136,9162	
WP_002479202.1	slg:SLGD_02547	DNA polymerase III subunit beta	41914	1,33190019	SL55	9957,63207	13262,572	
WP_002479220.1	slg:SLGD_02519	LacI family transcriptional regulator	36994	1,08167122	SL55	6002,92199	6493,18798	
WP_002479297.1	slg:SLGD_01976	CHAP domain-containing protein	32913	1,96959084	03MC	12558,7006	6376,29923	
WP_002479305.1	slg:SLGD_02017	arsenate reductase	13583	1,85129331	03MC	26853,5981	14505,318	
WP_002479331.1	slg:SLGD_02063	thioredoxin-disulfide reductase	33602	1,09494157	SL55	4085,48127	4473,36326	
WP_002479341.1	slg:SLGD_02076	autolysin	29626	2,04382759	SL55	229637,9	469340,275	
WP_002479388.1	slg:SLGD_02160	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	28387	1,13647777	03MC	51885,4312	45654,594	
WP_012990738.1	slg:SLGD_00578	phosphoglycerate mutase	26591	1,75185036	SL55	64702,2721	113348,699	
WP_012990787.1	slg:SLGD_00950	anti-sigma B factor RsbW	17796	2,06461178	SL55	747,588726	1543,48049	
WP_012990851.1	slg:SLGD_01537	4-oxalocrotonate tautomerase	6730	1,33335882	SL55	7079,11099	9438,99505	
WP_012990855.1	slg:SLGD_01556	transketolase	72804	1,79369187	03MC	45483,1925	25357,3054	
WP_037557155.1	slg:SLGD_01619	ribonuclease J	61281	1,98903352	SL55	25116,9034	49958,3627	
WP_002478163.1	slg:SLGD_01419	rRNA pseudouridine synthase	27834	1,55108966	03MC	1274,12763	821,440349	03MC
WP_002459033.1	slg:SLGD_01389	Asp23/Gls24 family envelope stress response protein	13177	2,71424358	03MC	1841,0539	678,293547	03MC
WP_002459515.1	slg:SLGD_01872	tryptophan--tRNA ligase	37125	1,44692914	03MC	3345,08925	2311,85422	03MC
WP_002478109.1	slg:SLGD_01334	nucleotide exchange factor GrpE	23730	9,13251959	03MC	994,125173	108,85552	03MC
WP_002478682.1	slg:SLGD_00562	NAD(P)-dependent oxidoreductase	31228	2,21318226	03MC	13756,7179	6215,80884	03MC
WP_002479013.1	slg:SLGD_00263	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	42150	2,71077098	03MC	1873,15649	691,005069	03MC
WP_002479296.1	slg:SLGD_01974	type VII secretion protein EsaA	114771	1,56527828	SL55	272,673172	426,809392	03MC
WP_002460280.1	slg:SLGD_00598	nitrate reductase subunit beta	59248	1,1731847	SL55	2000,641	2347,12142	SL55
WP_002477933.1	slg:SLGD_01007	aldehyde dehydrogenase	51705	21,1580104	SL55	267,649491	5662,93071	SL55
WP_002478941.1	slg:SLGD_00878	deoxyribose-phosphate aldolase	23281	2,58617415	03MC	6136,01232	2372,62147	SL55
WP_002479000.1	slg:SLGD_00283	linear amide C-N hydrolase	36823	1,07249325	SL55	1554,03497	1666,69202	SL55
WP_002458835.1	slg:SLGD_01194	catabolite control protein A	36387	12,2830378	03MC	7987,68907	650,302408	
WP_002458844.1	slg:SLGD_01202	tyrosine--tRNA ligase	47492	4,33151625	03MC	2362,62026	545,44878	
WP_002458875.1	slg:SLGD_01231	6-phosphofructokinase	34703	2,40729835	03MC	6125,60144	2544,59588	
WP_002458918.1	slg:SLGD_01274	50S ribosomal protein L21	11286	9,3233932	03MC	10306,5702	1105,4527	
WP_002458938.1	slg:SLGD_01294	Rrf2 family transcriptional regulator	15532	2,26290024	03MC	7650,65419	3380,90652	

WP_002458998.1	slg:SLGD_01354	RNA polymerase sigma factor RpoD	42330	2,65379518	03MC	1497,39625	564,247105
WP_002459064.1	slg:SLGD_01420	DNA-binding response regulator	28083	4,07547432	03MC	5518,44866	1354,06292
WP_002459099.1	slg:SLGD_01455	penicillin-binding protein	80977	10,9642329	03MC	6862,30716	625,881193
WP_002459160.1	slg:SLGD_01515	PTS glucose transporter subunit IIA	17906	5,27589535	03MC	15361,5525	2911,64845
WP_002459289.1	slg:SLGD_01639	30S ribosomal protein S2	29719	2,48884831	03MC	51998,7858	20892,7099
WP_002459304.1	slg:SLGD_01655	50S ribosomal protein L19	13371	2,90777162	03MC	8592,92817	2955,15924
WP_002459307.1	slg:SLGD_01658	30S ribosomal protein S16	10342	31,5494775	03MC	36099,8623	1144,23011
WP_002459323.1	slg:SLGD_01681	Asp23/Gls24 family envelope stress response protein	13477	1,87796265	03MC	4093,39162	2179,6981
WP_002459360.1	slg:SLGD_01717	cell division protein FtsZ	41227	53,1209878	03MC	31762,3519	597,924723
WP_002459422.1	slg:SLGD_01779	dihydrolipoyl dehydrogenase	49606	5,14415514	03MC	95329,4863	18531,6118
WP_002459424.1	slg:SLGD_01781	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha	35296	1,96983985	03MC	361847,982	183694,112
WP_002459425.1	slg:SLGD_01782	alpha	41588	5,42719767	03MC	441999,64	81441,5961
WP_002459457.1	slg:SLGD_01813	DUF5011 domain-containing protein	11460	23,3895289	03MC	33831,5153	1446,43851
WP_002459500.1	slg:SLGD_01858	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabI	28028	11,0778982	03MC	22946,222	2071,35157
WP_002459533.1	slg:SLGD_01890	FAA hydrolase family protein	32986	2,41844983	03MC	41222,969	17045,2033
WP_002459548.1	slg:SLGD_01905	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	21654	5,5255288	03MC	1704,71381	308,515958
WP_002459561.1	slg:SLGD_01918	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	44284	9,36175825	03MC	15199,2456	1623,54605
WP_002459623.1	slg:SLGD_01980	Fe-S cluster assembly protein SufB	52514	3,760554	03MC	2987,48245	794,426153
WP_002459693.1	slg:SLGD_02052	triose-phosphate isomerase	27424	6,78738635	03MC	61208,2867	9017,94647
WP_002459694.1	slg:SLGD_02053	phosphoglycerate kinase	42201	15,9058323	03MC	84093,1189	5286,93608
WP_002459695.1	slg:SLGD_02054	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36172	9,06660261	03MC	433876,755	47854,392
WP_002459699.1	slg:SLGD_02058	ATP-dependent Clp endopeptidase, proteolytic subunit ClpP	21413	6,33030745	03MC	10769,1327	1701,20217
WP_002459774.1	slg:SLGD_02133	Cys-tRNA(Pro) deacylase	18051	2,78578994	03MC	9236,71288	3315,65304
WP_002459883.1	slg:SLGD_02297	phosphate acetyltransferase	34794	3,38347909	03MC	17337,3675	5124,12433
WP_002459921.1	slg:SLGD_02330	bifunctional threonine ammonia-lyase/L-serine ammonia-lyase TdcB	37080	5,12477647	03MC	87147,4801	17005,128
WP_002459931.1	slg:SLGD_02341	elongation factor Tu	43083	4,63497765	03MC	19653,919	4240,34817
WP_002459939.1	slg:SLGD_02350	50S ribosomal protein L10	17708	13,1439328	03MC	28841,7718	2194,30304
WP_002459960.1	slg:SLGD_02370	pyridoxal 5'-phosphate synthase lyase subunit PdxS	31897	6,96294281	03MC	17112,1341	2457,60084
WP_002460040.1	slg:SLGD_00805	30S ribosomal protein S9	14678	4,12150962	03MC	6387,06674	1549,69109
WP_002460041.1	slg:SLGD_00804	50S ribosomal protein L13	16267	7,47558	03MC	29634,9511	3964,23436
WP_002460046.1	slg:SLGD_00799	50S ribosomal protein L17	13682	6,15360018	03MC	453071,652	73627,0864
WP_002460048.1	slg:SLGD_00798	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	34990	3,4152649	03MC	37287,1896	10917,8031
WP_002460049.1	slg:SLGD_00796	30S ribosomal protein S13	13737	2,79398712	03MC	16722,7625	5985,26826

## Supplementary Material

WP_002460054.1	slg:SLGD_00789	30S ribosomal protein S5	17715	3,54523405	03MC	33322,4541	9399,22545
WP_002460056.1	slg:SLGD_00788	50S ribosomal protein L18	13206	18,5371938	03MC	54190,3254	2923,3295
WP_002460058.1	slg:SLGD_00786	30S ribosomal protein S8	14812	4,42719286	03MC	22587,1068	5101,90262
WP_002460068.1	slg:SLGD_00774	50S ribosomal protein L23	10625	3,92135468	03MC	5229,58672	1333,61737
WP_002460100.1	slg:SLGD_00746	molybdate ABC transporter substrate-binding protein	28652	2,03193912	03MC	52438,6243	25807,1828
WP_002460439.1	slg:SLGD_00479	aldehyde dehydrogenase	54175	5,68925503	03MC	5331,25851	937,074975
WP_002460442.1	slg:SLGD_00476	lactate dehydrogenase	36218	2,67481744	03MC	60731,5576	22704,9356
WP_002460510.1	slg:SLGD_00424	transglycosylase	24142	4,83522127	03MC	692462,192	143212,1
WP_002460777.1	slg:SLGD_00206	hypothetical protein	18961	2,08855228	03MC	3764840,87	1802607,91
WP_002461020.1	slg:SLGD_02560	50S ribosomal protein L9	16296	8,31049988	03MC	57636,2315	6935,35074
WP_002461066.1	slg:SLGD_02526	signal peptidase I	21985	4,9707031	03MC	2697,11652	542,602619
WP_002461113.1	slg:SLGD_02482	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	54861	19,1146184	03MC	5991,35617	313,443672
WP_002461385.1	slg:SLGD_01008	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	34201	3,4492249	03MC	18387,4239	5330,88575
WP_002461472.1	slg:SLGD_02407	50S ribosomal protein L25	23665	2,59933668	03MC	52642,9645	20252,4609
WP_002461476.1	slg:SLGD_02410	septation protein SpoVG	11414	5,44281919	03MC	13911,0991	2555,86281
WP_002477926.1	slg:SLGD_00992	chaperonin GroEL	57587	2,87443448	03MC	58328,1374	20292,0393
WP_002477958.1	slg:SLGD_01039	CoA-disulfide reductase	50132	5,87459821	03MC	14018,4241	2386,27794
WP_002478063.1	slg:SLGD_01254	trigger factor	48915	38,8152091	03MC	13458,4573	346,731542
WP_002478087.1	slg:SLGD_01291	aspartate--tRNA ligase	66641	2,19544293	03MC	2429,67951	1106,69217
WP_002478117.1	slg:SLGD_01350	glycine--tRNA ligase	53551	3,28904765	03MC	1265,35546	384,717885
WP_002478221.1		PDZ domain-containing protein	54326	2,62971614	03MC	1004,09488	381,826335
WP_002478262.1	slg:SLGD_01592	glycerol kinase	56114	38,5758004	03MC	133189,317	3452,66502
WP_002478366.1	slg:SLGD_01780	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2	46852	3,92710927	03MC	42886,6529	10920,6671
WP_002478386.1	slg:SLGD_01814	cytochrome aa3 quinol oxidase subunit II	42203	12,4168319	03MC	12222,2917	984,332548
WP_002478388.1	slg:SLGD_01820	LytR family transcriptional regulator	45180	7,86055032	03MC	117916,353	15001,0303
WP_002478550.1	slg:SLGD_00379	malate dehydrogenase (quinone)	56317	3,5614162	03MC	7329,71787	2058,09079
WP_002478556.1	slg:SLGD_00388	fructose biphosphate aldolase	33029	4,98385089	03MC	219062,311	43954,4272
WP_002478831.1	slg:SLGD_00776	30S ribosomal protein S19	10581	9,52376123	03MC	58160,4407	6106,87724
WP_002478832.1	slg:SLGD_00787	50S ribosomal protein L6	19556	4,672702	03MC	74030,3766	15843,1624
WP_002478833.1	slg:SLGD_00793	adenylate kinase	24106	13,8207743	03MC	7187,53503	520,052993
WP_002478930.1	slg:SLGD_00865	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	65844	9,02400207	03MC	7764,89185	860,470974
WP_002478951.1	slg:SLGD_00899	fructose-1,6-bisphosphate aldolase, class II	30723	4,90156359	03MC	54883,7467	11197,1916
WP_002478964.1	slg:SLGD_00917	FOF1 ATP synthase subunit delta	20431	4,18765885	03MC	6805,91391	1625,23122

