

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'université Claude Bernard Lyon 1

Ecole doctorale Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

**PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Soutenue publiquement le 12 Décembre 2014

par

Sophie TROUILLET-ASSANT

DIRECTEUR DE THESE : Docteur Frédéric LAURENT

CO-DIRECTEUR DE THESE : Professeur Tristan FERRY

JURY :
Professeur François VANDENESCH, président du Jury
Professeur Jean-Philippe LAVIGNE, rapporteur
Docteur Jocelyne CAILLON, rapporteur
Professeur Michel DUPON
Professeur Pierre JURDIC
Professeur Tristan FERRY
Docteur Frédéric LAURENT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUICHE

Département Mathématiques

Département Mécanique	Directeur : M. Georges TOMANOV
Département Physique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. P. FOURNIER
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. G. PIGNAULT
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. C. VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur François VANDENESCH :

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant la présidence de cette thèse. Je suis très honorée de bénéficier de votre accompagnement depuis mon arrivée au sein de votre équipe. Soyez assuré de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Philippe LAVIGNE, A Madame le Docteur Jocelyne CAILLON, A Monsieur le Professeur Michel DUPON :

Je vous exprime mes plus vifs remerciements pour avoir pris le temps de lire ce travail. Vos expériences respectives dans le domaine des infections ostéo-articulaires valorisent grandement le jugement de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Pierre JURDIC :

C'est un grand honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury de cette thèse. Je ne vous remercierai jamais assez de la chance que vous m'avez offert en m'accordant la transmission d'une partie de votre savoir sur les ostéoclastes. Ce fut un immense plaisir pour moi de travailler à vos côtés pendant ces quelques mois si enrichissant. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Tristan FERRY, Co-directeur de thèse :

Je te remercie pour ton soutien et ton aide pendant la réalisation de cette thèse. Ton point de vue clinique m'a aidée à voir autre chose que ma pipette et à développer mon sens critique. Sois assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Frédéric LAURENT, Directeur de thèse

Comment pourrais-je te remercier ? Sans doute ne le pourrai-je jamais assez... Voilà presque 6 ans que tu m'as recrutée en tant que technicienne, et me voilà maintenant future thésée (enfin j'espère ... ☺). Quel chemin parcouru... Merci de m'avoir encouragée pendant toutes ces années. Avec quelques désaccords des fois qui ont fait trembler quelques murs, mais avec surtout beaucoup de fous rires... Grace à toi et à tes centaines de corrections d'articles ou de manuscrit, je sais maintenant lire le chinois !! Grace à toi, je suis capable de faire des choses que je n'aurai jamais pensé être capable de faire comme être mon propre étalon pour mesurer une pièce et bien d'autre encore. Enfin merci pour tout !!

Ce travail n'aurait bien sûr pas pu être celui-là sans l'aide de toutes les personnes qui m'ont aidée ces dernières années. Merci **JP**, un binôme formé déjà depuis 4 ans, que d'aventures, et merci encore pour tes conseils de statisticien averti ! Je n'oublie pas les tous premiers, merci **Yannick, Pierre et Marion**... Merci aux actuels (ou presque) :

Sacha, quelle chance j'ai eu de t'avoir à mes côtés pendant 2 ans ½ . Reviens !!! Bonne chance pour la suite...

Patricia avec ses staphylococcOUS, merci pour ton soutien dans mes moments moins gais

Jason avec son cristal violet et ses vachettes « encadre un stagiaire bon zou »

Marine avec ses capitis du monde entier

Céline, j'ai hâte de te voir faire du WB !!!

Lucie et nos sacrés moments de rigolade (ou pas) à faire des qRT ou de l'étalage de rate, un grand merci !

Sans vous, ça n'aurait pas été aussi drôle de venir au travail chaque matin !

Florent, ta petite caillette te remercie sincèrement de tous ces bons moments ! Ikéa fera partie des anales, nos « soirées bières » rafraichies par la carbo, la nuit de l'horreur ou du biofilm,... et j'en passe ! Merci mon collègue, que dis-je : mon ami !

Un grand merci au **service de bactériologie de l'hôpital de la Croix Rousse**, et particulièrement à Monsieur **le Professeur Sylvestre Tigaud** qui a su me trouver une petite place dans son laboratoire, aux techniciennes : **Monique, Annick, Béa, Btissam, Isabelle (s)**, et j'en oublie ! Sans votre aide, rien de tout ça n'aurait été possible...

Un grand merci à **l'équipe de l'Est et du Sud** et particulièrement à **Hélène, Anne, Olivier, Michèle** (et vos tableaux excel), Gérard, Mona et aux techniciennes du **Centre de Référence des Staphylocoques (Caro et Christine (s))**.

Un grand merci aux membres du **Centre International de Recherche en Infectiologie**, en particulier **Thomas Henry, Jacqueline Marvel, Thierry Walzer, et Peggy Parroche** qui ont contribué de près ou de loin à ce travail ou à d'autres toujours en cours...

Un grand merci à Laennec, en particulier à **Claire, Sabine, Cédric, Christophe, Jessica Florence et Karen**.

Merci à l'IGFL en particulier à **Dane, Nathalie, Jean, Irma, Chantal et Marlène...**

A mes amis.... Vous avez tous par votre soutien sans faille, participé à l'aboutissement de ce travail... (surtout en me changeant les idées, « des fois » autour d'un verre)

Vaness, Bouly, Isa, Mironn, Galou (aqua tonique, y'a que ça de vrai), **Lise** (reviens !!), mon **Micky, Alex et Arnaud, Romain** mon rouquin préféré (tu me diras j'en connais qu'un !), et tous les autres !!!

A ma famille, pour votre indispensable soutien et votre affection : Tout d'abord merci à **mes parents**, à **mon frere et ma sœur**, à mes chers grands-parents (**Renée, Robert et Nenette**), à mon **grand père Eugène**, à mes beaux-parents, à mes cousins **Baptiste, Julie, Toinou, Sylvain** (c'est sans doute un peu grace à toi -> Amboise), **Didi, Vero, Carm** (j'ai plus de tympan !), **Cynthia, Loren**. A mes oncles et tantes , **Dédée et Tonton, Christine, Manu, Lisa, et tous les autres !**

A mon mari Jérôme , et sans doute mon meilleur ami... Merci pour tout ton amour et ton soutien ! ca n'aurait jamais été possible sans toi...

A **Hugo**, qui m'a accompagnée au chaud pendant neuf mois et que j'ai l'immense plaisir de tenir dans mes bras aujourd'hui. Tu fais de moi la plus heureuse des mamans !

RESUME

Les infections ostéo-articulaires (IOA), principalement causées par les staphylocoques, sont des infections graves, responsables d'un taux élevé de mortalité et de morbidité suite à l'inflammation et l'importante destruction osseuse. Nous avons étudié si les interactions hôtes-pathogènes pouvaient influencer sur la présentation clinique (aiguë, chronique, ...) des IOA. Nous avons d'abord développé un modèle *in vitro* d'infection intracellulaire d'ostéoblastes humains permettant de quantifier l'adhésion, l'invasion, la survie intracellulaire des staphylocoques et les dommages subis par les cellules infectées. Grâce à ce modèle, nous avons ensuite montré que les souches de *S. aureus* (SA) communautaires résistants à la méticilline (CA-MRSA), un groupe polyphylétique de souches hypervirulentes associées à des formes aiguës et sévères d'IOA, induisent une cytotoxicité supérieure à celle des MRSA hospitaliers (HA-MRSA) associés à des IOA plus souvent chroniques. Ces résultats nous ont amenés à décrire un nouveau mécanisme de virulence des CA-MRSA basé sur l'invasion des ostéoblastes et l'activité intracellulaire d'une toxine staphylococcique, les phénol-soluble modulins (PSM). Par la suite, en utilisant une large collection de souches cliniques de SA sensibles à la méticilline (MSSA) de fond génétique très divers, et en utilisant comme seul critère de corrélation la durée d'évolution réellement observée chez les patients, nous avons obtenus les premiers résultats validant l'hypothèse du rôle de l'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes dans la chronicité des IOA. Ces travaux nous ont également permis de démontrer la corrélation entre la dysfonction d'un des principaux systèmes de régulation de la virulence chez SA, le système *agr*, et le caractère chronique des IOA. La fonctionnalité du système *agr*, qui se traduit par la sécrétion de la delta-hémolysine, est facilement détectable par spectrométrie de masse par la nouvelle technologie MALDI-TOF-MS, utilisée en laboratoire de routine pour l'identification bactérienne. Ainsi, nos résultats suggèrent que cette technique pourrait représenter la première méthode objective d'évaluation du degré de chronicité d'une IOA au moment du diagnostic, permettant ainsi d'améliorer la prise en charge initiale des patients. En parallèle, nous avons démontré que l'interaction entre SA et les ostéoclastes, seules cellules capables de résorber la matrice osseuse, était responsable de la destruction osseuse observée chez les patients atteints d'IOA par deux mécanismes complémentaires : i) SA inhibe l'ostéoclastogénèse des précurseurs myéloïdes qui se différencient alors en macrophages. Ces macrophages sécrètent une multitude de signaux pro-inflammatoires facilitant ainsi le recrutement d'ostéoclastes matures sur le site de l'infection et l'ostéoclastogénèse des précurseurs non infectés ; ii) l'infection des ostéoclastes matures par SA triplent leur capacité de résorption. Ainsi nous avons démontré que les ostéoclastes jouaient un rôle central dans la destruction osseuse observée lors des IOA.

Nos travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension et l'amélioration de la prise en charge des IOA à SA.