WP_002478985.1	slg:SLGD_00302	CHAP domain-containing protein	73923	3,28814618	03MC	66476,9327	20217,1464	
WP_002479104.1	slg:SLGD_00139	threonine--tRNA ligase	73876	9,25591882	03MC	56176,0772	6069,20591	
WP_002479141.1	slg:SLGD_00090	YSIRK signal domain/LPXTG anchor domain surface protein	76829	2,12548337	03MC	18346,5429	8631,7038	
WP_002479198.1	slg:SLGD_02554	serine--tRNA ligase	48752	15,2124787	03MC	71490,0456	4699,43438	
WP_002479219.1	slg:SLGD_02520	hypothetical protein	14658	38,9046361	03MC	876603,079	22532,0981	
WP_002479252.1	slg:SLGD_02472	IMP dehydrogenase	52719	3,56676663	03MC	126077,232	35347,7658	
WP_002479326.1	slg:SLGD_02051	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	56594	4,55513932	03MC	13990,345	3071,33197	
WP_002479342.1	slg:SLGD_02077	ribosomal subunit interface protein	21940	4,47751567	03MC	13556,1305	3027,60092	
WP_002479363.1	slg:SLGD_02116	LTA synthase family protein	74826	3,24782134	03MC	1503790,34	463015,107	
WP_002479403.1	slg:SLGD_02189	formate dehydrogenase	37754	5,08405529	03MC	13987,6857	2751,28512	
WP_002479422.1	slg:SLGD_02225	alcohol dehydrogenase AdhP	35969	14,0370061	03MC	23674,0247	1686,54373	
WP_002479438.1	slg:SLGD_02309	bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase	29557	6,5068428	03MC	3800,84071	584,129789	
WP_002479461.1	slg:SLGD_02342	elongation factor G	76611	11,9345889	03MC	32655,9576	2736,24487	
WP_002479465.1	slg:SLGD_02351	50S ribosomal protein L1	24850	2,77772482	03MC	41212,499	14836,7825	
WP_002479495.1	slg:SLGD_02395	cysteine synthase A	32929	9,15197591	03MC	8439,75392	922,178336	
WP_002479499.1	slg:SLGD_02390	lysine--tRNA ligase	56969	8,72902748	03MC	7188,773	823,547986	
WP_002492254.1	slg:SLGD_00738	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	78182	3,04039533	03MC	1874,4643	616,519924	
WP_012990671.1	slg:SLGD_00171	formate C-acetyltransferase	84838	4,3644033	03MC	48411,2833	11092,3029	
WP_012990779.1	slg:SLGD_00840	iron citrate ABC transporter substrate-binding protein	36988	4,13429367	03MC	28433,3352	6877,43481	
WP_012990817.1	slg:SLGD_01220	universal stress protein	18482	2,71720178	03MC	37943,5196	13964,1892	
WP_012990944.1	slg:SLGD_02129	PTS fructose transporter subunit IIC	69090	2,02207989	03MC	5709,01758	2823,33927	
WP_014533190.1	slg:SLGD_00044	tandem-type lipoprotein	30500	7,38710286	03MC	3520,62294	476,590485	
WP_001137495.1	slg:SLGD_02343	30S ribosomal protein S7	17783	9,71841704	03MC	14338,2891	1475,37289	03MC
WP_002458789.1	slg:SLGD_01148	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	59305	4,72234108	03MC	1954,74767	413,936147	03MC
WP_002458832.1	slg:SLGD_01191	DUF948 domain-containing protein	17264	22,2545949	03MC	9072,30613	407,659908	03MC
WP_002458891.1	slg:SLGD_01247	threonine--tRNA ligase	74875	14,2090221	03MC	5319,55081	374,378391	03MC
WP_002458953.1	slg:SLGD_01309	transcription elongation factor GreA	17810	32,5036908	03MC	7319,01818	225,174988	03MC
WP_002458974.1	slg:SLGD_01329	30S ribosomal protein S20	8946	10,9656183	03MC	14364,9418	1309,99835	03MC
WP_002458986.1	slg:SLGD_01342	UPF0365 family protein	35061	11,5688405	03MC	3267,27252	282,420051	03MC
WP_002459058.1	slg:SLGD_01414	transcriptional repressor	17708	7,25646605	03MC	1930,96342	266,102454	03MC
WP_002459075.1	slg:SLGD_01431	30S ribosomal protein S1	43114	11,5830637	03MC	698,275521	60,2841822	03MC
WP_002459255.1	slg:SLGD_01605	2-oxoacid:acceptor oxidoreductase subunit alpha	64577	2,75914327	03MC	2578,28057	934,449689	03MC
WP_002459256.1	slg:SLGD_01606	TIGR00282 family metallophosphoesterase	29456	4,13876512	03MC	879,246399	212,441725	03MC

## Supplementary Material

WP_002459361.1	slg:SLGD_01718	cell division protein FtsA	52417	4,41311976	03MC	1609,40313	364,686031	03MC
WP_002459582.1	slg:SLGD_01941	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	54358	13,0442281	03MC	4779,36637	366,397024	03MC
WP_002459799.1	slg:SLGD_02156	YebC/PmpR family DNA-binding transcriptional regulator	26356	29,7141751	03MC	11213,2258	377,369581	03MC
WP_002460064.1	slg:SLGD_00778	30S ribosomal protein S3	24172	9,092061	03MC	3032,84884	333,571105	03MC
WP_002460169.1	slg:SLGD_00686	HlyD family secretion protein	22686	9,70615753	03MC	3006,84821	309,787699	03MC
WP_002461018.1	slg:SLGD_02562	adenylosuccinate synthase	47434	3,4821787	03MC	1156,18067	332,027952	03MC
WP_002461120.1	slg:SLGD_02475	hypothetical protein	15426	10,7183881	03MC	12040,5492	1123,35447	03MC
WP_002461237.1	slg:SLGD_00912	uracil phosphoribosyltransferase	23071	24,2843787	03MC	1106,72193	45,5734093	03MC
WP_002461245.1	slg:SLGD_00906	peptide chain release factor 1	40473	4,98870018	03MC	6630,00657	1329,00482	03MC
WP_002461270.1	slg:SLGD_00880	phosphopentomutase	43996	12,4590307	03MC	22064,6172	1770,97382	03MC
WP_002461359.1	slg:SLGD_01027	Asp-tRNA(Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit GatA	52847	7,47741492	03MC	5534,15718	740,116369	03MC
WP_002477948.1	slg:SLGD_01028	Asp-tRNA(Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit GatB	53595	22,5339994	03MC	7467,74826	331,399151	03MC
WP_002477971.1	slg:SLGD_01065	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	46963	3,00682546	03MC	3746,61405	1246,03643	03MC
WP_002477986.1	slg:SLGD_01122	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	36111	20,7840341	03MC	112601,216	5417,67855	03MC
WP_002478061.1	slg:SLGD_01252	NUDIX domain-containing protein	23099	11,0872926	03MC	2091,19029	188,611445	03MC
WP_002478068.1	slg:SLGD_01261	porphobilinogen synthase	36346	8,00175904	03MC	1564,313	195,49614	03MC
WP_002478071.1	slg:SLGD_01265	valine--tRNA ligase	101401	40,0971972	03MC	618,99668	15,4374052	03MC
WP_002478135.1	slg:SLGD_01380	glycine dehydrogenase subunit 2	54792	38,1159025	03MC	1500,63709	39,3703675	03MC
WP_002478136.1	slg:SLGD_01384	hypothetical protein	22006	46,4752687	03MC	9339,14761	200,94876	03MC
WP_002478253.1	slg:SLGD_01579	ABC transporter ATP-binding protein	33288	47,9128128	03MC	2758,9483	57,5826829	03MC
WP_002478302.1	slg:SLGD_01677	phosphate acyltransferase PlsX	35336	11,8564727	03MC	2707,82459	228,383656	03MC
WP_002478326.1	slg:SLGD_01710	isoleucine--tRNA ligase	104923	24,4999034	03MC	6946,28322	283,522882	03MC
WP_002478385.1	slg:SLGD_01812	nitric oxide dioxygenase	43082	27,9381638	03MC	4088,18965	146,329934	03MC
WP_002478423.1	slg:SLGD_01875	peptide ABC transporter substrate-binding protein	61569	15,6833738	03MC	1388,7965	88,5521517	03MC
WP_002478454.1	slg:SLGD_01917	leucyl aminopeptidase family protein	53996	4,59409361	03MC	1093,972	238,125753	03MC
WP_002478497.1	slg:SLGD_00321	azoreductase	23008	17,0718675	03MC	655,73523	38,4102811	03MC
WP_002478501.1	slg:SLGD_00327	KR domain-containing protein	38482	10,9770079	03MC	866,856518	78,9702005	03MC
WP_002478624.1	slg:SLGD_00478	YSIRK signal domain/LPXTG anchor domain surface protein	30578	33,9810158	03MC	23699,2687	697,42673	03MC
WP_002478929.1	slg:SLGD_00864	phosphoglucosamine mutase	48826	7,42239288	03MC	3664,18921	493,666836	03MC
WP_002478950.1	slg:SLGD_00897	CTP synthase	59793	25,1480157	03MC	2531,72889	100,673108	03MC
WP_002478960.1	slg:SLGD_00911	serine hydroxymethyltransferase	44956	6,57691186	03MC	3212,21347	488,40756	03MC
WP_002479029.1	slg:SLGD_00239	mannose-6-phosphate isomerase, class I	35074	18,6212808	03MC	1297,32168	69,6687675	03MC
WP_002479036.1	slg:SLGD_00231	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta	36887	17,5514446	03MC	7508,33537	427,790165	03MC

WP_002479043.1	slg:SLGD_00224	flavocytochrome c	111380	13,7022287	03MC	11190,9546	816,72514	03MC
WP_002479067.1	slg:SLGD_00191	hypothetical protein	35472	32,6820147	03MC	23756,056	726,884685	03MC
WP_002479459.1	slg:SLGD_02339	glycine C-acetyltransferase	42730	8,4155409	03MC	5907,7777	702,008079	03MC
WP_002479468.1	slg:SLGD_02359	cysteine--tRNA ligase	53755	22,5927291	03MC	5309,15633	234,994024	03MC
WP_002492284.1	slg:SLGD_00724	2-hydroxyacid dehydrogenase	34791	18,7720436	03MC	5875,93754	313,015337	03MC
WP_002492333.1	slg:SLGD_01438	nucleoside-diphosphate kinase	16393	8,4007447	03MC	2229,56014	265,400297	03MC
WP_012990814.1	slg:SLGD_01200	formate--tetrahydrofolate ligase	59822	14,6469689	03MC	14192,5853	968,977638	03MC
WP_012990815.1	slg:SLGD_01203	PDZ domain-containing protein	43608	5,82308077	03MC	1203,19321	206,624853	03MC
WP_012990866.1	slg:SLGD_01649	succinate--CoA ligase subunit alpha	31476	37,7231352	03MC	2130,10051	56,4666883	03MC
WP_012990956.1	slg:SLGD_02220	arginine--tRNA ligase	62792	57,6600743	03MC	2092,7891	36,2952898	03MC
WP_037557156.1	slg:SLGD_01627	DUF448 domain-containing protein	9979	30,3321811	03MC	4687,23237	154,530014	03MC
WP_002458866.1	slg:SLGD_01222	aminopeptidase P family protein	39712	2,88046935	SL55	7751,64843	22328,3857	
WP_002459157.1	slg:SLGD_01512	N-acetyltransferase	19416	2,00088409	SL55	5774,23375	11553,5724	
WP_002459223.1	slg:SLGD_01574	thermonuclease	20653	5,15798415	SL55	1568,39018	8089,7317	
WP_002459545.1	slg:SLGD_01902	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	45802	2,43469744	SL55	12584,2492	30638,8394	
WP_002459884.1	slg:SLGD_02298	heme-dependent peroxidase	29288	2,34977032	SL55	21136,6197	49666,2016	
WP_002460126.1	slg:SLGD_00719	LytR family transcriptional regulator	35041	4,48200364	SL55	1267,70646	5681,86499	
WP_002460471.1	slg:SLGD_00449	CHAP domain-containing protein	16701	20,7360162	SL55	12402,6825	257182,225	
WP_002460942.1	slg:SLGD_00048	L-lactate dehydrogenase	34631	1,93347154	SL55	104124,333	201321,435	
WP_002461222.1	slg:SLGD_00924	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	15981	5,52585183	SL55	41956,3054	231844,327	
WP_002461274.1	slg:SLGD_00877	purine-nucleoside phosphorylase	26243	3,85160785	SL55	6320,86045	24345,4757	
WP_002477957.1	slg:SLGD_01038	hypothetical protein	20391	27,9933563	SL55	5073,4446	142022,743	
WP_002477963.1	slg:SLGD_01050	aminopeptidase	46350	4,2415038	SL55	3759,55433	15946,164	
WP_002477992.1	slg:SLGD_01128	hypothetical protein	19296	7,52525175	SL55	4935,35436	37139,7841	
WP_002478018.1	slg:SLGD_01185	M42 family peptidase	39831	5,89395302	SL55	2316,82134	13655,2362	
WP_002478042.1	slg:SLGD_01223	metal-dependent hydrolase	25428	5,46476494	SL55	7436,40213	40638,1896	
WP_002478245.1	slg:SLGD_01564	catalase	57828	9,20724885	SL55	2661,7637	24507,5208	
WP_002478255.1	slg:SLGD_01582	type I glutamate--ammonia ligase	50931	7,45035019	SL55	24642,8542	183597,893	
WP_002478367.1	slg:SLGD_01784	peptide deformylase	20519	3,73526059	SL55	3964,33641	14807,8295	
WP_002478368.1	slg:SLGD_01786	RNase J family beta-CASP ribonuclease	61914	4,03711883	SL55	11990,9845	48409,0294	
WP_002478419.1	slg:SLGD_01868	oligoendopeptidase F	69958	3,09831808	SL55	18487,5696	57280,371	
WP_002478438.1	slg:SLGD_01896	glucose-6-phosphate isomerase	49762	4,77573914	SL55	59577,317	284525,724	
WP_002478443.1	slg:SLGD_01903	NADH-dependent flavin oxidoreductase	42186	4,45436104	SL55	1681,86883	7491,651	

## Supplementary Material

WP_002478600.1	slg:SLGD_00451	LysR family transcriptional regulator	33330	2,78065214	SL55	2863,46321	7962,29511	
WP_002478761.1	slg:SLGD_00670	hypothetical protein	23888	3,05257944	SL55	6527,34832	19925,2493	
WP_002478931.1	slg:SLGD_00866	Cof-type HAD-IIB family hydrolase	31987	2,44425995	SL55	1697,44947	4149,00775	
WP_002479056.1	slg:SLGD_00209	polyisoprenoid-binding protein	19101	7,19813599	SL55	1645,84714	11847,0315	
WP_002479246.1	slg:SLGD_02481	peroxiredoxin	21046	2,33834272	SL55	146527,259	342630,949	
WP_002479270.1	slg:SLGD_02450	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	35385	7,88150957	SL55	358060,329	2822055,91	
WP_002479377.1		malate dehydrogenase	33861	3,85085776	SL55	2001,87827	7708,94848	
WP_002479452.1	slg:SLGD_02329	alanine dehydrogenase	39627	1,92010214	SL55	241269,807	463262,674	
WP_002479472.1	slg:SLGD_02369	pyridoxal 5'-phosphate synthase glutaminase subunit PdxT	20450	28,3561168	SL55	655,737986	18594,1829	
WP_012990650.1		hypothetical protein, partial	11141	3,23871517	SL55	757157,007	2452215,88	
WP_012990667.1	slg:SLGD_00154	hypothetical protein	50011	20,5637844	SL55	31916,8994	656332,236	
WP_012990705.1	slg:SLGD_00398	LysR family transcriptional regulator	33844	4,91511742	SL55	2161,38623	10623,4671	
WP_012990793.1	slg:SLGD_00993	aspartate aminotransferase	48564	1,99382171	SL55	8041,52348	16033,3641	
WP_012990863.1	slg:SLGD_01633	methicillin resistance protein	76481	3,06810405	SL55	31415,4163	96385,7661	
WP_014533295.1	slg:SLGD_01351	transcriptional regulator	23691	4,04294617	SL55	706,48599	2856,28483	
WP_002458806.1	slg:SLGD_01165	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	16426	39,7443848	SL55	164,67235	6544,80125	SL55
WP_002459294.1	slg:SLGD_01644	FADH(2)-oxidizing methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C(5))-methyltransferase TrmFO	48246	2,42527118	SL55	213,270073	517,237762	SL55
WP_002459765.1	slg:SLGD_02123	6-carboxytetrahydropterin synthase QueD	16300	3,06879882	SL55	4221,32729	12954,4042	SL55
WP_002460628.1	slg:SLGD_00330	antibiotic acetyltransferase	23106	13,1568462	SL55	184,627117	2429,11059	SL55
WP_002478034.1	slg:SLGD_01210	glycerophosphodiester phosphodiesterase	28597	3,08822595	SL55	2640,86554	8155,5895	SL55
WP_002478045.1	slg:SLGD_01226	bifunctional oligoribonuclease/PAP phosphatase NrnA	35729	13,1071641	SL55	436,594784	5722,51947	SL55
WP_002478121.1	slg:SLGD_01356	Nif3-like dinuclear metal center hexameric protein	41350	2,86854272	SL55	896,895362	2572,78266	SL55
WP_002478374.1	slg:SLGD_01794	class I SAM-dependent rRNA methyltransferase	44868	21,5280901	SL55	389,495216	8385,08809	SL55
WP_002478587.1	slg:SLGD_00432	sugar O-acetyltransferase	21034	5,10437162	SL55	2078,66113	10610,2589	SL55
WP_002478707.1	slg:SLGD_00596	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	34102	19,5965965	SL55	178,580983	3499,57948	SL55
WP_002478793.1	slg:SLGD_00717	HTH domain-containing protein	26164	2,86509593	SL55	300,44062	860,791198	SL55
WP_002478817.1	slg:SLGD_00754	molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaE	17348	4,67779783	SL55	96,1147132	449,605197	SL55
WP_002479290.1	slg:SLGD_01965	cystatin-like fold lipoprotein	15126	65,0823154	SL55	137,71823	8963,02128	SL55
WP_002479316.1	slg:SLGD_02037	hypothetical protein	67634	16,6374314	SL55	1206,42502	20071,8135	SL55
WP_012990967.1	slg:SLGD_02241	hypothetical protein	41559	4,88186936	SL55	399,298766	1949,32441	SL55
WP_012990972.1	slg:SLGD_02246	phage major tail protein, TP901-1 family	20765	23,7954186	SL55	384,958028	9160,23741	SL55
WP_012990978.1	slg:SLGD_02252	hypothetical protein	32710	7,3006575	SL55	33189,9717	242308,616	SL55