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Cette thèse a été préparée au sein du laboratoire INSERM U1111 - Centre International de Recherche en Infectiologie, équipe Pathogénèse des infections à staphylocoques

Adresse postale du laboratoire :

CIRI – INSERMU1111
Faculté de Médecine Lyon-Est
7, rue Guillaume Paradin
69372 LYON CEDEX 8 - France

Table des matières

ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION	15
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
I. Les infections ostéo-articulaires	21
A. Les infections osseuses.....	21
B. L'arthrite septique	24
C. Epidémiologie bactérienne des IOA.....	25
II. Le tissu osseux.....	26
A. Les cellules osseuses.....	27
B. Le remodelage osseux	31
C. Infection, inflammation et remodelage osseux.....	34
III. Relations hôte-pathogène au cours d'une IOA à <i>S. aureus</i>	41
A. <i>S. aureus</i> , un pathogène intracellulaire ?.....	41
B. Destin de la bactérie et de la cellule hôte après internalisation de <i>S. aureus</i> dans une cellule eucaryote.....	46
C. Le phénotype Small Colony Variant.....	52
D. Le biofilm	56
E. Contrôle de l'expression des facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> lors d'une interaction hôte-pathogène	59
TRAVAIL PERSONNEL.....	65
INTRODUCTION	67
PREMIERE PUBLICATION : A novel flow cytometry-based assay for the quantification of <i>Staphylococcus aureus</i>	69
DEUXIEME PUBLICATION : <i>Staphylococcus epidermidis</i> in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation	76
TROISIEME PUBLICATION : PSMs of Hypervirulent <i>Staphylococcus aureus</i> Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts	89
QUATRIEME PUBLICATION : Delta-toxin production deficiency in <i>Staphylococcus aureus</i> : a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation.....	103
CINQUIEME PUBLICATION : Dual impact of live <i>Staphylococcus aureus</i> on osteoclast lineage, leading to increased bone resorption.....	136

DISCUSSION – PERSPECTIVES	154
ANNEXE I: Antimicrobial activity against intra-osteoblastic <i>Staphylococcus aureus</i> : a new therapeutic concept for bone and joint infection?.....	164
Annexe II : Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> clonal complex 398: high prevalence and geographical heterogeneity in bone and joint infection and nasal carriage.	190
Annexe III : The levels of antibodies to Panton-Valentine leukocidin (PVL) vary with PVL prevalence along a North-South gradient.....	195
Références bibliographiques.....	217

ABREVIATIONS

AAP	Accumulation-associated protein
ADAM	a disintegrin and metalloprotease domain
<i>agr</i>	Accessory gene regulator
BAP	Biofilm-associated protein
BBP	Bone sialoprotein-binding protein
BFI	Biofilm forming index
BGN	Bacille Gram négatif
CA-MRSA	Communaute-acquired-MRSA
CHU	Centre hospitalo-universitaire
Clf	Clumping factor
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNR	Centre national de référence
CRIOAC	Centre inter-régional de référence pour la prise en charge des IOA complexes
CRP	Protéine C réactive
CSF	Colony stimulating factor
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DO	Densité optique
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAK	Focal adhesion kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FnBP	Fibronectin-binding protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPA	Gentamicin protection assay
HA-MRSA	Hospitalized-Acquired-MRSA
Hla	hémolysine alpha
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
ica	Intercellular adhesion
IFN	Interféron
IGF	Insulin growth factor
Il	Interleukine
IOA	Infection ostéo-articulaire
IPA	Infection de prothèse articulaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LDH	Lactate déshydrogénase
MCC	Milieu de culture complet

MMP	matrix metalloproteinase
MOI	Multiplicity of infection
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
NFκB	Nuclear factor kappa B
OPG	Ostéoprotégérine
PBS	Phosphate-buffered saline
PFT	Pore-forming toxin
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
Pmt	phenol modulín transporter
PNAG	Poly-N-acétyl-glucosamine
PSM	Phenol-soluble modulín
PVL	Leucocidine de Panton-Valentine
RANK	Receptor activator for nuclear factor κB
RANKL	Receptor activator for nuclear factor κB ligand
ROS	Reactive oxygen species, dérivés réactifs de l'oxygène
saeRS	<i>S. aureus</i> exoprotein expression
sarA	Staphylococcal accessory regulator A
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
SCV	Small colony variants
Sdr	serine aspartate repeat
SVF	Sérum de veau foetal
TAK	Transforming growth factor β-activated kinase
TGF β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRAF	TNF receptor-associated factors
TRAIL	Tumour necrosis factor apoptosis inducing ligand
TSA	Gélose tryptophane-soja

INTRODUCTION

Les infections ostéo-articulaires (IOA) regroupent un ensemble d'entités cliniques ayant en commun l'invasion et la destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par des micro-organismes, le plus souvent des bactéries. Atteignant plus de 50 patients pour 100 000 habitants par an en France, ce sont des pathologies sévères associées à une mortalité (5%) et une morbidité importante responsable de séquelles fonctionnelles (40% des patients) avec un coût individuel (hospitalisation prolongée, qualité de vie altérée) et sociétal (arrêt de travail, invalidité partielle ou totale, temporaire ou définitive) extrêmement élevé. De plus, ces infections nécessitent une prise en charge médico-chirurgicale longue et coûteuse (50 000 à 150 000 € par épisode) [1]. Les infections sur matériel orthopédique, notamment celles sur prothèses articulaires (IPA), représentent un tiers des IOA. Leur incidence augmente régulièrement depuis trente ans en raison de l'accroissement du nombre de pose de prothèses (+173% prévu d'ici 2030), accroissement inéluctable avec le vieillissement de la population, et l'évolution des modes de vie actuels (obésité, sports extrêmes, etc.) [2]. Les IOA représentent donc un enjeu majeur de santé publique qui a motivé la création en 2008 de 9 centres inter-régionaux de référence pour la prise en charge des IOA complexes (CRIOAc), incluant le CRIOAc de la Région Rhône Alpes Auvergne coordonné par les Hospices Civils de Lyon (HCL).

Le genre *Staphylococcus*, impliqué dans plus de 50% des IOA, représente ainsi la première étiologie. Il comprend *S. aureus*, considéré comme le principal agent pathogène, et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), dont le principal représentant est *S. epidermidis*. Longtemps considéré comme un simple commensal de la peau et des muqueuses, *S. epidermidis* est désormais reconnu comme un pathogène opportuniste majeur, notamment responsable d'infections nosocomiales et/ou sur matériel étranger [3]. Moins étudié que *S. aureus*, ces SCN, et en particulier *S. epidermidis*, sont pourtant responsables de 30 à 43% des IOA sur matériel orthopédique, devançant même *S. aureus* en termes de fréquence dans certaines séries [4, 5].

Les IOA font partie des maladies infectieuses les plus difficiles à prendre en charge, particulièrement lorsqu'elles évoluent sur un mode chronique ou récidivant et impliquent un matériel implanté. Les IOA staphylococciques sont particulièrement sujettes au passage à la chronicité du fait du remarquable pouvoir d'adaptation qu'ont pu développer ces pathogènes.

Dans ce contexte, il est prévisible que les IOA staphylococciques resteront un problème majeur en infectiologie, et une meilleure compréhension des interactions entre ces pathogènes et le tissu osseux est cruciale pour l'optimisation voire le développement de stratégies diagnostiques et thérapeutiques nouvelles.

Au cours d'une introduction bibliographique, nous exposerons la physiopathologie générale des IOA à *S. aureus*, nous mettrons l'accent sur la physiologie complexe du tissu osseux, puis nous décrirons spécifiquement les trois mécanismes de virulence phénotypiques,

permettant l'adaptation bactérienne à l'environnement particulier que représente par le tissu osseux. Ces mécanismes sont représentés par : i) la formation de biofilm permettant d'implanter, de promouvoir, de structurer et de réguler la survie bactérienne dans un environnement hostile [6] ; ii) l'internalisation et la persistance des staphylocoques au sein des cellules osseuses non phagocytaires, et notamment des ostéoblastes, pouvant constituer un sanctuaire bactérien intracellulaire à l'origine de rechutes [7] ; et iii) l'évolution vers le morphotype de small colony variant (SCV), caractérisé par un métabolisme ralenti et une sensibilité moindre à certains antibiotiques [8].

Nous présenterons ensuite les résultats de nos travaux personnels qui ont portés sur la mise au point d'une technique de quantification des bactéries extra- et intracellulaires par cytométrie en flux, puis sur l'étude des interactions hôtes-pathogènes impliquant *S. aureus* / *S. epidermidis* et ostéoblastes / ostéoclastes.

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les infections ostéo-articulaires

Les IOA regroupent d'une part les infections du tissu osseux proprement dit, et les arthrites septiques qui présentent certaines particularités physiopathologiques. Au cours de ce travail, nous nous focaliserons sur la physiopathologie des infections osseuses.

A. Les infections osseuses

Dans le vocabulaire français, l'ostéomyélite désigne classiquement une infection osseuse d'origine hémotogène sans corps étranger, les autres situations sont qualifiées d'ostéite. Cette terminologie peut être source de confusion car le terme 'osteomyelitis' dans la littérature anglo-saxonne désigne l'ensemble des infections osseuses. Dans la suite de cette thèse, le terme 'ostéomyélite' sera entendu dans son acception francophone.

Les infections osseuses sont caractérisées par une inflammation osseuse associée à une zone plus ou moins importante de destruction osseuse causée par un micro-organisme. Plusieurs classifications des infections osseuses existent : i) le système de Cierny-Mader basé sur le type d'atteinte osseuse (médullaire, superficielle, localisée, ou diffuse) et l'état de santé du patient (immunodépression, âge,...) (Figure 1), ii) le classement aiguë/chronique des infections basé selon la durée des symptômes et iii) le système de Waldvogel, le plus utilisé, créé en 1970 qui distingue les infections osseuses selon la source de l'infection (hémotogènes et celles par contiguïté) [9, 10].

1. Les infections osseuses hémotogènes

L'ostéomyélite est déclenchée par l'inoculation du tissu osseux par une bactérie issue de la circulation sanguine [11]. Dans l'ostéomyélite primaire, cette bactériémie initiale est asymptomatique et l'infection osseuse est au premier plan des signes infectieux. Bien qu'elle soit présente chez l'adulte, cette forme clinique prédomine largement chez l'enfant [12]. Cinquante pour cent des cas d'ostéomyélites surviennent avant l'âge de 5 ans, elles entraînent des séquelles fonctionnelles dramatiques en perturbant la croissance des os atteints [13]. Les sites anatomiques les plus communément touchés sont les corps vertébraux (spondylodiscite) chez l'adulte et les os longs au niveau des zones métaphysaires chez l'enfant (Figure 2)[14]. Cette implication fréquente de la métaphyse est expliquée par l'anatomie particulière du tissu osseux dans cette zone. Le flux sanguin est à cet endroit ralenti et turbulent, ce qui favorise l'adhésion et la colonisation de l'endothélium par les bactéries circulantes. Un antécédent récent de traumatisme, même mineur, favorise également l'infection chez l'enfant en lien avec un hématome local, une obstruction

vasculaire et/ou une micro-zone nécrotique très sensible à l'inoculation bactérienne [15]. L'inflammation locale déclenchée par l'infection provoque alors un afflux de leucocytes et une chute du pH et de l'oxygénation, autant de phénomènes qui compromettent à leur tour la circulation médullaire et favorise l'extension de l'infection. Chez le nourrisson, la présence de vaisseaux sanguins dans la plaque de croissance épiphysaire peut également permettre l'extension de l'infection à l'articulation depuis un point de départ métaphysaire. Cependant, après 1 an de vie cette plaque est dévascularisée et l'infection reste confinée à la métaphyse.

Stades anatomiques	
	<p>Stade 1 : ostéomyélite intramédullaire, nécrose limitée à la médullaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : hématogène <p><i>Traitement : antibiotique, drainage chirurgical</i></p>
	<p>Stade 2 : ostéomyélite superficielle, nécrose à la surface exposée</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : infection de contiguïté <p><i>Traitement : antibiotique, débridement superficiel, couverture</i></p>
	<p>Stade 3 : ostéomyélite localisée (séquestre cortical), nécrose bien individualisable, atteinte localisée de la corticale, instabilité osseuse avant ou après débridement</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : traumatisme, évolution de stade 1 ou 2, iatrogène (vis, plaque) <p><i>Traitement : antibiotique, débridement, séquestrectomie, immobilisation ± greffe osseuse</i></p>
	<p>Stade 4 : ostéomyélite diffuse, atteinte circonférentielle de la corticale, instabilité osseuse avant ou après débridement</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étiologie : traumatisme, évolution de stade 1-2 ou 3, iatrogène (clou) <p><i>Traitement : antibiotique, débridement, séquestrectomie ± greffe osseuse, stabilisation (ORIF, fixateur externe [Ilizarov], amputation)</i></p>
État physiopathologique	
<p>A : Absence d'anomalie</p> <p>B : Anomalies</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Bs : généralisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - dénutrition - insuffisance hépatique et/ou rénale - diabète - hypoxémie chronique - maladie auto-immune - néoplasie - immunodéprimé ou immunosuppresseurs - extrémité des âges de la vie - tabagisme </div> <div style="width: 45%;"> <p>B1 : localisées</p> <ul style="list-style-type: none"> - lymphœdème chronique - insuffisance veineuse - fibrose postradique - escarre - neuropathie </div> </div> <p>C : État général précaire</p>	

Figure 1: Classification des ostéomyélites selon Cierny-Mader [9].

Chez l'enfant l'incidence des ostéomyélites hématogènes est classiquement de 0,2-1.6/1000 enfant par an [12]. Chez l'adulte, elles représentent environ 20% des infections osseuses.

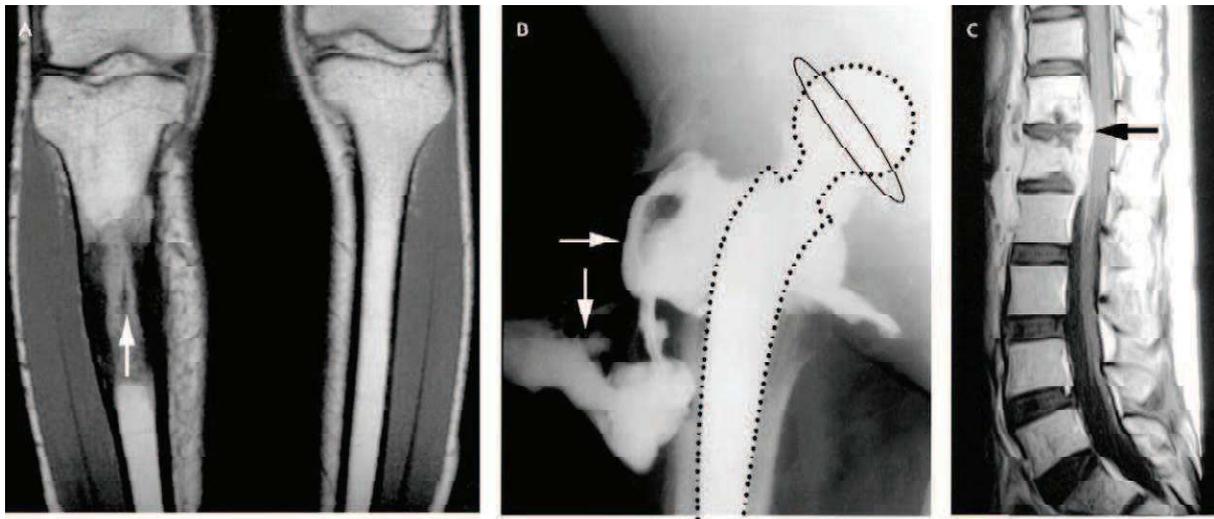


Figure 2 : Images d'infections osseuses. D'après [10].

A- Coupe coronaire d'une IRM des deux jambes – après injection intraveineuse de gadolinium montrant un épaissement de la zone corticale, un oedème dans la moelle osseuse et un séquestre osseux (flèche) du tibia droit.

B- Arthrographie d'une infection osseuse sur matériel (prothèse totale de hanche) montrant un large abcès périprothétique (flèches). C- Coupe sagittale d'une IRM après injection intraveineuse de gadolinium montrant un abcès épidual lors d'une spondylodiscite.

2. Les infections osseuses par contiguïté

Les infections osseuses par contiguïté sont plus fréquentes que les ostéomyélites, et cette tendance s'est accentuée depuis les années 1980 [16]. Leur point de départ peut être une infection des parties molles adjacentes (notamment chez le patient diabétique ou à la suite d'une escarre de décubitus), ou l'inoculation directe de bactéries au site de l'infection consécutive à un traumatisme (fracture ouverte par exemple) ou lors d'un abord chirurgical avec rupture d'aseptie. La physiopathologie des IOA par contiguïté présente certains points communs avec les ostéomyélites. En particulier, la présence d'un traumatisme interfère avec la vascularisation tissulaire locale et crée des plages nécrotiques qui favorisent la colonisation bactérienne. Chez le patient diabétique, l'infection osseuse est souvent d'origine multifactorielle. Conséquences métaboliques directes du diabète, la vasculopathie et la neuropathie favorisent la dissémination de l'infection des parties molles du pied au tissu osseux.

L'incidence des infections osseuses par contiguïté, contrairement à celle des ostéomyélites, est en augmentation [17, 18]. Ces infections, qu'elles émergent de l'infection de tissus adjacents à l'os ou d'une inoculation directe, peuvent toucher des patients de tous âges, en

particulier les porteurs de prothèses articulaires [10]. La présence d'une prothèse est particulièrement associée à l'évolution chronique de l'infection osseuse.

3. Les infections chroniques

La chronicisation des IOA est l'un des problèmes majeurs rencontrés par les cliniciens complexifiant la prise en charge du patient. Plusieurs cas d'infections récurrentes espacées de plusieurs années et des cas de récurrence des années voire des dizaines d'années après le premier épisode infectieux ont été rapportés dans la littérature [19-22]. Les éléments associés à la chronicité au moment du diagnostic sont l'existence d'une fistule, l'importance des lésions radiologiques et la présence de séquestres osseux. Ces fragments de tissus dévascularisés sont inaccessibles aux cellules immunitaires et aux antibiotiques et se comportent comme des corps étrangers inertes vis-à-vis de l'adhésion, de la colonisation bactérienne et de la formation de biofilm rendant l'éradication bactérienne difficile. Un délai (non consensuel) de 3 à 4 semaines entre le début des signes cliniques et le diagnostic microbiologique est habituellement retenu pour distinguer les IOA aiguës et chroniques [23-26]. Les patients atteints d'IOA aiguës se présentent le plus souvent avec des signes inflammatoires locaux et généraux importants, alors que ceux atteints d'IOA chroniques ne génèrent qu'un syndrome inflammatoire biologique peu important, l'absence de fièvre étant alors fréquente.