### 2.3. Principaux résultats

#### ***Fitness et formation de biofilm en milieu riche (TSB) et carencé (RPMI + 1 % de casaminoacides [CAS])***

Les souches poussaient moins bien en RPMI qu'en TSB. Les valeurs moyennes du temps de génération et du taux de croissance maximal des 49 souches dans le TSB étaient de  $37,3 \text{ min} \pm 4,1$  et  $1,1 \pm 0,1$ , respectivement, et de  $80,7 \text{ min} \pm 33,1$  et  $0,6 \pm 0,2$  dans le RPMI. Aucune différence de croissance n'a été observée en fonction des CCs, quel que soit le milieu.

En milieu riche (TSB + 1% glucose), presque toutes les souches (47/49, 95,9%) produisaient du biofilm et en milieu carencé 31/34 souches (91,2 %) étaient productrices. Les souches produisaient moins de biofilm en milieu carencé ( $OD_{590\text{nm}} \text{ max} = 0,363 \pm 0,069$ ) qu'en TSBG ( $OD_{590\text{nm}} \text{ max} = 0,897 \pm 0,072$ ). Dans les deux milieux, la production de biofilm était dépendante du CC, et deux comportements ont été observés : les souches du CC1 ( $p = 0,0079$ ), CC2 ( $p = 0,0079$ ) et CC3 ( $p = 0,026$ ) produisaient significativement plus de biofilm en TSBG qu'en RPMI tandis que les souches du CC6 ( $p = 0,0079$ ) étaient significativement plus productrices en RPMI.

➔ Deux souches représentatives des deux comportements ont été sélectionnées pour la suite des analyses : une du CC3 (03MC, forte productrice de biofilm en milieu riche) et une du CC6 (SL-55, forte productrice de biofilm en milieu carencé).

#### ***Etude de la composition de la matrice du biofilm des souches 03MC et SL-55 par traitements enzymatiques (DNase I et protéinase K) et chimique (métapériodate) en milieu riche***

Les deux souches ont montré une capacité significativement réduite ( $p < 0,05$ ) à former un biofilm en présence de DNase I et de protéinase K ; la formation de biofilm de la souche 03MC étant plus affectée par ces traitements que celle de SL-55. Le prétraitement par métapériodate diminuait significativement la formation du biofilm pour 03MC ( $p = 0,0049$ ) mais pas pour SL-55. A noter que des analyses du génome complet ont révélé la présence du locus *icaADBC* chez les deux souches. Ces résultats suggèrent que la matrice de la souche 03MC était composée de polysaccharides, d'ADNe et de protéines, tandis que celle de la souche SL-55 était principalement composée d'ADNe et de protéines.

#### ***Analyse de l'architecture du biofilm et de la composition de sa matrice (MEC) par microscopie confocale (CLSM) en milieu riche TSBG et carencé en fer (RPMI)***

En TSBG, le biofilm de 03MC contenait significativement plus de cellules viables que le biofilm de SL-55 ( $p < 0,05$ ) et était plus compact (coefficient de rugosité [Ra] = 0,12 pour 03MC contre 0,32 pour SL-55). Le biofilm de 03MC contenait significativement plus de cellules mortes en RPMI qu'en TSBG. De plus, il présentait une plus grande hétérogénéité (Ra = 0,61). Au contraire, SL-55 présentait un biofilm plus compact (Ra = 0,16) en RPMI, avec significativement plus de cellules viables qu'en TSBG.

En TSBG, la MEC du biofilm de 03MC était composée de quantités relativement similaires de protéines, d'ADNe et de polysaccharides, tandis que la MEC de SL-55 était principalement protéique. En RPMI, la souche 03MC produisait des quantités significativement plus importantes de protéines, d'ADNe et d'exopolysaccharides que dans le TSBG, mais avec une proportion de protéines plus faible par rapport à l'ADNe et aux exopolysaccharides. SL-55 produisait des quantités légèrement inférieures de MEC en RPMI, avec une proportion inférieure de protéines.

***Caractérisation des protéines dans la MEC du biofilm des souches 03MC et SL-55 en milieu riche (TSBG) par analyse en spectrométrie de masse LC-MS/MS***

Un total de 322 protéines a été identifié dans la matrice du biofilm ; 62 étaient spécifiques à 03MC et 21 à SL-55. Les protéines ont été principalement identifiées comme intracellulaires (71%) (avec 12,4 % [ $n = 40/322$ ] de protéines ribosomiques), puis membranaires (13,4%), et quelques-unes étaient extracellulaires (5,2%). Parmi les protéines membranaires, il était retrouvé trois protéines de surface contenant le motif LPXTG (SLGD\_00094, IsdA ; SLGD\_0090, IsdB et SLGD\_00478).

Parmi les voies fonctionnelles identifiées par analyse KEGG des 322 protéines, la principale était le métabolisme (72% des protéines). La voie la plus représentée dans la catégorie du métabolisme était le métabolisme des glucides ( $n = 98$  protéines) ; au sein de cette voie, les protéines étaient fortement impliquées dans la glycolyse/gluconéogenèse ( $n = 22$ ) et le métabolisme du pyruvate ( $n = 14$ ), mais plus rarement dans le cycle du citrate et le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ( $n = 9$ ). La comparaison de l'abondance différentielle des protéines dans la MEC des souches a révélé que 148 protéines étaient significativement plus abondantes chez 03MC tandis que 54 protéines étaient plus abondantes chez SL-55. Chez les deux souches, la voie la plus représentée était le métabolisme (74% et 92% des protéines pour 03MC et SL-55, respectivement), et plus spécifiquement le métabolisme glucidique. Un

pourcentage plus élevé de protéines impliquées dans le traitement de l'information génétique a été identifié pour la souche 03MC par rapport à SL55 (22% contre 6%, respectivement), la plupart des protéines (35/39) étant impliquées dans la traduction.

Cette étude a mis en évidence que le complexe clonal n'influçait pas sur la croissance des souches que ce soit en milieu riche ou carencé en fer alors que la formation de biofilm était milieu et CC-dépendante. En milieu riche, la composition de la matrice du biofilm étudiée pour deux souches était souche dépendante, l'une était composée de polysaccharides, d'ADNe et de protéines, tandis que l'autre était principalement composée de protéines et d'ADNe. La microscopie confocale nous a permis de confirmer que la composition de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis* variait en fonction de la souche mais également du milieu. Les analyses protéomiques de la MEC du biofilm de *S. lugdunensis* ont montré que la voie fonctionnelle des protéines principalement retrouvée était celle du métabolisme, et plus particulièrement celle du métabolisme du glucose, quelle que soit la souche.

## 2.4. Discussion et perspectives

Le biofilm est fortement associé à la persistance et aux infections difficiles à traiter (Lebeaux, Ghigo and Beloin, 2014; Herry *et al.*, 2022). D'autre part, l'acquisition du fer est essentielle pour la survie des bactéries pathogènes, la colonisation et l'envahissement des tissus hôtes. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un meilleur fitness et / ou une capacité accrue de production de biofilm pourraient expliquer la forte prévalence des clones endémiques CC1 et CC3 de *S. lugdunensis* (Cheng *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015; Yeh *et al.*, 2016; Dahyot *et al.*, 2019). Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué l'impact des conditions de restriction en fer, par rapport à un milieu riche, sur le fitness et la capacité de formation de biofilm d'une large sélection de souches appartenant aux sept CC définies par le MLST à ce jour.

Nous avons donc sélectionné 49 souches cliniques représentatives des sept CCs décrits, isolées de portage ou d'infections et d'origines géographiques différentes, de villes françaises (Bordeaux, Lyon, Montpellier, Nancy, Nantes, Rouen, Strasbourg, Tours) et de Suède (Kronoberg). Ce soucier était le même que celui utilisé pour l'étude de la sensibilité aux antiseptiques (travail personnel n°1).

La croissance de *S. lugdunensis* était fortement altérée dans le milieu restreint en fer (RPMI) par rapport au milieu riche (TSB), contrairement à ce qui a été observé par Aubourg *et al.* qui n'ont décrit qu'une densité cellulaire légèrement réduite en phase stationnaire pour la souche *S. lugdunensis* N920143 dans un bouillon *Brain-Heart Infusion* (BHI) avec du 2,2'-dipyridyl (DIP) comme chélateur du fer (Aubourg *et al.*, 2020). Ce résultat peut être dû à une différence de concentrations résiduelles en fer voir en autres métaux entre les deux conditions. En revanche, il n'y avait pas de différences significatives de croissance en milieu riche et en conditions carencées en fer selon les CC. Le locus *isd* de *S. lugdunensis* lui permet de capturer le fer héminique de l'hémoglobine (Zapotoczna *et al.*, 2012) ; il serait intéressant d'étudier le fitness des souches en RPMI supplémenté en hémoglobine afin d'évaluer la capacité d'extraction du fer par les protéines du système Isd ainsi que leur expression. Cette analyse pourrait alors être complétée par une analyse de transcription du locus *isd*.

La présente étude confirme que *S. lugdunensis* est une espèce productrice de biofilm. En milieu riche, 96% des 49 souches étudiées ont formé un biofilm, ce qui est similaire à ce qui a été observé dans des études précédentes utilisant également une méthode de quantification de la formation de biofilm en microplaque et coloration au cristal violet ou safranine, comme Frank

et Patel (15 souches, 100% producteurs), Qian *et al.* (24 souches, 100% productrices), Missineo *et al.* (9 souches, 100% de producteurs) et Hagstrand Aldman *et al.* (36 souches, 100 %), mais largement supérieur aux résultats de Pereira *et al.* (23 souches, 60,9% producteurs) (Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Missineo *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2021; Hagstrand Aldman, Thompson and Pålman, 2023). À noter que près de 41% de nos souches étaient de fortes productrices de biofilms ; ce résultat se situe entre les pourcentages (21 à 94,4%) précédemment rapportés dans des études utilisant la même méthode de quantification (Stepanović *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Qian *et al.*, 2021; Hagstrand Aldman, Thompson and Pålman, 2023). Contrairement à Argemi *et al.* et Frank et Patel, aucune corrélation entre la source d'infection et le degré de production de biofilm n'a été observée (Frank and Patel, 2007; Xavier Argemi, Prévost, *et al.*, 2017b). En milieu restreint en fer, 31 des 34 souches étudiées (91 %) ont formé un biofilm. Ceci est cohérent avec les conclusions de Missineo *et al.* où les 9 souches (100%) étaient productrices de biofilm dans des conditions similaires (RPMI avec 0,3% de glucose et 2 mM de glutamine) (Missineo *et al.*, 2014). Cependant, nos souches ont formé moins de biofilm dans ces conditions de carence en fer ( $DO_{590nm} = 0,363$ ) qu'en milieu riche ( $DO_{590nm} = 0,897$ ), probablement en lien avec un taux de croissance réduit en RPMI. En revanche, Aubourg *et al.* ont rapporté que la limitation en fer favorisait la formation de biofilm de la souche *S. lugdunensis* N920143, mais cela a été obtenu dans des conditions différentes (bouillon BHI avec DIP) (Aubourg *et al.*, 2020). Notre étude montre pour la première fois que la formation de biofilm de *S. lugdunensis* dépendait du CC dans un milieu riche et carencé en fer, les CC2 et CC6 étant les CCs significativement les plus producteurs de biofilm en TSBG et RPMI, respectivement. De même, une corrélation entre les lignées clonales de *S. aureus* définies par le typage MLST et/ou *spa* et le phénotype du biofilm a été décrite (Naicker *et al.*, 2016; Tasse *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2020). De façon intéressante, deux comportements dépendants du CC ont été observés, les souches de *S. lugdunensis* de CC1, CC2 et CC3 produisant significativement plus de biofilm dans un milieu riche que dans un milieu carencé en fer, alors que les souches de CC6 étaient significativement plus productrices de biofilm en RPMI qu'en TSBG. Il est à noter que la mesure de formation de biofilm par coloration au cristal violet est une méthode de *screening* efficace mais peu reproductible, et se rapprochant peu des conditions rencontrées *in vivo*. Nous pourrions compléter cette étude avec l'utilisation d'autres techniques comme celles du Biofilm Ring Test® qui permettrait d'analyser la formation de biofilm précoce, ou des modèles à flux permettant de se rapprocher des conditions *in vivo*.

À ce jour, le biofilm de *S. lugdunensis* n'est pas bien caractérisé. Grâce aux traitements enzymatiques et chimiques et à la microscopie confocale (CLSM), il est depuis longtemps admis que le biofilm de *S. lugdunensis* est principalement protéique (Kogan *et al.*, 2006; Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Missineo *et al.*, 2014). Cependant, contrairement à d'autres SCN et *S. aureus*, la matrice extracellulaire du biofilm de *S. lugdunensis* n'a jamais été caractérisée avec précision.