B. L'arthrite septique

L'arthrite septique est associée à la colonisation bactérienne d'une articulation. Elle se différencie des arthrites post-infectieuses ou réactionnelles au cours desquelles le germe se développe à distance de l'articulation. La multiplication du germe dans l'articulation engendre un épanchement purulent local contenant des enzymes protéolytiques libérées par les polynucléaires neutrophiles, des métalloprotéases, des toxines bactériennes et des radicaux libres pouvant conduire rapidement à la destruction du cartilage et de l'os sous-chondral. En l'absence d'un traitement antibiotique adapté, le risque d'envahissement septique local voire général est élevé. La mortalité est estimée à près de 11% et la morbidité atteint 40 à 50% [27, 28]. L'incidence de l'arthrite septique est de 2 à 10 pour 100 000 patients dans la population générale, mais peut atteindre 30 à 70 pour 100 000 chez les patients présentant des facteurs de risque comme la polyarthrite rhumatoïde ou la présence de matériel prothétique [27, 29, 30].

C. Epidémiologie bactérienne des IOA

La répartition des agents infectieux responsables des IOA varie en fonction des facteurs favorisants, de la zone géographique, et de l'âge. Cependant, *S. aureus* est de loin le pathogène le plus fréquemment mis en cause, autant dans l'arthrite septique que dans l'infection osseuse, et ce quelle que soit la voie de contamination [10, 27]. Une étude menée en 2008 par Grammatico-Guillon *et al* a permis de connaître l'épidémiologie des IOA en France en recensant, sur 14 128 IOA documentées, la présence de staphylocoques dans 66.7% des cas, devant les streptocoques (15.6%) et les bacilles Gram négatifs incluant *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* et *Escherichia coli* [31]. Parmi le genre *Staphylococcus*, *S. aureus* est identifié dans plus de la moitié des cas. *S. epidermidis* est le représentant des staphylocoques à coagulase négative le plus fréquemment identifié dans les infections osseuses notamment celles sur matériel prothétique, devant d'autres espèces de SCN aussi incriminées comme *S. simulans*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. caprae* et *S. lugdunensis* [32-35].

L'épidémiologie des infections ostéo-articulaires chez le jeune enfant est différente de l'épidémiologie rencontrée chez l'adulte. Les nouvelles techniques de biologie moléculaire ont clairement permis d'améliorer la détection de *Kingella Kingae*, germe très exigeant et difficilement cultivable [12, 36]. Actuellement, c'est le germe responsable de la majorité des IOA chez l'enfant de moins de 4 ans devant *Staphylococcus aureus*.

II. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dans lequel sont associées une phase minérale (60%) et une matrice organique (35%) composée essentiellement de collagène de type I. Ce tissu est également composé de cellules spécifiques (5%) nécessaires à son remodelage que sont les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes [37].

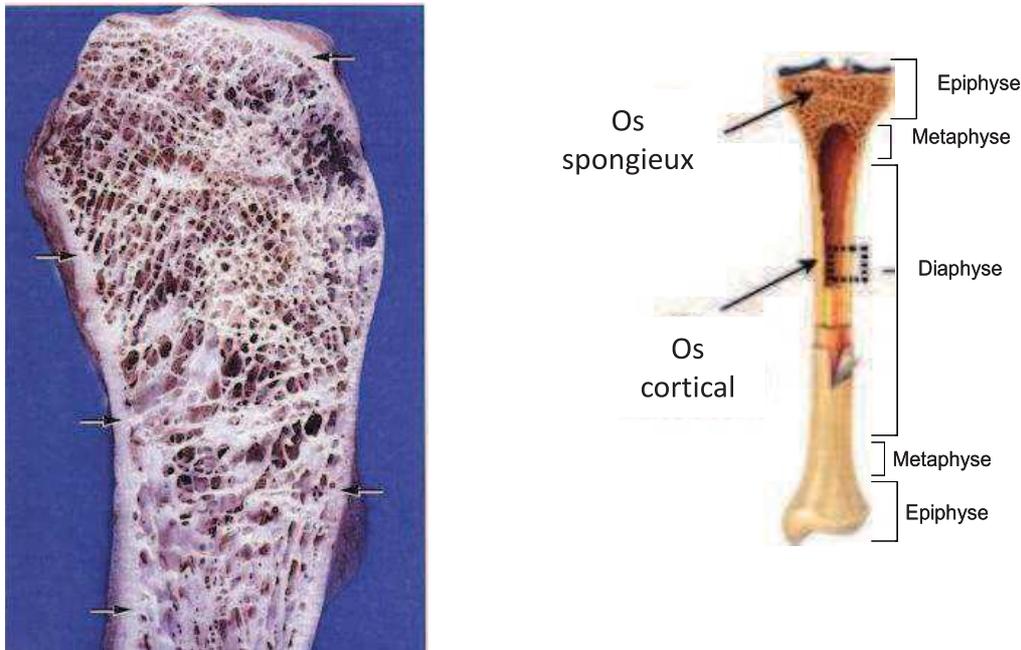


Figure 3 : Epiphyse d'un os long d'un adulte. Cette photographie montre une coupe longitudinale d'un os long adulte. L'os cortical dense et compact est indiqué par les flèches à l'intérieur duquel se trouve l'os spongieux encore appelé trabéculaire. D'après [38].

Du point de vue anatomique, l'os mature est composé de deux parties distinctes ; i) l'os cortical et l'os spongieux (Figure 3). L'os cortical représente 80% de la structure osseuse et est localisé essentiellement dans les os longs et à la périphérie des os plats [37]. Il s'agit d'une juxtaposition d'ostéons cylindriques (les ostéones) de 200 à 300 μm de diamètre alignés parallèlement. Chaque ostéon est composé de lamelles concentriques disposées autour d'un canal permettant le passage des éléments vasculo-nerveux. Les fibres de collagènes sont orientées de façon à conférer au tissu cortical une résistance mécanique optimale une fois minéralisé.

L'os spongieux, aussi appelé os trabéculaire, constitue les 20% restants de la structure osseuse. Il est situé à l'extrémité des os longs (métaphyse), dans la partie centrale des os plats et des os courts. Il est organisé selon un système de travées osseuses irrégulières que l'on nomme trabécules, ce qui lui confère une structure alvéolaire [37]. C'est à cet endroit

que l'on trouve la moelle osseuse et les vaisseaux sanguins. Son organisation tridimensionnelle lui donne un rôle important dans la résistance mécanique de l'os.

A. Les cellules osseuses

1. Les ostéoblastes

La fonction principale des ostéoblastes est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, du renouvellement de cette matrice chez l'adulte et de la réparation osseuse tout au long de la vie (Figure 4).

Ils sont localisés sur les surfaces osseuses et dérivent de précurseurs mésenchymateux. Ces précurseurs ostéoblastiques ou cellules ostéoprogénitrices proviennent de la prolifération de clones de cellules pluripotentes [39]. La différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de nombreux facteurs de transcription, d'interactions cellulaires et matricielles ainsi que de facteurs systémiques et locaux [40]. Une fois différenciés et matures, les ostéoblastes forment un tapis de cellules jointives et communiquent entre eux par des structures appelées jonction gap permettant le passage de certaines molécules. Leur noyau est situé au pôle basal et la partie apicale de leur cytoplasme fortement basophile contient de nombreux organites responsables de la synthèse et la sécrétion de protéines.

Plusieurs facteurs de croissance jouent un rôle primordial dans la formation osseuse : les « insulin-like growth factors » (IGFs), les « fibroblasts growth factors » (FGFs) et spécifiquement les membres de la famille des « transforming growth factors beta » (TGF- β). Les ostéoblastes sont eux-mêmes capables de produire un large éventail de facteurs qui peuvent potentiellement agir comme des régulateurs autocrines ou paracrines de la fonction cellulaire osseuse [40].

La matrice osseuse est synthétisée par les ostéoblastes par deux processus successifs : la synthèse de la matrice organique puis sa minéralisation. Les ostéoblastes sécrètent d'abord de nombreuses protéines matricielles (ostéocalcine, ostéopontine,...) qui vont s'intercaler entre les fibres de collagène pour former la matrice organique appelée aussi ostéoïde. Les ostéoblastes matures contrôlent ensuite la minéralisation de cette matrice par dépôt de cristaux d'hydroxyapatite. Ils sécrètent également la phosphatase alcaline osseuse, protéine capable de cliver les esters de phosphate, libérant ainsi le phosphate libre inorganique indispensable au processus de minéralisation.

Le stade ostéoblaste n'est pas une phase terminale de différenciation. En effet, une fois la déposition de la matrice terminée, trois destins sont possibles pour les ostéoblastes : i) soit il

meurt par apoptose, ii) soit l'ostéoblaste est emmuré dans la matrice minéralisée et évolue alors en ostéocyte (environ 10 à 20% des ostéoblastes), iii) soit il s'aplatit et présente une activité métabolique très réduite et se transforme en une cellule bordante. Ces cellules bordantes sont des ostéoblastes au repos, qui, en cas de besoin, sont capables de s'activer et de se re-différencier en ostéoblastes. Par opposition aux ostéoblastes, ce sont des cellules aplaties et possédant peu d'organites cellulaires.

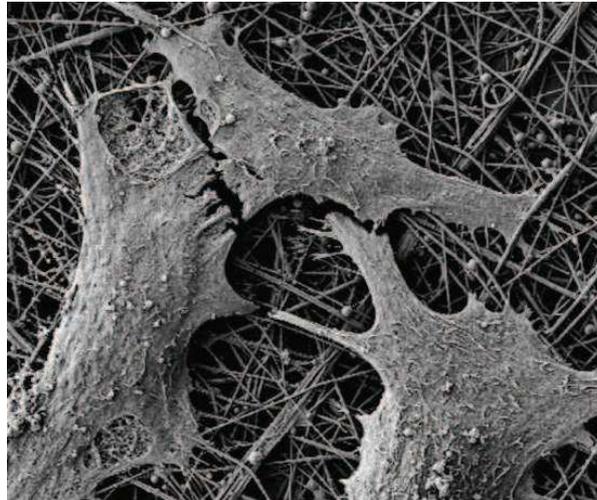


Figure 4 : Photographie d'ostéoblastes humains capturée par microscopie électronique à balayage. D'après [41].

2. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes, ayant perdu leur polarité, qui se sont entourés de matrice osseuse et enfermés dans une lacune appelée ostéoplaste. Paradoxalement, les fonctions remplies par les ostéocytes sont encore mal connues alors qu'il s'agit des cellules les plus nombreuses au sein du tissu osseux. En effet, l'absence de bons modèles *in vitro* et *in vivo*, et leur relative inaccessibilité au sein du tissu osseux compliquent l'étude de ses cellules.

Des données récentes suggèrent toutefois que ces cellules seraient sensibles aux forces de tension mécanique exercées sur l'os et seraient capables en retour de réguler l'activité des ostéoblastes. Ce sont des mécano-senseurs. Les ostéocytes sont reliés entre eux et avec les cellules de la surface osseuse par des extensions de la membrane cytoplasmique (figure 5). Les ostéocytes sont probablement les cellules qui orientent dans l'espace l'activité des ostéoblastes et ainsi adaptent l'architecture osseuse afin d'assurer une résistance maximale aux contraintes physiques. Ils sont espacés régulièrement et forment un réseau de communication. Ils sont sensibles aux stimuli mécaniques et détectent aussi le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse dans le processus d'adaptation

fonctionnelle ou en cas de micro-fractures [39]. Enfin, un modèle murin a été créé dans lequel le récepteur de la toxine diphtérique est exprimé exclusivement par les ostéocytes. Au contact de la toxine, ces souris sont ainsi déplétées en ostéocytes. Ces souris dépourvues d'ostéocytes sont ostéoporotiques soulignant ainsi le rôle essentiel de ces cellules dans la régulation des activités des ostéoblastes et des ostéoclastes. [42, 43].

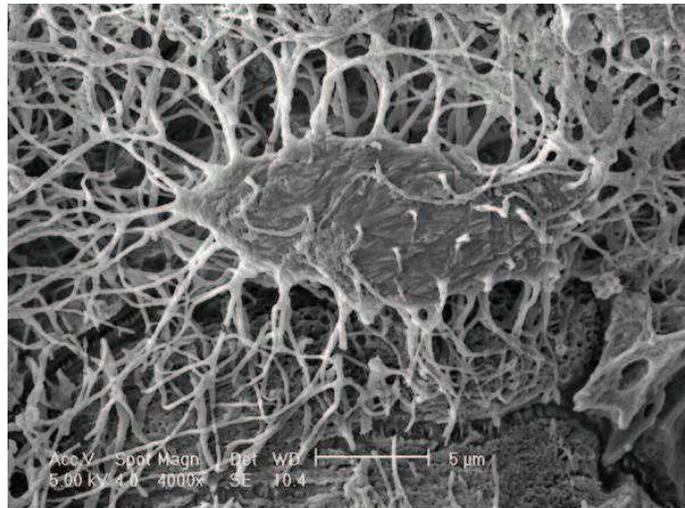


Figure 5 : Photographie d'un ostéocyte capturée par microscopie électronique à balayage dans un os long d'une souris. D'après [43].

3. Les ostéoclastes

L'action de résorption de la matrice osseuse, appelée aussi ostéoclasie, est assurée par des cellules multinucléées, les ostéoclastes. Contrairement aux ostéoblastes d'origine mésenchymateuse, les ostéoclastes dérivent de la lignée myéloïde (Figure 6). Les pro-ostéoclastes issus des cellules souches hématopoïétiques de la lignée monocyte/macrophage migrent vers la surface osseuse puis fusionnent pour donner naissance à des ostéoclastes matures. Ainsi ces derniers sont des cellules multinucléées de 50 à 100 μm de diamètre avec une morphologie caractérisée par un pôle basal présentant une membrane plissée. Cette bordure en brosse est formée par des extensions en « doigts » nécessaire à l'ostéoclasie.

La résorption du tissu osseux, constitué de protéines enchassées dans une matrice minéralisée, nécessite (i) la déminéralisation de la matrice, permettant l'accès aux constituants protéiques ; et (ii) la dégradation par protéolyse de ces constituants protéiques [44, 45]. Ces deux étapes se succèdent dans une séquence d'évènements cellulaires indispensables pour la résorption osseuse appelée cycle de résorption (Figure7). Ce cycle requière plusieurs activités cellulaires :

- i) *la migration de l'ostéoclaste vers le site de résorption et son attachement à la surface osseuse* : après la migration de l'ostéoclaste vers son site de résorption, un domaine membranaire spécifique se forme sous l'ostéoclaste, appelé « sealing zone » (zone d'attachement). La membrane plasmique s'attache à la matrice osseuse pour créer alors la zone de résorption. Plusieurs intégrines sont impliquées dans ce processus, notamment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [46].
- ii) *La polarisation de l'ostéoclaste* : Une fois la « sealing zone » formée, l'ostéoclaste forme un autre domaine membranaire appelé « ruffled border » ou bordure en brosse contenant des vésicules acides intracellulaires qui fusionnent entre elles [44, 45].
- iii) *La dissolution de l'hydroxyapatite et la dégradation de la matrice organique* : ces deux étapes se succèdent inévitablement. Premièrement, les cristaux d'hydroxyapatite sont dissous pour permettre aux enzymes protéolytiques d'atteindre la matrice organique dans un second temps. Cette dissolution d'hydroxyapatite s'opère grâce à la sécrétion ciblée, dans la lacune de résorption, d'acide chlorhydrique par les H^+ -ATPases et les canaux chloriques présents à la surface de la bordure en brosse. Après la solubilisation de cette phase minérale, plusieurs enzymes protéolytiques, notamment celles appartenant aux classes des MMP (matrix metalloproteinase) dégradent la matrice osseuse organique riche en collagène. Les taux élevés de MMP-9 et de cathepsine K, retrouvés à cette étape, suggèrent que ces deux enzymes ont un rôle important dans ce processus [47].
- iv) *La destruction des produits de dégradation présents dans la lacune de résorption* : Plusieurs travaux ont démontré que les produits de dégradation des composants de la matrice sont éliminés par les vésicules transcytotiques dans lesquelles la protéine TRAP (phosphatase acide tartrate résistante) a été mise en évidence. Cet enzyme, classiquement utilisé comme un marqueur spécifique des ostéoclastes, génère des radicaux oxygénés (ROS) capable de détruire le collagène résiduel.
- v) *Le retour à un état « non-resorbant » ou mort par apoptose*

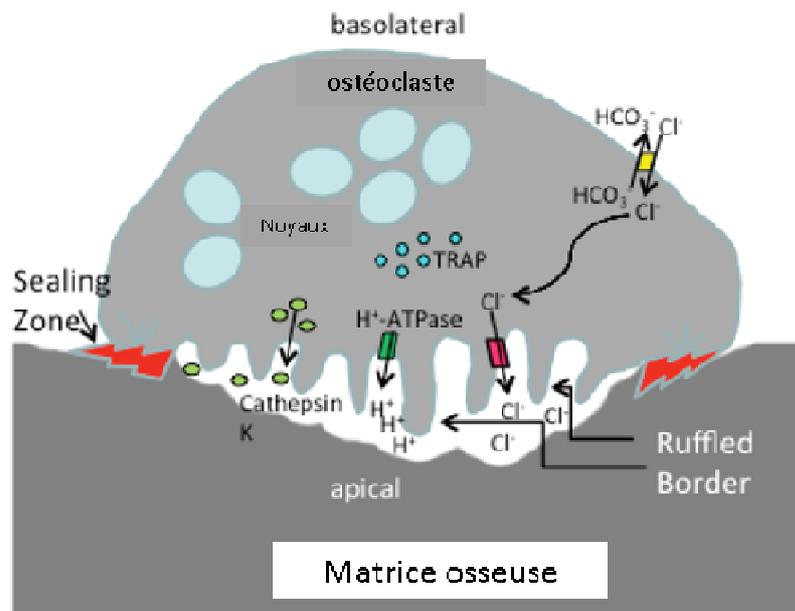


Figure 6 : Illustration d'un ostéoclaste mature résorbant la matrice osseuse. Les ostéoclastes matures sont larges et multinucléés. L'ostéoclaste se fixe à la matrice osseuse au niveau de la sealing zone (zone d'attachement). L'ostéoclaste sécrète des ions H^+ et Cl^- pour déminéraliser la matrice via la « ruffled border » (bordure en brosse). Les composants organiques sont alors dégradés par des enzymes protéolytiques. Ils expriment alors l'enzyme TRAP (phosphatase acide tartrate résistante), utilisé comme marqueur ostéoclastique qui intervient alors dans la destruction des produits de dégradation. D'après [48].

B. Le remodelage osseux

L'équilibre de l'activité de ces deux types cellulaires, ostéoblastes et ostéoclastes, est indispensable au maintien de l'homéostasie du tissu osseux et à son renouvellement. En 1990, Frost a défini ce processus comme le remodelage osseux [49]. Ce remodelage permanent de l'os trabéculaire et de l'os cortical (2-5% par an), dans lequel s'intriquent la résorption et la formation de tissu osseux, s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage. L'os est ainsi formé de millions d'unités fonctionnelles de remodelage, mobiles et progressant dans le tissu osseux.