Nous avons initialement choisi quatre souches pour l'étude de la matrice ; 74KR du CC2 (CC dont les souches sont les plus productrices de biofilm en TSBG), 33RM et 03MC qui appartiennent aux CC1 et CC3 respectivement (CC prédominants dans le monde), et SL-55 du CC6 (CC dont les souches sont les plus productrices de biofilm en RPMI). Nos analyses en CLSM ont montré que les souches 74KR, 33RM et 03MC avaient des comportements similaires et concordants avec les analyses en microplaques. Cependant, pour les besoins de l'article, nous avons décidé de ne garder les analyses que pour les souches 03MC et SL-55, souches pour lesquelles nous avons l'ensemble des données. Il serait intéressant pour de futures études de compléter les analyses d'inhibition par traitement enzymatiques et chimique du biofilm ainsi que la caractérisation de l'exoprotéome pour les souches 74KR et 33RM.

Pour approfondir l'étude de la composition, la structure et le protéome du biofilm de *S. lugdunensis*, nous avons sélectionné 03MC (représentative du fort producteur de biofilm en milieu riche) et la souche SL-55 (représentative du fort producteur de biofilm en RPMI). Le test d'inhibition de formation de biofilm par traitements enzymatiques et chimique a révélé une composition dépendante de la souche. En effet, les traitements suggèrent le rôle critique des protéines, polysaccharides et de l'ADNe dans le développement et la structure du biofilm de 03MC en milieu riche. En revanche, la formation de biofilm de SL-55 n'a pas été affectée par un prétraitement au métaperiodate. Ces résultats suggèrent que les protéines et l'ADNe sont les principaux composants de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis*, ce qui est cohérent avec les études précédentes utilisant des tests de dispersion du biofilm (Frank and Patel, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Missineo *et al.*, 2014). En revanche, bien que le locus *icaADBC* (codant pour la production de PNAG chez les staphylocoques) (Arciola *et al.*, 2015) ait été identifié dans les génomes des souches 03MC et SL-55, la production de polysaccharides semble être un phénomène dépendant de la souche. Le rôle des polysaccharides dans le biofilm de *S. lugdunensis* en milieu riche (TSB avec 1 ou 5% de glucose) n'a été montré que récemment en utilisant des tests d'inhibition du biofilm par des agents dégradant des substances polymériques extracellulaires (Qian *et al.*, 2021) ou des méthodes fluorimétriques (Ravaioli *et al.*, 2020). De

manière intéressante, la détection d'exopolysaccharides dans le biofilm de 03MC et non dans celui de SL55 pourrait expliquer la plus grande biomasse du biofilm de la souche 03MC, comme démontré par Ravaioli *et al.* (Ravaioli *et al.*, 2020). Il serait intéressant d'effectuer ces tests en milieu carencé en fer afin d'évaluer l'impact de la carence sur la composition de la MEC.

La caractérisation de la matrice du biofilm mature de 03MC et SL-55 par CLSM a confirmé que la composition du biofilm de *S. lugdunensis* varie selon les souches et a souligné qu'elle dépend également des conditions de culture *in vitro*, comme indiqué précédemment (Ravaioli *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2021). Les images de CLSM ont révélé des phénotypes de biofilm opposés pour les deux souches en termes d'organisation structurale avec un biofilm pour 03MC (CC3) plus compact en milieu riche qu'en RPMI et inversement pour SL-55 (CC6). De plus, le CLSM a indiqué que la MEC du biofilm de 03MC était composée de quantités similaires de protéines, d'ADNe et de polysaccharides tandis que celle de SL-55 était principalement protéique en milieu riche, en accord avec les conclusions de Frank et Patel et Ravaioli *et al.* (Frank and Patel, 2007; Ravaioli *et al.*, 2020). Missineo *et al.* ainsi qu'Aubourg *et al.* ont précédemment démontré que dans des conditions de carence en fer, la protéine IsdC codée par le locus *isd* favorise l'accumulation de biofilm. Ici, nous avons montré pour la première fois qu'en RPMI, la MEC du biofilm des deux souches contenait proportionnellement moins de protéines mais plus de polysaccharides qu'en milieu riche, suggérant que les polysaccharides jouent un rôle plus important dans l'intégrité structurale du biofilm dans des conditions restreintes en fer. Il convient de souligner que le calcofluor marque les liaisons polysaccharidiques  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,4, alors que la MEC staphylococcique a été décrite comme étant principalement composée de PNAG contenant des liaisons  $\beta$ -1,6 (Arciola *et al.*, 2015). Ainsi, cela suggère que des polysaccharides autres que le PNAG composeraient la matrice du biofilm de certaines souches de *S. lugdunensis* (Vandana and Das, 2022). Alors que la DNase et la protéinase K inhibaient également la formation de biofilm de la souche SL-55 de la même manière en milieu riche, la proportion d'ADN détectée par le marquage DDAO dans les images CLSM était bien inférieure au marquage des protéines par le SYPRO ruby. Cela pourrait suggérer que l'ADNe joue un rôle clé au cours des premières étapes de la formation du biofilm dans cette souche, mais n'est pas un composant abondant dans la matrice finale. Ce résultat est en accord avec celui de Qian *et al.* qui n'ont pas détecté l'ADNe comme composant majeur du biofilm pour leurs 24 souches cliniques étudiées (Qian *et al.*, 2021). La présence d'ADNe détectée par coloration au DDAO était différente pour les deux souches et corrélée au taux de

cellules mortes détectées dans la MEC du biofilm de 03MC dans les deux milieux. De ce fait, l'accumulation d'ADNe dans le biofilm de ces deux souches semble être liée à des mécanismes différents, principalement liés à la lyse cellulaire pour 03MC (Gibert *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015) et à des mécanismes alternatifs indépendants de la lyse cellulaire pour SL-55, comme proposé par Rajendran *et al.* (Rajendran *et al.*, 2015). Par ailleurs, des analyses des génomes de 03MC et SL-55 ont révélé que les gènes recherchés avec a priori (*feoA*, *feoB*, *fhuB*, *fhuC*, *fhuD*, *fhuG*, *isdB*, *htsA*, *htsB*, *htsC*, *isdC*, *isdE*, *isdF*, *isdG*, *isdJ*, *isdK*, *isdL*, *lhaA*, *lhaS*, *lhaT*, *sirA*, *sirB*, *sirC*, *srtB*, *sstA\_1*, *sstB\_1*, *sstC\_1*, *sstD\_1*, *sstA\_2*, *sstB\_2*, *sstC\_2* et *sstD\_2*), impliqués dans l'acquisition du fer hémérique et non hémérique étaient présents chez les deux souches, et que le locus *isd* n'était pas dupliqué. Cependant, il a été identifié des mutations non synonymes ; il faudrait compléter ces résultats par des analyses des domaines fonctionnels touchés par les mutations, et rechercher des SNP (*Single Nucleotides Polymorphisme*) dans les régions régulatrices.

L'étude de la composition protéique de la matrice est importante pour comprendre le mode de vie bactérien et développer de nouvelles options thérapeutiques contre les infections associées au biofilm. Très peu d'études ont étudié la composition protéique de la matrice du biofilm staphylococcique et aucune n'a étudié celle de *S. lugdunensis*. L'analyse du protéome de la MEC a été réalisée pour les souches 03MC (CC3) et SL-55 (CC6). Au total, 322 protéines ont été identifiées, ce qui est en accord avec des études antérieures de la MEC staphylococcique rapportant entre 33 et 488 protéines selon la méthodologie utilisée ainsi que les espèces étudiées (*S. aureus* ou *S. epidermidis*) (Muthukrishnan *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2014; Lei, Gupta and Lee, 2017; Hiltunen *et al.*, 2019; Martínez-García *et al.*, 2021).

La grande majorité des protéines identifiées dans cette étude étaient intracellulaires (71%) comme ce qu'a montré Martínez-García *et al.* qui ont rapporté 86,2 % de protéines intracellulaires dans le biofilm statique de *S. epidermidis* en utilisant comme méthode d'analyse la spectrométrie de masse LC-MS/MS (Martínez-García *et al.*, 2021). Des résultats similaires ont été obtenus pour le biofilm cultivé en système de flux de *S. aureus* (60% de protéines intracellulaires) (Graf *et al.*, 2019) et le biofilm de *S. aureus* dans un modèle *in vivo* d'implant de rat (Lei, Gupta and Lee, 2017). Ces protéines intracellulaires peuvent provenir de la lyse cellulaire au sein du biofilm, pouvant être dépendante de l'autolyse (Speziale *et al.*, 2014) (une autolysine extracellulaire a d'ailleurs été identifiée dans la MEC de nos souches), de l'exportation non classiques de protéines par une voie encore inconnue, ou de la lyse cellulaire mécanique lors de l'extraction de la MEC, par exemple par une agitation excessive. Parmi les

protéines intracellulaires identifiées de notre étude, 12,4% seulement étaient des protéines ribosomiques en comparaison à l'étude de Martinez *et al.* (27% du total des protéines). L'accumulation de protéines cytoplasmiques, telles que les protéines ribosomales ou les facteurs de virulence, pourrait être une stratégie de « *moonlighting* » pour stabiliser la structure du biofilm par des liaisons électrostatiques avec d'autres composés de la MEC, et/ou pour médier l'attachement à l'hôte (Foulston *et al.*, 2014; Graf *et al.*, 2019).

Parmi les 20 protéines matricielles les plus abondantes identifiées dans la matrice des deux souches se trouvait LytR, un régulateur transcriptionnel appartenant au système de régulation à deux composants LytSR, qui s'est avéré être impliqué dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis* (Lehman *et al.*, 2015; Dahyot *et al.*, 2020). De plus, une protéine contenant un domaine de liaison au peptidoglycane LysM a été identifiée. Chez *S. aureus*, le domaine LysM (*Lysin Motif*) des protéines médie l'adhérence au fibrinogène, à la fibronectine et à la vitronectine de la matrice extracellulaire de l'hôte (Hirschhausen *et al.*, 2012). Fait intéressant, une LTA synthase a également été trouvée, nécessaire à la synthèse des acides teichoïques, jouant un rôle important dans l'adhésion initiale aux surfaces biotiques (Schilcher and Horswill, 2020).

Les analyses KEGG ont révélé que la MEC du biofilm des deux souches de *S. lugdunensis* était enrichie en protéines impliquées dans les voies métaboliques, et en particulier le métabolisme glucidique, comme précédemment décrit chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Gil *et al.*, 2014; Martínez-García *et al.*, 2021; Malviya *et al.*, 2023). Nous avons identifié plus particulièrement un grand nombre de protéines impliquées dans la glycolyse et la gluconéogenèse, alors que peu de protéines du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ont été trouvées. Des études comparant les protéomes des cellules planctoniques et des biofilms ont montré que les biofilms présentent des modèles métaboliques uniques avec une reprogrammation métabolique importante. En particulier, des enzymes glycolytiques ont été identifiées dans le biofilm, telles que l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui est fortement exprimée dans le biofilm de *S. aureus* (Malviya *et al.*, 2023). Cette enzyme a également été identifiée comme très abondante dans la matrice du biofilm de *S. lugdunensis*, en particulier dans celui de la souche 03MC. Martinez *et al.* n'ont identifié aucune protéine du cycle du TCA dans la matrice du biofilm de *S. epidermidis*. Ils ont proposé que, parce que la pyruvate déshydrogénase n'était pas enrichie ou absente, le cycle du TCA n'était pas actif et n'affectait pas la transcription de l'opéron *icaADBC* pour conduire la formation de biofilm (Martínez-García *et al.*, 2021). Au contraire, chez *S. aureus*, la formation de biofilm a été initiée par des métabolites produits par

le cycle du TCA en activant la transcription de l'opéron *icaADBC* (Malviya *et al.*, 2023). Il serait intéressant dans une future étude de comparer les protéomes de cultures planctoniques *versus* biofilms pour confirmer l'implication de ces voies métaboliques dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*, mais également de réaliser des études métabolomiques en utilisant des techniques métaboliques telles que la résonance magnétique nucléaire (Malviya *et al.*, 2023).

Les protéines membranaires représentaient 13 % des protéines identifiées dans le biofilm matriciel de *S. lugdunensis*, un taux supérieur à celui de Martinez *et al.* qui ont identifié 6,9 % de protéines membranaires dans le biofilm de *S. epidermidis* (Martínez-García *et al.*, 2021). Parmi les protéines membranaires, huit étaient des transporteurs ABC, qui pourraient être impliqués dans l'excrétion de protéines cytoplasmiques ou dans l'acquisition de nutriments. Des protéines de surface possédant le domaine d'ancrage LPXTG ont également été trouvées, et pourraient être impliquées dans l'adhésion initiale aux supports biotiques (Foster, 2019). Trois protéines de surface contenant le motif LPXTG ont été identifiées dans le biofilm matriciel de *S. lugdunensis*, dont deux protéines Isd (IsdA et IsdB). Ces protéines appartiennent à la famille des composants de surface microbienne reconnaissant les molécules de la matrice adhésive (MSCRAMM), précédemment décrites dans le biofilm de *S. aureus*. Lei *et al.* avaient retrouvé la protéine IsdA dans le protéome de la matrice du biofilm de *S. aureus* dans leur modèle d'infection associé à un implant orthopédique chez le rat (Lei, Gupta and Lee, 2017). Il a été démontré que la protéine IsdC de *S. lugdunensis* induisait la formation de biofilm dans des conditions de croissance à faible teneur en fer (Missineo *et al.*, 2014). L'identification dans notre étude de protéines Isd dans le protéome du biofilm cultivé en TSBG suggère que l'expression du locus ne serait pas limitée aux conditions de restriction en fer mais pourrait être étendue aux conditions rencontrées dans le biofilm. Les analyses CLSM ayant montrées des différences de production de protéines en fonction de la disponibilité en fer, il paraît intéressant d'étudier le protéome en milieu carencé en fer. Cependant la production moindre de biofilm de nos souches en milieu carencé pourrait être problématique pour l'analyse protéomique.

**Notre étude a été la première à étudier la capacité de formation de biofilm d'une si grande collection de souches de *S. lugdunensis* dans des milieux riche et carencé en fer. Nous avons montré que la formation et la composition du biofilm étaient fortement corrélées à l'affiliation au CC et à la disponibilité en fer. De plus, nous avons été les premiers à caractériser l'exoprotéome du biofilm de *S. lugdunensis*. Celui-ci a révélé que les protéines de la MEC étaient majoritairement des protéines métaboliques, et plus précisément des**

**protéines du métabolisme glucidique. Cette étude est d'importance car, compte tenu de la pathogénicité de cette espèce, comprendre comment se forme le biofilm et connaître sa composition permettrait de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour éradiquer et contrôler les infections liées au biofilm.**

## Conclusion générale

Ce travail de Doctorat avait pour objectif d'explorer deux des facteurs pouvant contribuer à l'adaptation et la persistance de certains complexes clonaux (CC1 et CC3) de *S. lugdunensis* en milieu hospitalier : la résistance aux antiseptiques et la formation de biofilm.

Dans un premier temps, l'étude de la sensibilité d'une large collection de 49 souches a permis de mettre en évidence que, contrairement aux autres SCNs, *S. lugdunensis* reste très sensible aux deux antiseptiques couramment utilisés en milieu hospitalier, le digluconate de chlorhexidine et le chlorure de benzalkonium. Cependant, notre étude a permis d'identifier deux premières souches appartenant au CC3 de sensibilité diminuée à ces deux antiseptiques. Le fait que parmi ces deux souches une soit résistante à la méticilline doit nous alerter sur le risque potentiel pour le contrôle des infections dans les établissements de santé en cas d'émergence de ce phénotype. Ce travail pourrait être complété par une étude d'un panel encore plus grand de souches (cliniques mais aussi environnementales) en testant d'autres antiseptiques. Il serait également intéressant d'évaluer l'impact de la formation de biofilm sur la résistance aux antiseptiques.

D'autre part, notre travail a évalué la capacité à former du biofilm en milieu riche et en milieu carencé en fer de cette même collection de souches de *S. lugdunensis*. Nous avons montré que la capacité de formation de biofilm était dépendante de la lignée phylogénétique, avec des comportements différant selon le milieu. Par ailleurs, par étude plus avancée de deux souches (une souche de CC3, forte productrice de biofilm en milieu riche, et une souche de CC6, forte productrice de biofilm en milieu carencé en fer), nous avons également mis en évidence par des tests d'inhibition de biofilm et par microscopie confocale que l'architecture et la composition de la matrice du biofilm variaient selon la souche et le milieu de culture. Enfin, nous avons décrit pour la première fois l'exoprotéome de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis* en milieu riche, révélant une prédominance de protéines intracellulaires, particulièrement impliquées dans le métabolisme des glucides. Compte tenu de la pathogénicité de cette espèce, la caractérisation de son biofilm pourrait contribuer à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour éradiquer le biofilm et les infections associées. Ces premières analyses protéomiques pourraient par ailleurs être complétées par une comparaison du protéome des cellules planctoniques et en biofilm, afin de confirmer les types de protéines mises en jeu dans la formation de biofilm.

## Références bibliographiques

- Addetia, A. *et al.* (2019) ‘A Novel, Widespread *qacA* Allele Results in Reduced Chlorhexidine Susceptibility in *Staphylococcus epidermidis*’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(6), pp. e02607-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.02607-18>.
- Akinkunmi, E.O. and Lamikanra, A. (2011) ‘Susceptibility of community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from faeces to antiseptics’, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6(04), pp. 317–323. Available at: <https://doi.org/10.3855/jidc.1609>.
- Aldman, M.H. *et al.* (2021) ‘Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*—a retrospective national registry-based study’, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(5), pp. 1103–1106. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04134-w>.
- Andersen, J. *et al.* (2015) ‘Multidrug Efflux Pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* Bacterial Food Pathogens’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(2), pp. 1487–1547. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph120201487>.
- Anderson, M. *et al.* (2017) ‘EssE Promotes *Staphylococcus aureus* ESS-Dependent Protein Secretion To Modify Host Immune Responses during Infection’, *Journal of Bacteriology*. Edited by T.J. Silhavy, 199(1). Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00527-16>.
- Anguera, I. (2005) ‘*Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles’, *Heart*, 91(2), pp. e10–e10. Available at: <https://doi.org/10.1136/hrt.2004.040659>.
- Archer, N.K. *et al.* (2011) ‘*Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease’, *Virulence*, 2(5), pp. 445–459. Available at: <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>.
- Arciola, C.R. *et al.* (2015) ‘Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects’, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007>.
- Argemi, X. *et al.* (2015) ‘Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative *Staphylococci* and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*’, *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by R. Patel, 53(7), pp. 2030–2036. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00177-15>.
- Argemi, Xavier, Hansmann, Y., *et al.* (2017) ‘Is *Staphylococcus lugdunensis* Significant in Clinical Samples?’, *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by C.S. Kraft, 55(11), pp. 3167–3174. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00846-17>.
- Argemi, Xavier, Prévost, G., *et al.* (2017a) ‘Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections’, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), pp. 298–304. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002>.
- Argemi, Xavier, Prévost, G., *et al.* (2017b) ‘Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections’, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), pp. 298–304. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002>.
- Argemi, X., Dahyot, S., *et al.* (2017) ‘*Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection’, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 47(7), pp. 498–501. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.05.005>.

- Argemi, X., Prévost, G., *et al.* (2017) 'VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*', *Clinical Microbiology and Infection*, 23(5), p. 334.e1-334.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.018>.
- Argemi, X. *et al.* (2018) 'Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-genome and multiple barriers to horizontal gene transfer', *BMC Genomics*, 19(1), p. 621. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4978-1>.
- Askar, M., Bloch, B. and Bayston, R. (2018) 'Small-colony variant of *Staphylococcus lugdunensis* in prosthetic joint infection', *Arthroplasty Today*, 4(3), pp. 257–260. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.artd.2018.06.003>.
- Aubourg, M. *et al.* (2020) 'Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*', *BMC Microbiology*, 20(1), p. 328. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02016-x>.
- Aubourg, M. *et al.* (2022) 'Inactivation of the Response Regulator AgrA Has a Pleiotropic Effect on Biofilm Formation, Pathogenesis and Stress Response in *Staphylococcus lugdunensis*', *Microbiology Spectrum*. Edited by K. Zhang, 10(1), pp. e01598-21. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01598-21>.
- Babu, E. and Oropello, J. (2011) '*Staphylococcus lugdunensis*: the coagulase-negative staphylococcus you don't want to ignore', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(10), pp. 901–907. Available at: <https://doi.org/10.1586/eri.11.110>.
- Bayles, K.W. (2007) 'The biological role of death and lysis in biofilm development', *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), pp. 721–726. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1743>.
- Becker, K. *et al.* (2020) 'Emergence of coagulase-negative staphylococci', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 18(4), pp. 349–366. Available at: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1730813>.
- Becker, K., Heilmann, C. and Peters, G. (2014) 'Coagulase-Negative Staphylococci', *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), pp. 870–926. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>.
- Bera, A. *et al.* (2004) 'Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*: Lysozyme resistance of *S. aureus*', *Molecular Microbiology*, 55(3), pp. 778–787. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x>.
- Bera, A. *et al.* (2006) 'The Presence of Peptidoglycan O -Acetyltransferase in Various Staphylococcal Species Correlates with Lysozyme Resistance and Pathogenicity', *Infection and Immunity*, 74(8), pp. 4598–4604. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00301-06>.
- Bieber, L. and Kahlmeter, G. (2010) '*Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora', *Clinical Microbiology and Infection*, 16(4), pp. 385–388. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02813.x>.
- Bitschar, K. *et al.* (2019) 'Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors', *Nature Communications*, 10(1), p. 2730. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10646-7>.
- Block, C. and Furman, M. (2002) 'Association between intensity of chlorhexidine use and microorganisms of reduced susceptibility in a hospital environment', *Journal of Hospital Infection*, 51(3), pp. 201–206. Available at: <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1246>.

- Böcher, S. *et al.* (2009) 'Staphylococcus lugdunensis', a Common Cause of Skin and Soft Tissue Infections in the Community', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), pp. 946–950. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01024-08>.
- Bose, J.L. *et al.* (2012) 'Contribution of the Staphylococcus aureus Atl AM and GL Murein Hydrolase Activities in Cell Division, Autolysis, and Biofilm Formation', *PLoS ONE*. Edited by H. Ton-That, 7(7), p. e42244. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042244>.
- Bourgeois, I. *et al.* (2007) 'Tolerance to the Glycopeptides Vancomycin and Teicoplanin in Coagulase-Negative Staphylococci', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2), pp. 740–743. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00719-06>.
- Bowden, M.G. *et al.* (2005) 'Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of Staphylococcus epidermidis', *Microbiology*, 151(5), pp. 1453–1464. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27534-0>.
- Bronesky, D. *et al.* (2019) 'A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in Staphylococcus aureus', *The EMBO Journal*, 38(6), p. e99363. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201899363>.
- Buffet-Bataillon, S. *et al.* (2012) 'Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(5), pp. 381–389. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011>.
- Burts, M.L. *et al.* (2005) 'EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(4), pp. 1169–1174. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0405620102>.
- Burts, M.L., DeDent, A.C. and Missiakas, D.M. (2008) 'EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of Staphylococcus aureus', *Molecular Microbiology*, 69(3), pp. 736–746. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06324.x>.
- Campoccia, D., Montanaro, L. and Arciola, C.R. (2021) 'Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), p. 9100. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22169100>.
- Cao, Z. *et al.* (2016) 'The type VII secretion system of Staphylococcus aureus secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria', *Nature Microbiology*, 2(1), p. 16183. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.183>.
- Cashin, P. *et al.* (2006) 'Contrasting signal transduction mechanisms in bacterial and eukaryotic gene transcription', *FEMS Microbiology Letters*, 261(2), pp. 155–164. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00295.x>.
- Chaignon, P. *et al.* (2007) 'Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), pp. 125–132. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0790-y>.
- Chang, S.-C. *et al.* (2019) 'Characterization of a novel, type II staphylococcal cassette chromosome mec element from an endemic oxacillin-resistant Staphylococcus lugdunensis clone in a hospital setting', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(8), pp. 2162–2165. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz189>.
- Chang, S.-C., Lin, L.-C. and Lu, J.-J. (2021) 'Comparative Genomic Analyses Reveal Potential Factors Responsible for the ST6 Oxacillin-Resistant Staphylococcus lugdunensis Endemic in a Hospital', *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 765437. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765437>.

- Chassain, B. *et al.* (2012) 'Multilocus Sequence Typing Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Implies a Clonal Population Structure', *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), pp. 3003–3009. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00988-12>.
- Chatzigeorgiou, K.-S. *et al.* (2010) '*fbl* gene as a species-specific target for *Staphylococcus lugdunensis* identification', *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 24(2), pp. 119–122. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcla.20352>.
- Cheng, C. *et al.* (2015) 'Persistence of a major endemic clone of oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* sequence type 6 at a tertiary medical centre in northern Taiwan', *International Journal of Infectious Diseases*, 36, pp. 72–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.05.022>.
- Cheung, G.Y.C. *et al.* (2010) 'Staphylococcus epidermidis Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils', *PLoS Pathogens*. Edited by M.S. Gilmore, 6(10), p. e1001133. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001133>.
- Cheung, G.Y.C. *et al.* (2011) 'Role of the Accessory Gene Regulator *agr* in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pathogenesis', *Infection and Immunity*. Edited by S.M. Payne, 79(5), pp. 1927–1935. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00046-11>.
- Chiba, A. *et al.* (2015) 'A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability', *Microbial Biotechnology*, 8(3), pp. 392–403. Available at: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12155>.
- Chin, D. *et al.* (2022) 'Staphylococcus lugdunensis Uses the Agr Regulatory System to Resist Killing by Host Innate Immune Effectors', *Infection and Immunity*. Edited by N.E. Freitag, 90(10), pp. e00099-22. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.00099-22>.
- Chiu, K.H.Y. *et al.* (2020) 'Emergence of *Staphylococcus lugdunensis* as a Cause of Urinary Tract Infection: Results of the Routine Use of MALDI-TOF MS', *Microorganisms*, 8(3), p. 381. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030381>.
- Choi, Seong-Ho *et al.* (2010) 'Incidence, Characteristics, and Outcomes of *Staphylococcus lugdunensis* Bacteremia', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), pp. 3346–3349. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00609-10>.
- Chokr, A. *et al.* (2006) 'Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci', *International Journal of Medical Microbiology*, 296(6), pp. 381–388. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.018>.
- Christensen, G.D. *et al.* (1982) 'Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces', *Infection and Immunity*, 37(1), pp. 318–326. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.37.1.318-326.1982>.
- Christner, M. *et al.* (2010) 'The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin', *Molecular Microbiology*, 75(1), pp. 187–207. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06981.x>.
- Christner, M. *et al.* (2012) '*sarA* negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA: *sarA* regulates *embp* expression and autolysis-dependent eDNA release', *Molecular Microbiology*, 86(2), pp. 394–410. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08203.x>.
- 'Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07 11th Edition 2018' (2018).

- Conlon, B.P. *et al.* (2014) 'Role for the A Domain of Unprocessed Accumulation-Associated Protein (Aap) in the Attachment Phase of the Staphylococcus epidermidis Biofilm Phenotype', *Journal of Bacteriology*, 196(24), pp. 4268–4275. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01946-14>.
- Conlon, K.M., Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2002) 'icaR Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of ica Operon Expression and Biofilm Formation in Staphylococcus epidermidis', *Journal of Bacteriology*, 184(16), pp. 4400–4408. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4400-4408.2002>.
- Correa, J.E. *et al.* (no date) 'First report of qacG, qacH and qacJ genes in Staphylococcus haemolyticus human clinical isolates', p. 5.
- Costa, S.S. *et al.* (2013) 'Multidrug Efflux Pumps in Staphylococcus aureus: an Update', *The Open Microbiology Journal*, 7(1), pp. 59–71. Available at: <https://doi.org/10.2174/1874285801307010059>.
- Costa, S.S. *et al.* (2019) 'Genetic Diversity of norA, Coding for a Main Efflux Pump of Staphylococcus aureus', *Frontiers in Genetics*, 9, p. 710. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00710>.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.-J. (1978) 'How Bacteria Stick', *Scientific American*, 238(1), pp. 86–95. Available at: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>.
- Cramton, S.E. *et al.* (1999) 'The Intercellular Adhesion ( ica ) Locus Is Present in Staphylococcus aureus and Is Required for Biofilm Formation', *Infection and Immunity*. Edited by S.H.E. Kaufmann, 67(10), pp. 5427–5433. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.67.10.5427-5433.1999>.
- Crosby, H.A. *et al.* (2016) 'The Staphylococcus aureus Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression', *PLOS Pathogens*. Edited by M. Otto, 12(5), p. e1005604. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005604>.
- Cucarella, C. *et al.* (2001) 'Bap, a Staphylococcus aureus Surface Protein Involved in Biofilm Formation', *Journal of Bacteriology*, 183(9), pp. 2888–2896. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>.
- Dahyot, S. *et al.* (2018) 'Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping Staphylococcus lugdunensis', *Scientific Reports*, 8(1), p. 11669. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30144-y>.
- Dahyot, S. *et al.* (2019) 'fbl-Typing of Staphylococcus lugdunensis: A Frontline Tool for Epidemiological Studies, but Not Predictive of Fibrinogen Binding Ability', *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 1109. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01109>.
- Dahyot, S. *et al.* (2020) 'Role of the LytSR Two-Component Regulatory System in Staphylococcus lugdunensis Biofilm Formation and Pathogenesis', *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 39. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00039>.
- Del Pozo, J.L. (2018) 'Biofilm-related disease', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(1), pp. 51–65. Available at: <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>.
- Delaunay, F. *et al.* (2014) 'Fasciites nécrosantes à Staphylococcus lugdunensis après dermolipéctomie abdominale : à propos de deux cas et revue de la littérature', *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*, 59(2), pp. 136–139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2013.12.002>.
- Didi, J. *et al.* (2014) 'Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of Staphylococcus lugdunensis Generates Results Consistent with a Clonal Population Structure and Is Reliable for Epidemiological Typing', *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by D.J. Diekema, 52(10), pp. 3624–3632. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01370-14>.