Le cycle de remodelage est composé de trois étapes consécutives :

- i) une **étape de résorption** réalisée par les ostéoclastes matures,
- ii) une **phase de réversion ou d'inversion** correspondant au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont lisser le fond de la lacune, et

iii) une **phase de formation** assurée par les ostéoblastes qui vont synthétiser une nouvelle matrice osseuse.

L'ensemble de ce processus prend environ 4-5 mois comprenant une phase de formation plus longue. Une fois la matrice osseuse synthétisée, une partie des ostéoblastes vont devenir des cellules bordantes (Figure 7)[50].

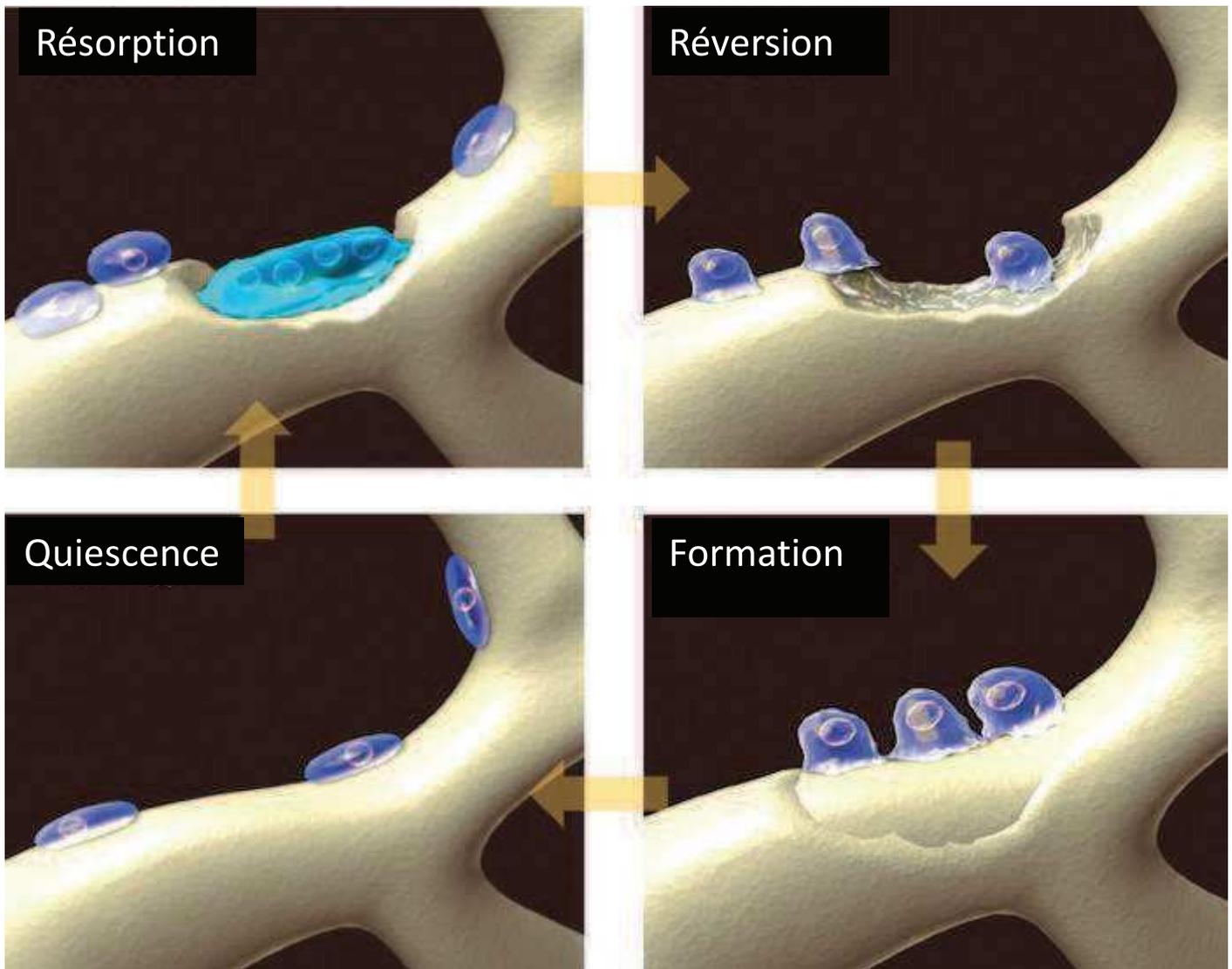


Figure 7 : Le remodelage osseux. D'après [51]

Cet équilibre repose sur une interaction permanente entre ostéoblastes et ostéoclastes, les premiers étant capables d'interpréter différents signaux de danger extracellulaires et de moduler en retour la différenciation et l'activité des seconds [52, 53]. Une interaction essentielle dans la régulation de l'ostéoclastogénèse est celle qui existe entre le récepteur activator for nuclear factor κ B (RANK), exprimé par les précurseurs ostéoclastiques, et son

ligand RANKL exprimé par les ostéoblastes [53]. RANK et RANKL sont toutes deux des protéines homotrimeriques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs du tumor necrosis factor (TNF). RANKL est exprimé à la surface des ostéoblastes ou sécrété après clivage par les MMP 7 et 14 ou par les protéases de la famille « a disintegrin and metalloprotease domain » (ADAM) [54-56]. La liaison entre RANK et RANKL induit la différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures en recrutant notamment des protéines de signalisation de la classe des TNF receptor-associated factors (TRAF). RANK possède des sites de liaison pour TRAF5 et TRAF6 [57, 58]. TRAF6 semble être un acteur majeur dans l'ostéoclastogénèse médiée par RANK, comme montré par le fait que des souris knock-out pour TRAF6 développent une ostéopétrose [59], alors que TRAF5 semble jouer un rôle plus marginal [60]. La signalisation médiée par RANK et TRAF6 active plusieurs facteurs de transcription, dont NFκB, aboutissant à la différenciation ostéoclastique. Un autre acteur majeur de la relation RANK-RANKL est l'ostéoprotégérine (OPG) (Figure 8). Cet inhibiteur endogène du signal RANKL est synthétisé par les ostéoblastes et fonctionne comme un récepteur antagoniste, capable de fixer RANKL et d'empêcher sa liaison avec RANK [61] [56, 58, 62]. Le système OPG/RANKL/RANK est la démonstration parfaite du contrôle par les ostéoblastes de l'ostéoclastogénèse, de l'activité de résorption et donc du remodelage osseux.

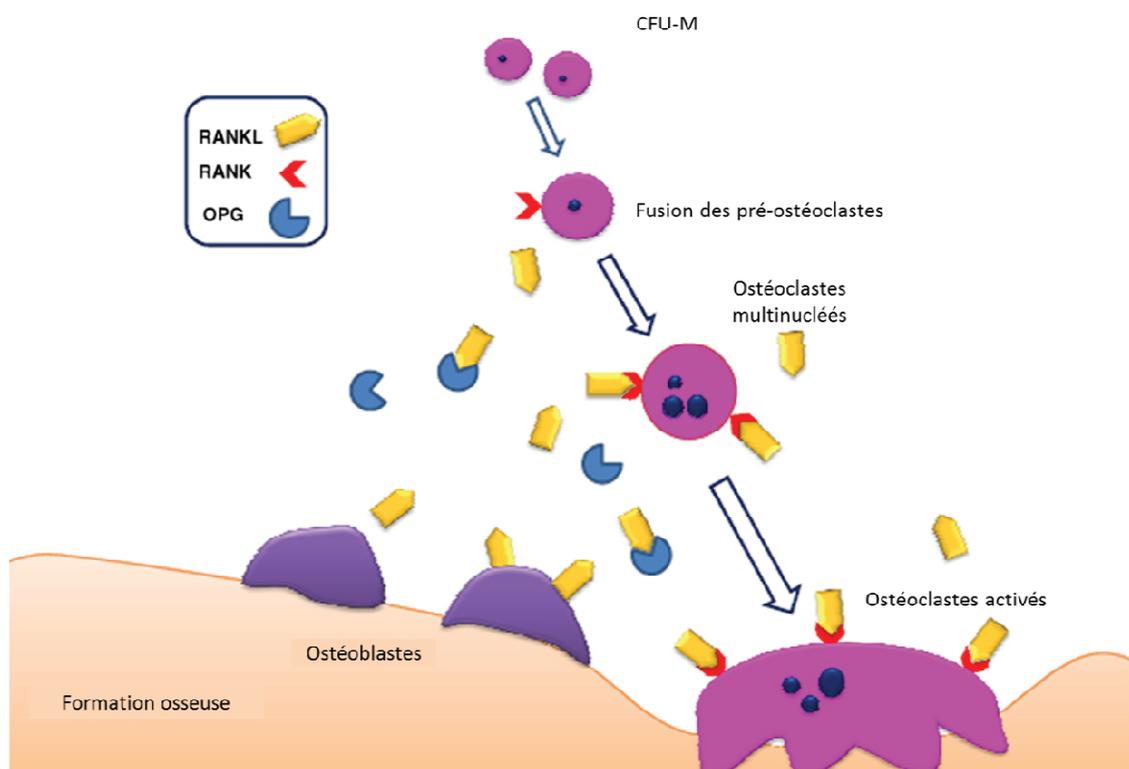


Figure 8 : Ostéoclastogénèse régulée le système RANK/RANKL/OPG (receptor activator of nuclear factor kappa-B)/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand/osteoprotegerin). D'après [63]

Un mauvais équilibre entre les ostéoblastes et les ostéoclastes est responsable de nombreuses pathologies du remodelage osseux. Par exemple, une activité ostéoclastique

trop importante est responsable de l'ostéoporose, une activité ostéoblastique incontrôlée peut entraîner des pathologies osseuses telles que l'ostéopétrose ou l'ostéosclérose. L'infection par un pathogène comme *S. aureus* peut provoquer ce déséquilibre, médié en partie par la réponse inflammatoire.