- Doherty, N. *et al.* (2006) 'Functional Analysis of *luxS* in *Staphylococcus aureus* Reveals a Role in Metabolism but Not Quorum Sensing', *Journal of Bacteriology*, 188(8), pp. 2885–2897. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.2885-2897.2006>.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) 'Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms', *CLIN. MICROBIOL. REV.*, 15.
- Donvito, B. *et al.* (1997) 'Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-*agr* genetic locus', *Infection and Immunity*, 65(1), pp. 95–100. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.65.1.95-100.1997>.
- Donvito, B. *et al.* (2006) 'Distribution of the synergistic haemolysin genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in human staphylococci', *FEMS Microbiology Letters*, 151(2), pp. 139–144. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12562.x>.
- Dunman, P.M. *et al.* (2001) 'Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the *agr* and/or *sarA* Loci', *Journal of Bacteriology*, 183(24), pp. 7341–7353. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7341-7353.2001>.
- Ebright, J.R., Penugonda, N. and Brown, W. (2004) 'Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48(1), pp. 17–21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.08.008>.
- von Eiff, C., Peters, G. and Heilmann, C. (2002) 'Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci', *The Lancet Infectious Diseases*, 2(11), pp. 677–685. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00438-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00438-3).
- El Sayed Zaki, M., Bastawy, S. and Montasser, K. (2019) 'Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, pp. 94–97. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.022>.
- Farrand, A.J. *et al.* (2015) 'An Iron-Regulated Autolysin Remodels the Cell Wall To Facilitate Heme Acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*', *Infection and Immunity*. Edited by A. Camilli, 83(9), pp. 3578–3589. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00397-15>.
- Fernández-Fernández, R. *et al.* (2022) 'Antimicrobial Resistance and Antimicrobial Activity of *Staphylococcus lugdunensis* Obtained from Two Spanish Hospitals', *Microorganisms*, 10(8), p. 1480. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081480>.
- Fey, P.D. and Olson, M.E. (2010) 'Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*', *Future Microbiology*, 5(6), pp. 917–933. Available at: <https://doi.org/10.2217/fmb.10.56>.
- Fiorentino, F.A.M., Corrêa, M.A. and Salgado, H.R.N. (2013) 'Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution', *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), pp. 351–358. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000200017>.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2005) 'Evidence for *icaADBC* -Independent Biofilm Development Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), pp. 1973–1976. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1973-1976.2005>.
- Flanagan, R.S. *et al.* (2022) 'In vivo growth of *Staphylococcus lugdunensis* is facilitated by the concerted function of heme and non-heme iron acquisition mechanisms', *Journal of Biological Chemistry*, 298(5), p. 101823. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101823>.

- Fleue, J. (no date) 'AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS', p. 12.
- Foster, T.J. (2019) 'The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci', *Trends in Microbiology*, 27(11), pp. 927–941. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.007>.
- Foulston, L. *et al.* (2014) 'The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH', *mBio*. Edited by B.B. Finlay, 5(5), pp. e01667-14. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01667-14>.
- Fournier, B. and Hooper, D.C. (2000) 'A New Two-Component Regulatory System Involved in Adhesion, Autolysis, and Extracellular Proteolytic Activity of *Staphylococcus aureus*', *Journal of Bacteriology*, 182(14), pp. 3955–3964. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.182.14.3955-3964.2000>.
- Frank, K.L. *et al.* (2007) 'In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus lugdunensis* Clinical Isolates', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(3), pp. 888–895. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01052-06>.
- Frank, K.L. and Patel, R. (2007) 'Poly- *N* -Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC* -Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates', *Infection and Immunity*, 75(10), pp. 4728–4742. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00640-07>.
- Frank, K.L., del Pozo, J.L. and Patel, R. (2008) 'From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*', *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), pp. 111–133. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-07>.
- Freney, J. *et al.* (1988) '*Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., Two Species from Human Clinical Specimens', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(2), pp. 168–172. Available at: <https://doi.org/10.1099/00207713-38-2-168>.
- Fu, S. *et al.* (2023) 'Characteristics of staphylococcal cassette chromosome *mec* and *lugdunin* operon genes in the complete genome of *Staphylococcus lugdunensis*', *Chinese Medical Journal*, 136(11), pp. 1367–1369. Available at: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002430>.
- Fuqua, C., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2001) 'Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing', *Annual Review of Genetics*, 35(1), pp. 439–468. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>.
- Furi, L. *et al.* (2013) 'Evaluation of Reduced Susceptibility to Quaternary Ammonium Compounds and Bisbiguanides in Clinical Isolates and Laboratory-Generated Mutants of *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), pp. 3488–3497. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00498-13>.
- Geoghegan, J.A. *et al.* (2010) 'Role of Surface Protein SasG in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*', *Journal of Bacteriology*, 192(21), pp. 5663–5673. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00628-10>.
- Gibert, L. *et al.* (2014) 'The major autolysin of *Staphylococcus lugdunensis*, AtlL, is involved in cell separation, stress-induced autolysis and contributes to bacterial pathogenesis', *FEMS Microbiology Letters*, 352(1), pp. 78–86. Available at: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12374>.
- Gil, C. *et al.* (2014) 'Biofilm Matrix Exoproteins Induce a Protective Immune Response against *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection', *Infection and Immunity*. Edited by A. Camilli, 82(3), pp. 1017–1029. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.01419-13>.

- Giormezis, N. *et al.* (2015) 'Virulence factors among *Staphylococcus lugdunensis* are associated with infection sites and clonal spread', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(4), pp. 773–778. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2291-8>.
- Gotz, F. (2002) 'Staphylococcus and biofilms', *Molecular Microbiology*, 43(6), pp. 1367–1378. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02827.x>.
- Graf, A.C. *et al.* (2019) 'Virulence Factors Produced by *Staphylococcus aureus* Biofilms Have a Moonlighting Function Contributing to Biofilm Integrity', *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(6), pp. 1036–1053. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001120>.
- Grande, R. *et al.* (2014) 'Temporal expression of *agrB*, *cida*, and *alsS* in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates', *Pathogens and Disease*, 70(3), pp. 414–422. Available at: <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12158>.
- Guet-Revillet, H. *et al.* (2014) 'Bacterial Pathogens Associated with Hidradenitis Suppurativa, France', *Emerging Infectious Diseases*, 20(12), pp. 1990–1998. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2012.140064>.
- Guimaraes, C.P. *et al.* (2013) 'Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions', *Nature Protocols*, 8(9), pp. 1787–1799. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.101>.
- Guo, Y. *et al.* (2020) 'Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, p. 107. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>.
- Hagstrand Aldman, M. and Pählman, L.I. (2020) 'Evaluation of penicillin G susceptibility testing methods for *Staphylococcus lugdunensis*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(5), pp. 1206–1211. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa004>.
- Hagstrand Aldman, M., Thompson, O. and Pählman, L.I. (2023) 'Biofilm formation is associated with poor outcome in prosthetic joint infections caused by *Staphylococcus lugdunensis*', *Infectious Diseases*, pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.1080/23744235.2023.2180534>.
- Haley, K.P. *et al.* (2011) 'Staphylococcus lugdunensis IsdG Liberates Iron from Host Heme', *Journal of Bacteriology*, 193(18), pp. 4749–4757. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00436-11>.
- Handke, L.D. *et al.* (2008) '*Staphylococcus epidermidis saeR* Is an Effector of Anaerobic Growth and a Mediator of Acute Inflammation', *Infection and Immunity*, 76(1), pp. 141–152. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00556-07>.
- Hardy, K. *et al.* (2018) 'Increased Usage of Antiseptics Is Associated with Reduced Susceptibility in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*', *mBio*. Edited by G.D. Wright, 9(3), pp. e00894-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00894-18>.
- Hauser, N. *et al.* (2021) 'Multicenter retrospective cohort study of the clinical significance of *Staphylococcus lugdunensis* isolated from a single blood culture set', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 99(3), p. 115261. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115261>.
- Heilbronner, S. *et al.* (2011) 'Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence', *FEMS Microbiology Letters*, 322(1), pp. 60–67. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x>.

- Heilbronner, S. *et al.* (2016) 'Competing for Iron: Duplication and Amplification of the *isd* Locus in *Staphylococcus lugdunensis* HKU09-01 Provides a Competitive Advantage to Overcome Nutritional Limitation', *PLOS Genetics*. Edited by D.A. Garsin, 12(8), p. e1006246. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006246>.
- Heilbronner, S. and Foster, T.J. (2021) 'Staphylococcus lugdunensis: a Skin Commensal with Invasive Pathogenic Potential', *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), p. 18.
- Heilmann, C., Ziebuhr, W. and Becker, K. (2018) 'Are coagulase-negative staphylococci virulent?', *Clinical Microbiology and Infection* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>.
- Heilmann, C., Ziebuhr, W. and Becker, K. (2019) 'Are coagulase-negative staphylococci virulent?', *Clinical Microbiology and Infection*, 25(9), pp. 1071–1080. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>.
- Heldt Manica, L.A. and Cohen, P.R. (2017) 'Staphylococcus lugdunensis Infections of the Skin and Soft Tissue: A Case Series and Review', *Dermatology and Therapy*, 7(4), pp. 555–562. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13555-017-0202-5>.
- Hellbacher, C., Törnqvist, E. and Söderquist, B. (2006) 'Staphylococcus lugdunensis: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates', *Clinical Microbiology and Infection*, 12(1), pp. 43–49. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01296.x>.
- Herchline, T.E. *et al.* (1990) 'Penicillinase production and in vitro susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(12), pp. 2434–2435. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.34.12.2434>.
- Herry, Y. *et al.* (2022) 'Staphylococcus lugdunensis prosthetic joint infection: A multicentric cohort study', *Journal of Infection*, 85(6), pp. 652–659. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.10.025>.
- Hijazi, K. (2016) 'Susceptibility to chlorhexidine amongst multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from bloodstream infections', *International Journal of Antimicrobial Agents*, p. 5.
- Hiltunen, A.K. *et al.* (2019) 'Structural and Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials', *Microorganisms*, 7(12), p. 584. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120584>.
- Hiramatsu, K. *et al.* (2014) 'Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy', *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), pp. 593–601. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.001>.
- Hirschhausen, N. *et al.* (2012) 'Characterization of the Modular Design of the Autolysin/Adhesin Aaa from *Staphylococcus Aureus*', *PLoS ONE*. Edited by M. Hensel, 7(6), p. e40353. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040353>.
- Ho, P.-L. *et al.* (2015) 'Carriage niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 81(2), pp. 141–144. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.10.004>.
- Ho, P.-L. *et al.* (2021) 'Improved Detection of *mecA*-Mediated  $\beta$ -Lactam Resistance in *Staphylococcus lugdunensis* Using a New Oxacillin Salt Agar Screen', *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 704552. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.704552>.

- Horner, C., Mawer, D. and Wilcox, M. (2012) 'Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter?', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), pp. 2547–2559. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dks284>.
- Htun, H.L. *et al.* (2019) 'Chlorhexidine and octenidine use, carriage of qac genes, and reduced antiseptic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a healthcare network', *Clinical Microbiology and Infection*, 25(9), p. 1154.e1-1154.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.036>.
- Hussain, M. *et al.* (1997) 'A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces', *Infection and Immunity*, 65(2), pp. 519–524. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.65.2.519-524.1997>.
- Hussain, M. *et al.* (2015) 'The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization', *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), pp. 129–139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.010>.
- Hussain, M., Kohler, C. and Becker, K. (2020) 'Role of SrtA in Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*', *Microorganisms*, 8(12), p. 1975. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121975>.
- Idrees, M. *et al.* (2021) 'Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), p. 7602. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>.
- Ignak, S., Nakipoglu, Y. and Gurler, B. (2017) 'Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey', *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), p. 88. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0244-6>.
- Izano, E.A. *et al.* (2008) 'Differential Roles of Poly- *N*-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), pp. 470–476. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.02073-07>.
- Jefferson, K.K. *et al.* (2004) 'The Teicoplanin-Associated Locus Regulator (TcaR) and the Intercellular Adhesin Locus Regulator (IcaR) Are Transcriptional Inhibitors of the *ica* Locus in *Staphylococcus aureus*', *Journal of Bacteriology*, 186(8), pp. 2449–2456. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2449-2456.2004>.
- Jenedi, K. (2014) 'Relationship between the resistance genes to quaternary ammonium compounds and antibiotic resistance in staphylococci isolated from surgical site infections', *Medical Science Monitor*, 20, pp. 544–550. Available at: <https://doi.org/10.12659/MSM.890177>.
- Jiang, Q., Jin, Z. and Sun, B. (2018) 'MgrA Negatively Regulates Biofilm Formation and Detachment by Repressing the Expression of *psm* Operons in *Staphylococcus aureus*', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by H. Nojiri, 84(16), pp. e01008-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.01008-18>.
- Jochim, A. *et al.* (2020) 'An ECF-type transporter scavenges heme to overcome iron-limitation in *Staphylococcus lugdunensis*', *eLife*, 9, p. e57322. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.57322>.
- Johnson, M. *et al.* (2005) 'Iron-Responsive Regulation of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Involves Fur-Dependent and Fur-Independent Mechanisms', *Journal of Bacteriology*, 187(23), pp. 8211–8215. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8211-8215.2005>.

- Johnson, M. *et al.* (2011) 'Fur is required for the activation of virulence gene expression through the induction of the *sae* regulatory system in *Staphylococcus aureus*', *International Journal of Medical Microbiology*, 301(1), pp. 44–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.003>.
- Julia M Ross, N.I. and Marten, M.R. (2015) 'Proteome Analyses of *Staphylococcus aureus* Biofilm at Elevated Levels of NaCl', *Clinical Microbiology: Open Access*, 04(05). Available at: <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000219>.
- Kampf, G. (2016) 'Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an “antiseptic stewardship” initiative?', *Journal of Hospital Infection*, 94(3), pp. 213–227. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.018>.
- Kampf, G. (no date) 'Adaptive microbial response to low level benzalkonium chloride exposure', p. 55.
- Kao, C.-Y. *et al.* (2021) 'Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas Systems in *Staphylococcus lugdunensis*', *Microbiology Spectrum*. Edited by S.L. Chen, 9(3), pp. e01247-21. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01247-21>.
- Kaplan, J.B. *et al.* (2004) 'Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), pp. 2633–2636. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004>.
- Kernberger-Fischer, I.A. *et al.* (2018) 'Susceptibility of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates of Various Clonal Lineages from Germany to Eight Biocides', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by E.G. Dudley, 84(13), pp. e00799-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.00799-18>.
- Kiedrowski, M.R. *et al.* (2011) 'Nuclease Modulates Biofilm Formation in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*', *PLoS ONE*. Edited by M. Otto, 6(11), p. e26714. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026714>.
- Kleiner, E. *et al.* (2010) 'Clinical Significance of *Staphylococcus lugdunensis* Isolated from Routine Cultures', *Clinical Infectious Diseases*, 51(7), pp. 801–803. Available at: <https://doi.org/10.1086/656280>.
- Kneuper, H. *et al.* (2014) 'Heterogeneity in *ess* transcriptional organization and variable contribution of the *Ess*/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylococcus aureus* strains: Type VII secretion in *S. aureus*', *Molecular Microbiology*, 93(5), pp. 928–943. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.12707>.
- Knobloch, J.K.-M. *et al.* (2001) 'Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* Depends on Functional RsbU, an Activator of the *sigB* Operon: Differential Activation Mechanisms Due to Ethanol and Salt Stress', *Journal of Bacteriology*, 183(8), pp. 2624–2633. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2624-2633.2001>.
- Knobloch, J.K.-M. *et al.* (2004) 'RsbU-Dependent Regulation of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation Is Mediated via the Alternative Sigma Factor  $\sigma^B$  by Repression of the Negative Regulator Gene *icaR*', *Infection and Immunity*, 72(7), pp. 3838–3848. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3838-3848.2004>.
- Kogan, G. *et al.* (2006) 'Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin', *FEMS Microbiology Letters*, 255(1), pp. 11–16. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00043.x>.
- Kosecka-Strojek, M. *et al.* (2022) 'May *Staphylococcus lugdunensis* Be an Etiological Factor of Chronic Maxillary Sinuses Infection?', *Int. J. Mol. Sci.*, p. 12.

- Kranjec, C. *et al.* (2021) ‘Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives’, *Antibiotics*, 10(2), p. 131. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020131>.
- LaBreck, P.T. *et al.* (2020) ‘Systematic Analysis of Efflux Pump-Mediated Antiseptic Resistance in *Staphylococcus aureus* Suggests a Need for Greater Antiseptic Stewardship’, *mSphere*. Edited by P. Dunman, 5(1), pp. e00959-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00959-19>.
- Lambe Jr., D.W. *et al.* (1990) ‘Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors’, *Canadian Journal of Microbiology*, 36(7), pp. 455–463. Available at: <https://doi.org/10.1139/m90-080>.
- Le, K.Y. *et al.* (2019) ‘Role of Phenol-Soluble Modulins in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation and Infection of Indwelling Medical Devices’, *Journal of Molecular Biology*, 431(16), pp. 3015–3027. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.030>.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. and Beloin, C. (2014) ‘Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics’, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), pp. 510–543. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>.
- Lebeurre, J. *et al.* (2019) ‘Comparative Genome Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Shows Clonal Complex-Dependent Diversity of the Putative Virulence Factor, *ess*/Type VII Locus’, *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 2479. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02479>.
- Lehman, M.K. *et al.* (2015) ‘Identification of the amino acids essential for LytSR-mediated signal transduction in *S. taphylococcus aureus* and their roles in biofilm-specific gene expression: Defining LytSR signal transduction’, *Molecular Microbiology*, 95(4), pp. 723–737. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.12902>.
- Lei, M.G., Gupta, R.Kr. and Lee, C.Y. (2017) ‘Proteomics of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix in a rat model of orthopedic implant-associated infection’, *PLOS ONE*. Edited by M.N. Seleem, 12(11), p. e0187981. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187981>.
- Lekshmi, M. (no date) ‘Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*’, *AIMS Microbiology*, 4(1), p. 18.
- Lepointeur, M. (2013) ‘Prevalence of resistance to antiseptics and mupirocin among invasive coagulase-negative staphylococci from very preterm neonates in NICU: the creeping threat?’, *Journal of Hospital Infection*, p. 4.
- Lerch, M.F. *et al.* (2019) ‘A non-coding RNA from the intercellular adhesion ( *ica* ) locus of *Staphylococcus epidermidis* controls polysaccharide intercellular adhesion (PIA)-mediated biofilm formation’, *Molecular Microbiology*, 111(6), pp. 1571–1591. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14238>.
- Levin-Reisman, I. *et al.* (2017) ‘Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance’, *Science*, 355(6327), pp. 826–830. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>.
- Liang, X. *et al.* (2006) ‘Inactivation of a Two-Component Signal Transduction System, SaeRS, Eliminates Adherence and Attenuates Virulence of *Staphylococcus aureus*’, *Infection and Immunity*, 74(8), pp. 4655–4665. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00322-06>.
- Liesenborghs, L. *et al.* (2016) ‘Shear-Resistant Binding to von Willebrand Factor Allows *Staphylococcus lugdunensis* to Adhere to the Cardiac Valves and Initiate Endocarditis’, *Journal of Infectious Diseases*, 213(7), pp. 1148–1156. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv773>.

- Lin, L.-C. *et al.* (2021) ‘Molecular Epidemiological Survey of Staphylococcus lugdunensis Isolates With Variable Number of Repeats in the von Willebrand Factor-Binding Protein Gene’, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, p. 748640. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.748640>.
- Lin, M.-H. *et al.* (2012) ‘Involvement of Iron in Biofilm Formation by Staphylococcus aureus’, *PLoS ONE*. Edited by J.R. Fitzgerald, 7(3), p. e34388. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034388>.
- Liu, M.C.-J. *et al.* (2019) ‘Structures of SCCmec elements in methicillin-resistant Staphylococcus lugdunensis are closely related to those harboured by community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus’, *Journal of Medical Microbiology*, 68(9), pp. 1367–1372. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001013>.
- Liu, P.-Y. *et al.* (2010) ‘Staphylococcus lugdunensis Infective Endocarditis: A Literature Review and Analysis of Risk Factors’, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(6), pp. 478–484. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1684-1182\(10\)60074-6](https://doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60074-6).
- Lourtet-Hascoët, J. (2016) ‘Staphylococcus lugdunensis, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis’, *International Journal of Infectious Diseases*, p. 6.
- Lozano-Masdemont, B., Gómez-Recuero-Muñoz, L. and Pulido-Pérez, A. (2015) ‘Staphylococcus lugdunensis: un patógeno emergente en infecciones de piel y partes blandas’, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 106(9), pp. 769–770. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2015.02.016>.
- Mack, D. *et al.* (1994) ‘Characterization of transposon mutants of biofilm-producing Staphylococcus epidermidis impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin’, *Infection and Immunity*, 62(8), pp. 3244–3253. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3244-3253.1994>.
- Maillard, J.-Y. (2018) ‘Resistance of Bacteria to Biocides’, *Microbiology Spectrum*. Edited by F.M. Aarestrup *et al.*, 6(2), p. 6.2.19. Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0006-2017>.
- Malviya, J. *et al.* (2023) ‘Metabolomic profiling of bacterial biofilm: trends, challenges, and an emerging antibiofilm target’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(8), p. 212. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03651-y>.
- Marrie, T.J., Nelligan, J. and Costerton, J.W. (1982) ‘A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead.’, *Circulation*, 66(6), pp. 1339–1341. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.66.6.1339>.
- Martínez-García, S. *et al.* (2021) ‘Proteomic comparison of biofilm vs. planktonic Staphylococcus epidermidis cells suggests key metabolic differences between these conditions’, *Research in Microbiology*, 172(2), p. 103796. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.103796>.
- Mateo, M. *et al.* (2005) ‘Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of Staphylococcus lugdunensis’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), pp. 287–291. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dki227>.
- May, J. *et al.* (no date) ‘Glycopeptide tolerance in Staphylococcus aureus’.
- Mayer, S. (2001) ‘Distribution of the antiseptic resistance genes qacA, qacB and qacC in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of Staphylococcus aureus’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6), pp. 896–897. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/47.6.896>.

- McDonnell, G. and Russell, A.D. (1999) 'Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance', *CLIN. MICROBIOL. REV.*, 12, p. 33.
- McHardy, I.H. *et al.* (2017) 'Clinical and Microbiological Aspects of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Staphylococcus lugdunensis*', *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by N.A. Ledeboer, 55(2), pp. 585–595. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02092-16>.
- Michels, R. *et al.* (2021) 'Update on Coagulase-Negative Staphylococci—What the Clinician Should Know', *Microorganisms*, 9(4), p. 830. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040830>.
- Missineo, A. *et al.* (2014) 'IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* Induces Biofilm Formation under Low-Iron Growth Conditions', *Infection and Immunity*. Edited by A. Camilli, 82(6), pp. 2448–2459. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.01542-14>.
- Mitchell, J., Tristan, A. and Foster, T.J. (2004) 'Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*', *Microbiology*, 150(11), pp. 3831–3841. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27337-0>.
- Moormeier, D.E. *et al.* (2014) 'Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development', *mBio*. Edited by G.M. Dunny and E.P. Greenberg, 5(5), pp. e01341-14. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>.
- Moormeier, D.E. and Bayles, K.W. (2017) '*Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism: *Molecular mechanisms of S. aureus biofilm development*', *Molecular Microbiology*, 104(3), pp. 365–376. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>.
- Morrissey, I. *et al.* (2014) 'Evaluation of Epidemiological Cut-Off Values Indicates that Biocide Resistant Subpopulations Are Uncommon in Natural Isolates of Clinically-Relevant Microorganisms', *PLOS ONE*, 9(1), p. 10.
- Muthukrishnan, G. *et al.* (2011) 'Exoproteome of *Staphylococcus aureus* Reveals Putative Determinants of Nasal Carriage', *Journal of Proteome Research*, 10(4), pp. 2064–2078. Available at: <https://doi.org/10.1021/pr200029r>.
- Naicker, P.R. *et al.* (2016) 'Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage', *Microbial Pathogenesis*, 90, pp. 41–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.023>.
- Natsis, N.E. and Cohen, P.R. (2018) 'Coagulase-Negative *Staphylococcus* Skin and Soft Tissue Infections', *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(5), pp. 671–677. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0362-9>.
- Nguyen, H.T.T., Nguyen, T.H. and Otto, M. (2020) 'The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, pp. 3324–3334. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>.
- Nicolae Dopcea, G. *et al.* (2020) 'Resistance and cross-resistance in *Staphylococcus* spp. strains following prolonged exposure to different antiseptics', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, pp. 399–404. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.021>.
- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Guss, B., *et al.* (2004) 'A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*', *FEMS Microbiology Letters*, 241(1), pp. 87–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.008>.

- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Wiebenschj, Å., et al. (2004) 'A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*', *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), pp. 155–161. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09527.x>.
- Noguchi, N. et al. (1999) 'Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *FEMS Microbiology Letters*, 172(2), pp. 247–253. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13475.x>.
- Noguchi, N. et al. (2007) 'Association of tannase-producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene', *Journal of Gastroenterology*, 42(5), pp. 346–351. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00535-007-2012-5>.
- Non, L.R. and Santos, C.A.Q. (2017) 'The occurrence of infective endocarditis with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: A retrospective cohort study and systematic review', *Journal of Infection*, 74(2), pp. 179–186. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.10.003>.
- O’Gara, J.P. (2007) 'ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*', *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), pp. 179–188. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>.
- Olivares, E. et al. (2016) 'The BioFilm Ring Test: a Rapid Method for Routine Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation Kinetics', *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by R. Patel, 54(3), pp. 657–661. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02938-15>.
- Oliveira, F., França, Â. and Cerca, N. (2017) 'Staphylococcus epidermidis is largely dependent on iron availability to form biofilms', *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), pp. 552–563. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.08.009>.
- O’Neill, E. et al. (2007) 'Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections', *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), pp. 1379–1388. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02280-06>.
- O’Riordan, K. and Lee, J.C. (2004) '*Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides', *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), pp. 218–234. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.218-234.2004>.
- Otto, M. (2009) 'Staphylococcal biofilms', *Curr Top Microbiol Immunol*. [Preprint].
- Parthasarathy, S. et al. (2020) 'Staphylococcus lugdunensis: Review of Epidemiology, Complications, and Treatment', *Cureus* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.8801>.
- Paulsen, I.T. et al. (1996) 'Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), pp. 3630–3635. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3630>.
- Peng, Q. et al. (2022) 'A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism', *Antibiotics*, 12(1), p. 12. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>.
- Pereira, E.M. et al. (2012) 'A Brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epithelial cells', *Journal of Medical Microbiology*, 61(4), pp. 463–469. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033001-0>.
- Peschel, A. et al. (1999) 'Inactivation of the dlt Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides', *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), pp. 8405–8410. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8405>.

- Peschel, A. *et al.* (2001) 'Staphylococcus aureus Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing via the Novel Virulence Factor Mprf Is Based on Modification of Membrane Lipids with 1-Lysine', *Journal of Experimental Medicine*, 193(9), pp. 1067–1076. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.193.9.1067>.
- Petti, C.A. *et al.* (2008) 'Genotypic Diversity of Coagulase-Negative Staphylococci Causing Endocarditis: a Global Perspective', *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), pp. 1780–1784. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.02405-07>.
- Pfaller, M.A. *et al.* (no date) 'Survey of Blood Stream Infections Attributable to Gram-Positive Cocci: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program'.
- Qian, W. *et al.* (2021) 'Equivalent effect of extracellular proteins and polysaccharides on biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*', *Biofouling*, 37(3), pp. 327–340. Available at: <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1914021>.
- Rachid, S. *et al.* (2000) 'Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), pp. 3357–3363. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3357-3363.2000>.
- Rachid, S. *et al.* (no date) 'Alternative Transcription Factor  $\square$ B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate'.
- Rajendran, N.B. *et al.* (2015) 'Important Contribution of the Novel Locus *comEB* to Extracellular DNA-Dependent *Staphylococcus lugdunensis* Biofilm Formation', *Infection and Immunity*. Edited by A. Camilli, 83(12), pp. 4682–4692. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00775-15>.
- Rautenberg, M. *et al.* (2011) 'Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence', *The FASEB Journal*, 25(4), pp. 1254–1263. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.10-175208>.
- Ravaioli, S. *et al.* (2012) 'Staphylococcus Lugdunensis, An Aggressive Coagulase-Negative Pathogen not to be Underestimated', *The International Journal of Artificial Organs*, 35(10), pp. 742–753. Available at: <https://doi.org/10.5301/ijao.5000142>.
- Ravaioli, S. *et al.* (2020) 'Various biofilm matrices of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis*: exopolysaccharides, proteins, eDNA and their correlation with biofilm mass', *Biofouling*, 36(1), pp. 86–100. Available at: <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1716217>.
- Rohde, H. *et al.* (2007) 'Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections', *Biomaterials*, 28(9), pp. 1711–1720. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.046>.
- Rozman, U. *et al.* (2021) 'Reduced Susceptibility and Increased Resistance of Bacteria against Disinfectants: A Systematic Review', *Microorganisms*, 9(12), p. 2550. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122550>.
- Sadovskaya, I. *et al.* (2006) 'Carbohydrate-containing components of biofilms produced *in vitro* by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 47(1), pp. 75–82. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00068.x>.