C. Infection, inflammation et remodelage osseux

1. L'ostéo-immunologie et le remodelage osseux

Le tissu osseux et le système immunitaire sont fonctionnellement interconnectés. Les cellules immunes et les ostéoclastes dérivent des mêmes progéniteurs situés dans la moelle osseuse. Chez des patients atteints par des pathologies aseptiques (comme la polyarthrite rhumatoïde ou l'ostéoporose) mais aussi chez des patients souffrant d'IOA, des quantités élevées de médiateurs chimiques comme les cytokines/chemokines pro-inflammatoires sont retrouvées dans la circulation sanguine et dans le tissu osseux.

La communication entre les cellules immunitaires et osseuses via les cytokines, les chemokines, les facteurs de croissance, les facteurs de transcription a commencé à être étudiée intensivement avec la naissance de l'ostéo-immunologie. Ce terme a été mentionné pour la première fois en 2000 quand Arron a expliqué l'importance d'étudier le squelette et le système immunitaire comme une seule entité [64]. Après que plusieurs équipes aient découverts que le RANKL pouvait être sécrété par des cellules immunitaires, Takayanagi *et al* ont montré en 2000 l'effet ostéoprotecteur de l'IFN- γ [65]. Ainsi, les cytokines ou facteurs sécrétés sont classés en deux catégories selon leur effet sur le remodelage osseux : les facteurs ostéoclastogéniques et anti-ostéoclastogéniques. Bien que ces cytokines puissent influencer la formation osseuse en ciblant les ostéoblastes et la résorption osseuse via les ostéoclastes, la majorité des données disponibles dans la littérature traite de l'action des cytokines/chemokines sur les ostéoclastes. Classiquement, on classe l'IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, TNF- α comme ostéoclastogéniques et l'IL-4, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- γ , IFN- β comme anti-ostéoclastogéniques [66] (Figure 9). Les cellules Th17, produisant l'IL-17 et du RANKL, sont classées comme ostéoclastogénique alors que les cellules Th1 et Th2 sont considérées comme anti-ostéoclastogéniques à cause de leur capacité à produire l'IFN- γ (Th1) et IL-4 (Th2).

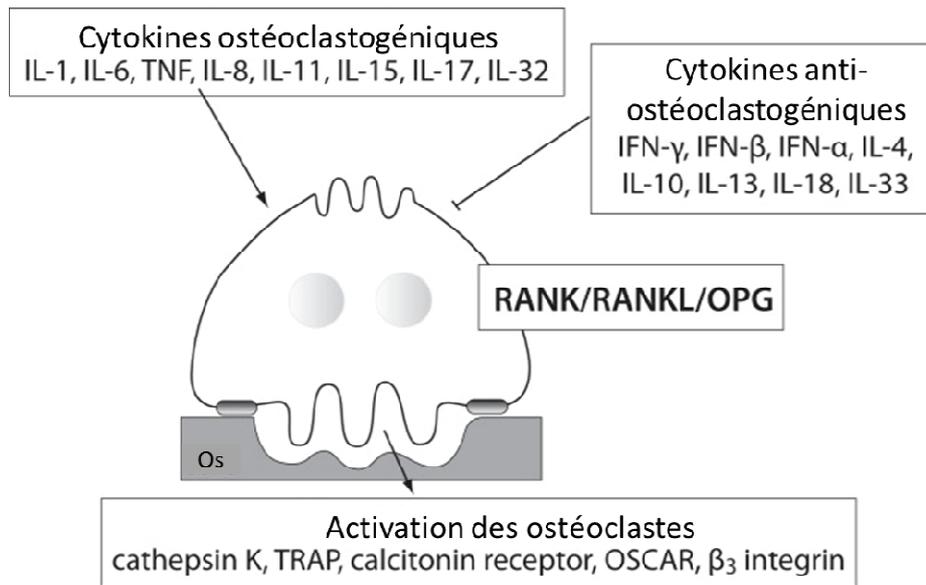


Figure 9 : Impact des cytokines pro-inflammatoires sur les ostéoclastes (IL-interleukine ; TNF-Tumor Necrosis Factor ; IFN-Interferon ; RANK- receptor activator for nuclear factor κ B, RANKL-receptor activator for nuclear factor κ B ligand; OPG-ostéoprotégerine; TRAP-tartrate resistant acid phosphatase; OSCAR-osteoclast associated immunoreceptor. D'après [66].

2. Inflammation et remodelage

Les infections, notamment celles causées par *Staphylococcus aureus*, induisent la production de plusieurs cytokines/chemokines par les cellules de l'hôte, affectant le remodelage osseux très perturbé lors d'IOA. La source de ces facteurs n'est pas complètement élucidée. Nombre d'entre-eux sont capables d'être synthétisés par les cellules immunitaires. L'afflux massif de cellules immunitaires type macrophage, cellule dendritique, lymphocyte T sur le site de l'infection laissent penser fortement que ces cellules seraient la source de ces cytokines/chemokines. Toutefois, certaines études ont prouvé que les cellules osseuses sont également capables d'en produire dans certaines situations.

- a) Surproduction cytokinique par les cellules osseuses en contexte infectieux

Parmi les cytokines de l'inflammation les plus importantes dans la physiologie et la pathologie osseuse, se démarquent le *tumour necrosis factor α* (TNF α), l'interleukine (IL) 1 β (la forme sécrétée de l'IL-1), et l'IL-6 [67]. Les patients atteints d'infection osseuse présentent une élévation des niveaux plasmatiques de ces trois cytokines [68, 69]. Bottner *et al* proposent même d'utiliser le dosage plasmatique de l'IL-6 comme marqueur des infections sur matériel [70]. Différents modèles animaux d'infection osseuse, notamment à

S. aureus, ont montré que cette pathologie induit une augmentation à la fois locale et systémique des concentrations en IL-1 β , IL-6 et TNF α . Des niveaux élevés d'IL-1 β ont été mesurés dans les tibias de rats inoculés à l'aide de trocards par *S. aureus*, et ces animaux présentaient également une élévation du taux circulant d'IL6 [71]. Grâce à l'utilisation de modèle murin d'ostéomyélite, des dosages cytokiniques ont révélé que les niveaux osseux d'IL-1 β et d'IL-6 s'élèvent à la phase précoce de l'infection, alors que le niveau de TNF α augmente plus tardivement [72]. La source de ces cytokines a alors été étudiée. La production d'IL-1 β a pu être induite *ex vivo* chez la lignée de cellules ostéoblastiques HOBIT par différents stimuli dont le TNF α [73]. Cependant, l'infection par *S. aureus* d'ostéoblastes primaires murins, bien qu'elle s'accompagne d'une élévation du niveau transcriptionnel d'IL1, n'est pas associée à la production ni à la sécrétion d'IL-1 β [74]. Chez les cellules ostéoblastiques humaines MG-63, dérivées d'ostéosarcome, ainsi que chez des ostéoblastes différenciés à partir de cellules souches mésenchymateuses, le TNF α n'est détectable qu'à de faibles niveaux [75]. Ces données renforcent l'hypothèse que ces cytokines proviendraient essentiellement de l'infiltration du tissu osseux par des cellules immunitaires en réponse à l'infection [74, 76-79], bien qu'il ait encore été très récemment démontré que l'IL-6 est sécrétée par les ostéoblastes en réponse à de nombreux stimuli dont l'infection à *S. aureus* [80].

En plus de la surproduction du TNF, d'IL-1 et d'IL6, d'autres cytokines/chemokines peuvent être synthétisées par les cellules osseuses en réponse à une infection parmi lesquels les membres de la famille des CSF (colony-stimulating factors) [81-83]. Bost *et al* ont démontré que des ostéoblastes exposés à *Salmonella* ou à *S. aureus* surexprimaient le G-CSF (granulocyte-CSF) et le GM-CSF (granulocyte-macrophage-CSF) [81]. Par exemple, Mariott *et al* ont démontré en utilisant un modèle d'infections osseuses à *S. aureus* chez la souris et en utilisant des prélèvements de tissu osseux issus de patients atteints d'IOA à *S. aureus*, que les ostéoblastes infectés sécrétaient une quantité élevée de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [84]. Lors d'une infection bactérienne, la surproduction de ce panel de médiateurs inflammatoires par les cellules osseuses, notamment les ostéoblastes, agit sur le recrutement des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes T activés au site de l'infection. Ce climat pro-inflammatoire perturbe directement le remodelage osseux.

b) Impact de la sécrétion de cytokines sur le remodelage osseux

La plupart des cytokines surexprimées en cas d'infections osseuses ont un impact ostéoclastogénique (IL-1, IL-6, TNF- α ,...). En effet, dans un modèle de périodontite simienne, l'administration locale d'antagonistes de l'IL-1 et du TNF α permet de réduire de façon significative l'ostéoclastogénèse et la destruction osseuse [85]. Chez la souris, l'administration intra-veineuse d'IL1 et de TNF α augmente la résorption osseuse de façon dose-dépendante [86] ; de plus, l'inactivation des récepteurs IL1-R, TNF-R1 et TNF-R2 est associée à une diminution significative du nombre d'ostéoclastes et de la surface de résorption osseuse après injection de lipopolysaccharide (LPS) dans le calvaria de souris [87].

Parallèlement, Claro *et al* ont démontré que la surexpression d'IL-6 après activation des ostéoblastes par *S. aureus* via TNFR1 était responsable d'une augmentation du nombre d'ostéoclastes matures TRAP positifs capables de résorber la matrice osseuse [80]. De la même manière des études ont démontré le caractère pro-ostéoclastogénique de MCP-1 [88, 89], abondamment retrouvé sur les sites infectés.