- Schauder, S. *et al.* (2001) 'The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule: AI-2 biosynthesis', *Molecular Microbiology*, 41(2), pp. 463–476. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x>.
- Schilcher, K. and Horswill, A.R. (2020) 'Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), pp. e00026-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>.
- Schilling, N.A. *et al.* (2019) 'Synthetic Lugdunin Analogues Reveal Essential Structural Motifs for Antimicrobial Action and Proton Translocation Capability', *Angewandte Chemie International Edition*, 58(27), pp. 9234–9238. Available at: <https://doi.org/10.1002/anie.201901589>.
- Schoenfelder, S.M.K. *et al.* (2019) 'The small non-coding RNA RsaE influences extracellular matrix composition in Staphylococcus epidermidis biofilm communities', *PLOS Pathogens*. Edited by M. Otto, 15(3), p. e1007618. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007618>.
- Schrank, C.L., Minbiole, K.P.C. and Wuest, W.M. (2020) 'Are Quaternary Ammonium Compounds, the Workhorse Disinfectants, Effective against Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2?', *ACS Infectious Diseases*, 6(7), pp. 1553–1557. Available at: <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.0c00265>.
- Schwartz, K. *et al.* (2012) 'Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize Staphylococcus aureus Biofilms', *PLoS Pathogens*. Edited by M.R. Parsek, 8(6), p. e1002744. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002744>.
- Schwartz, K. *et al.* (2014) 'The AgrD N-Terminal Leader Peptide of Staphylococcus aureus Has Cytolytic and Amyloidogenic Properties', *Infection and Immunity*. Edited by F.C. Fang, 82(9), pp. 3837–3844. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.02111-14>.
- Seifert, H. *et al.* (2005) 'Staphylococcus lugdunensis Pacemaker-related Infection', *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), pp. 1283–1286. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid1108.041177>.
- Shah, N.B. *et al.* (2010) 'Laboratory and Clinical Characteristics of Staphylococcus lugdunensis Prosthetic Joint Infections', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), pp. 1600–1603. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01769-09>.
- Shamsudin, M.N. (2012) 'High prevalence of qacA/B carriage among clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Malaysia', *Journal of Hospital Infection*, p. 3.
- Shibuya, R. *et al.* (2020) 'Complete genome sequence of a methicillin-resistant Staphylococcus lugdunensis strain and characteristics of its staphylococcal cassette chromosome mec', *Scientific Reports*, 10(1), p. 8682. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65632-7>.
- Skovgaard, S. *et al.* (2013) 'Recently introduced qacA/B genes in Staphylococcus epidermidis do not increase chlorhexidine MIC/MBC', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. dkt182. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt182>.
- Sommer, L.M. *et al.* (2020) 'The Prevalence of Antiseptic Tolerance Genes Among Staphylococci and Enterococci in a Pediatric Population', p. 15.
- Speziale, P. *et al.* (2014) 'Protein-based biofilm matrices in Staphylococci', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00171>.
- Stefani, S. *et al.* (2012) 'Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), pp. 273–282. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030>.

- Stepanović, S. *et al.* (2007) 'Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci', *APMIS*, 115(8), pp. 891–899. Available at: [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x).
- Szabados, F. *et al.* (2011) 'Fbl is not involved in the invasion of eukaryotic epithelial and endothelial cells by *Staphylococcus lugdunensis*', *FEMS Microbiology Letters*, 324(1), pp. 48–55. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02382.x>.
- Taglialegna, A. *et al.* (2016) 'Staphylococcal Bap Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals', *PLOS Pathogens*. Edited by M.R. Parsek, 12(6), p. e1005711. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005711>.
- Taglialegna, A., Lasa, I. and Valle, J. (2016) 'Amyloid Structures as Biofilm Matrix Scaffolds', *Journal of Bacteriology*. Edited by G.A. O'Toole, 198(19), pp. 2579–2588. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.00122-16>.
- Taha, L., Stegger, M. and Söderquist, B. (2019) 'Staphylococcus lugdunensis: antimicrobial susceptibility and optimal treatment options', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(8), pp. 1449–1455. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03571-6>.
- Taheri, N. *et al.* (2016) 'Frequency of Antiseptic Resistance Among Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From a University Hospital in Central Iran', *Oman Medical Journal*, 31(6), pp. 426–432. Available at: <https://doi.org/10.5001/omj.2016.86>.
- Tan, T.Y., Ng, S.Y. and He, J. (2008) 'Microbiological Characteristics, Presumptive Identification, and Antibiotic Susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*', *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7), pp. 2393–2395. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00740-08>.
- Tande, A.J. *et al.* (2014) 'Clinical Characteristics and Outcomes of Prosthetic Joint Infection Caused by Small Colony Variant Staphylococci', *mBio*. Edited by P. Gilligan, 5(5), pp. e01910-14. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01910-14>.
- Tasse, J. *et al.* (2018) 'Association between biofilm formation phenotype and clonal lineage in Staphylococcus aureus strains from bone and joint infections', *PLOS ONE*. Edited by C. Beloin, 13(8), p. e0200064. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200064>.
- Tee, W.S.N. *et al.* (2003) '*Staphylococcus lugdunensis* Carrying the *mecA* Gene Causes Catheter-Associated Bloodstream Infection in Premature Neonate', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), pp. 519–520. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.519-520.2003>.
- Teh, J.S.K. *et al.* (2022) 'Antimicrobial Susceptibility Testing for *Staphylococcus lugdunensis*', *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by C.-A.D. Burnham, 60(1), pp. e03202-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.03202-20>.
- Thoendel, M. *et al.* (2011) 'Peptide Signaling in the Staphylococci', *Chemical Reviews*, 111(1), pp. 117–151. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr100370n>.
- Tormo, M.Á. *et al.* (2005) 'SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development', *Journal of Bacteriology*, 187(7), pp. 2348–2356. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2348-2356.2005>.
- Tseng, S.-P. *et al.* (2015a) 'Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteremia', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(4), pp. 397–405. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.11.006>.

- Tseng, S.-P. *et al.* (2015b) 'Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteremia', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(4), pp. 397–405. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.11.006>.
- Ulrich, M. *et al.* (2007) 'The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions', *Molecular Microbiology*, 65(5), pp. 1276–1287. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05863.x>.
- Vale, B.C.M. (2019) 'Decreased susceptibility to chlorhexidine and distribution of *qacA/B* genes among coagulase-negative *Staphylococcus* clinical samples', p. 5.
- Vali, L. *et al.* (2008) 'Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), pp. 524–532. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm520>.
- Valle, J., Echeverz, M. and Lasa, I. (2019) '□B Inhibits Poly-N-Acetylglucosamine Exopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*', *Journal of Bacteriology*, 201(11).
- Van Der Mee-Marquet, N. *et al.* (2003) '*Staphylococcus lugdunensis* Infections: High Frequency of Inguinal Area Carriage', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), pp. 1404–1409. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1404-1409.2003>.
- Vandana and Das, S. (2022) 'Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria', *Carbohydrate Polymers*, 291, p. 119536. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119536>.
- Vandenesch, F. *et al.* (1993) 'Endocarditis Due to *Staphylococcus lugdunensis*: Report of 11 Cases and Review', *Clinical Infectious Diseases*, 17(5), pp. 871–876. Available at: <https://doi.org/10.1093/clinids/17.5.871>.
- Vollmer, W. *et al.* (2008) 'Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases', *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 259–286. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>.
- Wang, Y. *et al.* (2018) '*Staphylococcus epidermidis* small basic protein (Sbp) forms amyloid fibrils, consistent with its function as a scaffolding protein in biofilms', *Journal of Biological Chemistry*, 293(37), pp. 14296–14311. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002448>.
- Warne, B. *et al.* (2016) 'The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity', *BMC Genomics*, 17(1), p. 222. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2426-7>.
- Wassenaar, T. *et al.* (2015) 'Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species', *European Journal of Microbiology and Immunology*, 5(1), pp. 44–61. Available at: <https://doi.org/10.1556/EuJMI-D-14-00038>.
- Weidenmaier, C. *et al.* (2005) 'DltABCD- and MprF-Mediated Cell Envelope Modifications of *Staphylococcus aureus* Confer Resistance to Platelet Microbicidal Proteins and Contribute to Virulence in a Rabbit Endocarditis Model', *Infection and Immunity*, 73(12), pp. 8033–8038. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8033-8038.2005>.
- Williamson, D.A., Carter, G.P. and Howden, B.P. (2017) 'Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns', *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), pp. 827–860. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-16>.

- Wittekind, M.A. *et al.* (2022) 'The novel protein SCRA acts through the SAERS two-component system to regulate virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*', *Molecular Microbiology*, 117(5), pp. 1196–1212. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14901>.
- Xu, L. *et al.* (2006) 'Role of the *luxS* Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*', *Infection and Immunity*, 74(1), pp. 488–496. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.488-496.2006>.
- Yeh, C.-F. *et al.* (2015) 'Molecular Characteristics of Disease-Causing and Commensal *Staphylococcus lugdunensis* Isolates from 2003 to 2013 at a Tertiary Hospital in Taiwan', *PLOS ONE*. Edited by J. Melo-Cristino, 10(8), p. e0134859. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134859>.
- Yeh, C.-F. *et al.* (2016) 'Clinical Features, Outcomes, and Molecular Characteristics of Community- and Health Care-Associated *Staphylococcus lugdunensis* Infections', *Journal of Clinical Microbiology*. Edited by R. Patel, 54(8), pp. 2051–2057. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00847-16>.
- Yen, T.-Y. *et al.* (2016) 'Emergence of oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying staphylococcal cassette chromosome mec type V in central Taiwan', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(6), pp. 885–891. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.11.018>.
- Yu, D. *et al.* (2012) 'Staphylococcus aureus autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an *icaR*-dependent manner', *BMC Microbiology*, 12(1), p. 288. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-288>.
- Yu, S. *et al.* (2020) 'Investigation of biofilm production and its association with genetic and phenotypic characteristics of OM (osteomyelitis) and non-OM orthopedic *Staphylococcus aureus*', *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), p. 10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00352-4>.
- Zaaroura, H. *et al.* (2018) 'Clinical and microbiological properties of *Staphylococcus lugdunensis* skin infections', *The Journal of Dermatology*, 45(8), pp. 994–999. Available at: <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14496>.
- Zapotoczna, M. *et al.* (2012) 'Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis*', *Journal of Bacteriology*, 194(23), pp. 6453–6467. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01195-12>.
- Zhang, R. *et al.* (2021) 'Spatial regulation of protein A in *Staphylococcus aureus*', *Molecular Microbiology*, 116(2), pp. 589–605. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14734>.
- Zhao, A., Sun, J. and Liu, Y. (2023) 'Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, p. 1137947. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>.
- Zheng, Y. *et al.* (2018) 'Do amyloid structures formed by *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulins have a biological function?', *International Journal of Medical Microbiology*, 308(6), pp. 675–682. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.08.010>.
- Zhu, T. *et al.* (2010) 'Impact of the *Staphylococcus epidermidis* LytSR two-component regulatory system on murein hydrolase activity, pyruvate utilization and global transcriptional profile', *BMC Microbiology*, 10(1), p. 287. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-287>.
- Zimmerli, W. and Sendi, P. (2019) 'Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections *In Vitro*, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), pp. e01746-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01746-18>.

Zinkernagel, A.S. *et al.* (2008) 'Significance of *Staphylococcus lugdunensis* Bacteremia: Report of 28 Cases and Review of the Literature', *Infection*, 36(4), pp. 314–321. Available at: <https://doi.org/10.1007/s15010-008-7287-9>.

Zipperer, A. *et al.* (2016) 'Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization', *Nature*, 535(7613), pp. 511–516. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature18634>.



## Caractérisation phénotypique et moléculaire de différents complexes clonaux de *Staphylococcus lugdunensis*

Nos travaux ont dans un premier temps cherché à expliquer la prédominance mondiale des souches de complexes clonaux 1 et 3 (CC1 et CC3) de *Staphylococcus lugdunensis* en milieu hospitalier par une éventuelle résistance aux antiseptiques. Nous avons étudié la sensibilité de 49 souches représentatives des sept CCs décrits à ce jour au digluconate de chlorhexidine (CHX) et au chlorure de benzalkonium (BAC), fréquemment utilisés en milieu hospitalier, par (i) détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) en microdilution et (ii) recherche des gènes de résistance *qac* et *norA* codant des pompes d'efflux. *S. lugdunensis* s'est révélé être très sensible à ces deux antiseptiques. Cependant, notre étude a identifié deux souches de CC3 de sensibilité diminuée au CHX et au BAC et comportant le gène *qacA*, dont une résistante à la méticilline.

D'autre part, nous avons exploré la capacité de notre collection de 49 souches de *S. lugdunensis* à former du biofilm, facteur de virulence majeur pouvant également contribuer à favoriser l'implantation de *S. lugdunensis* en milieu hospitalier. Nous avons mis en évidence que la formation de biofilm en milieu riche et en milieu carencé en fer dépendait de la lignée phylogénétique. La caractérisation de la matrice du biofilm de deux souches (de CC3 et CC6) par des tests d'inhibition et en microscopie confocale (CLSM) a révélé une composition souche- et milieu-dépendante. L'analyse du protéome de la matrice de ces deux souches par spectrométrie de masse a permis d'identifier 322 protéines. Ces protéines étaient majoritairement intracellulaires, et notamment impliquées dans le métabolisme glucidique.

**Mots clés :** *Staphylococcus lugdunensis*, complexe clonal, chlorhexidine, benzalkonium, résistance, CMI/CMB, *qac*, *norA*, biofilm, matrice extracellulaire, CLSM, protéines, spectrométrie de masse

## Phenotypic and molecular characterization of different clonal complexes of *Staphylococcus lugdunensis*

Our work initially focused to explain the worldwide predominance of *Staphylococcus lugdunensis* belonging to the clonal complex 1 and 3 (CC1 and CC3) strains in the healthcare setting by a possible resistance to antiseptics. We studied the susceptibility of 49 strains representative of the seven CCs described to date, to chlorhexidine digluconate (CHX) and benzalkonium chloride (BAC), frequently used in hospitals, by (i) determining MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) in microdilution and (ii) searching for the resistance genes *qac* and *norA* encoding efflux pumps. *S. lugdunensis* was found to be highly sensitive to both antiseptics. However, our study identified two CC3 strains with reduced susceptibility to CHX and BAC and carrying the *qacA* gene, one of which was resistant to meticillin.

We also explored the ability of our collection of 49 *S. lugdunensis* strains to form biofilm, a major virulence factor that may also contribute to the spread of *S. lugdunensis* in healthcare settings. We demonstrated that biofilm formation in rich and iron-restricted conditions depended on phylogenetic lineage. Characterization of the biofilm matrix of two strains (from CC3 and CC6) by inhibition assays and confocal microscopy (CLSM) revealed a strain- and medium-dependent composition. Analysis of the matrix proteome of these two strains by mass spectrometry identified 322 proteins. These proteins were predominantly intracellular, and particularly involved in carbohydrate metabolism.

**Keywords :** *Staphylococcus lugdunensis*, clonal complex, chlorhexidine, benzalkonium, resistance, MIC/MBC, *qac*, *norA*, biofilm, extracellular matrix, CLSM, proteins, mass spectrometry