En plus d'avoir une action activatrice sur les ostéoclastes, ces cytokines sont connues pour avoir une activité inhibitrice sur le versant ostéoblastique. Par exemple, L'IL-1 et le TNF α inhibent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes, et abolissent la minéralisation et l'expression des gènes de la phosphatase alcaline et du procollagène I chez ces cellules, bien que seul le TNF α inhibe l'expression des gènes codant l'ostéonectine et l'ostéopontine [90]. Le TNF α abaisse également la production du collagène de type I, de l'ostéocalcine et de la phosphatase alcaline dans différents modèles de culture d'ostéoblastes et d'explants osseux, avec pour conséquence une réduction de la production de matrice osseuse et de sa minéralisation [91-97].

c) Mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents responsables de l'activation des ostéoclastes/ostéoblastes par les cytokines

Une fois les cytokines sécrétées, différentes voies d'activations cellulaires sont impactées selon la cytokine mise en jeu. Souza P.P.C. et Lerner U.H. ont récemment fait une synthèse bibliographique recensant tous les mécanismes cellulaires et moléculaires activés par les cytokines conduisant à une dérégulation du remodelage osseux [98]. La plupart du temps, les cytokines, souvent par interaction avec leurs récepteurs, modulent les voies cellulaires conduisant à l'expression de RANKL ou de la cascade de signalisation induite par RANKL. Par exemple, STAT3 est impliqué dans la cascade de signalisation cellulaire activé par l'IL-1 et l'IL-6, conduisant à la surexpression de RANKL par les ostéoblastes [99]. RANKL, en se fixant par la suite sur son récepteur RANK, provoque la trimérisation du récepteur et induit le recrutement des protéines TRAF, et particulièrement TRAF6 en TAK1 (TGF- β -activated kinase 1). Ceci induit ensuite l'activation de plusieurs protéines kinases incluant IKK β (inhibitor of nuclear factor κ sous-unité β) qui active le facteur de transcription NF- κ B. S'enchaîne alors l'activation du gène *nfatc-1* qui active les gènes de différenciation ostéoclastique (trap, ctsk,...)[98].

Enfin, l'effet des cytokines sur le remodelage osseux doit être vu comme l'ensemble des effets des cytokines sécrétées qu'elles soient anti-ostéoclastogéniques et ostéoclastogéniques. Bien que plusieurs détails mécanistiques soient encore à élucider, il est clairement démontré que l'infection par *S. aureus* déclenche la production locale et systémique des médiateurs pro-inflammatoires de l'hôte ayant majoritairement un rôle pro-ostéoclastogénique. L'augmentation de production de ces cytokines conduit alors à un déséquilibre dans l'homéostasie du remodelage osseux en faveur de l'ostéoclastogénèse et

de l'activité de résorption osseuse, et aux dépens de la production de matrice osseuse et de sa minéralisation par les ostéoblastes, conduisant *in fine* à la destruction du tissu osseux.

Au-delà de sa capacité à induire une réponse inflammatoire qui impacte l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes, *S. aureus* est impliqué dans des interactions de nature plus directe avec les cellules osseuses modulant aussi leur fonction.

3. Infection et remodelage

Très récemment, Cassat *et al* ont mis au point un modèle d'ostéomyélite chez la souris en inoculant une suspension de *S. aureus* dans la cavité médullaire d'un des deux fémurs des souris. Ils ont montré que les fémurs infectés perdaient environ 10-20% du volume d'os cortical près du site infecté (Figure 10). Ce résultat a amené les chercheurs à comprendre comment *S. aureus* pouvait être responsable d'une telle destruction osseuse et notamment si *S. aureus* lui-même en dehors de la réponse inflammatoire induite, pouvait moduler la capacité de minéralisation osseuse des ostéoblastes et la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes.

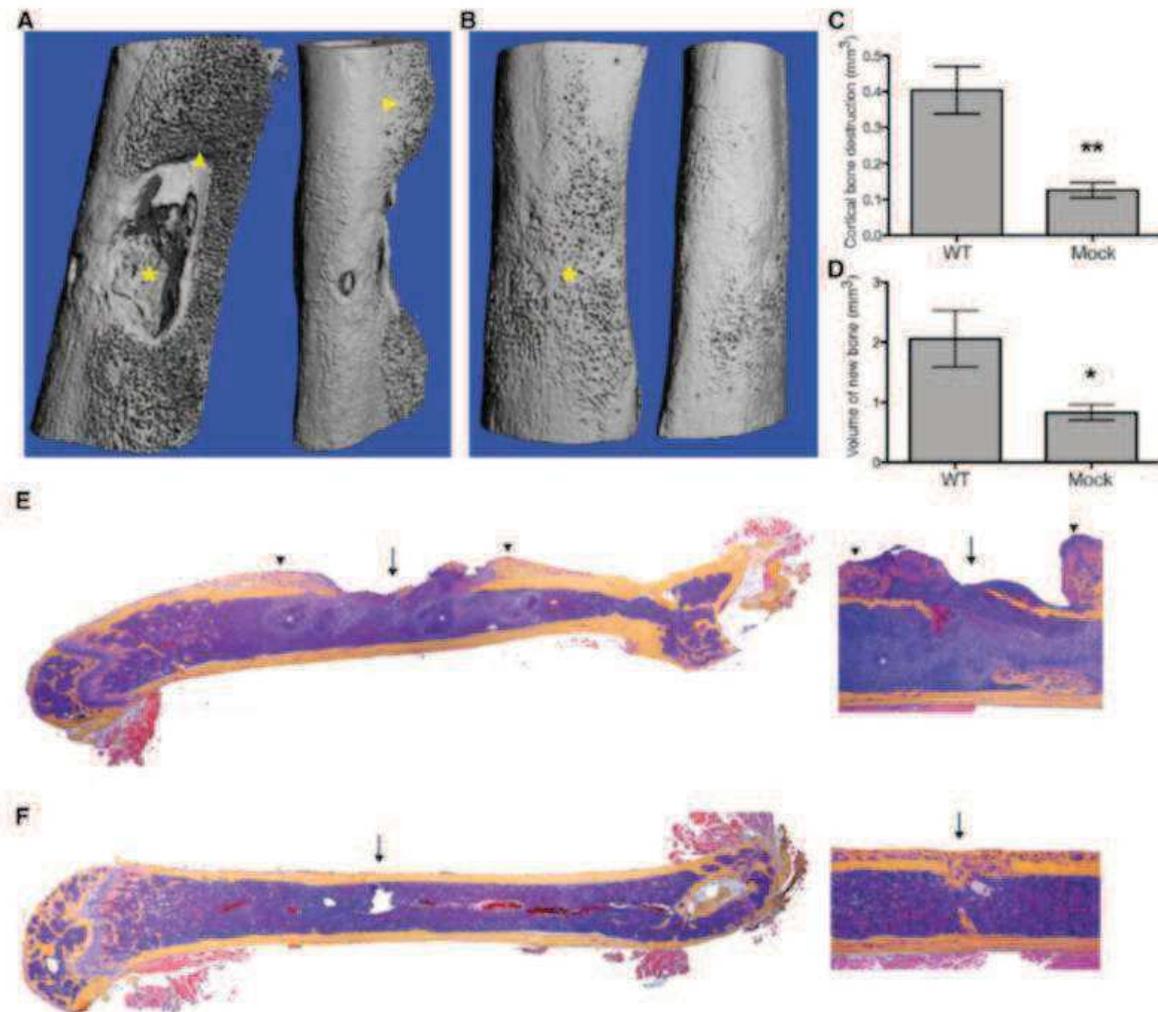


Figure 10 : Impact de *S. aureus* sur le remodelage osseux d'après [100] : A-B : Vue par microtomographe du fémur des souris 14 jours après l'inoculation dans la cavité médullaire d'une suspension de *S. aureus* (A) ou de PBS (B). Les astérisques représentent le point d'inoculation. C-D : Analyse des images obtenues en microtomographie révélant la destruction de l'os cortical (C) et de l'os nouvellement formé (D) 14 jours après l'inoculation. E-F : Coupes longitudinales des fémurs 14 jours après l'inoculation par la suspension bactérienne ou le PBS (F) et colorées à l'hématoxyline et l'éosine-phloxine orange G. Les flèches représentent le site d'inoculation, les têtes de flèches dénotent la formation périphérique d'os nouvellement créé et les astérisques montrent la présence d'abcès. D'après [100].

a) Impact direct de *S. aureus* sur la minéralisation osseuse

Outre la cytotoxicité induite par *S. aureus* sur les ostéoblastes qui contribue à diminuer le nombre d'ostéoblastes sur le site infecté que nous traiterons dans la partie suivante, les conclusions des études menées pour comprendre l'impact de *S. aureus* sur la capacité de minéralisation des ostéoblastes sont unanimes. L'infection des ostéoblastes par *S. aureus* contribuent à réduire leurs capacités de formation osseuse. Les résultats obtenus par Claro

et al montrent, grâce à un marquage à l'alizarine rouge spécifique des dépôts calciques, que la capacité de minéralisation des ostéoblastes est totalement abolie après infection des cellules par *S. aureus in vitro* [101]. Très récemment, Jin *et al* sont arrivés aux mêmes conclusions en utilisant plusieurs modèles complémentaires. Ils ont observé que *S. aureus* inhibe la capacité de minéralisation des ostéoblastes en réalisant un marquage à l'Alizarine rouge et un marquage Von Kossa [102]. Ils ont également montré une inhibition de l'expression des gènes codant pour l'ostéopontine, le collagène et l'ostéocalcine témoignant d'une inhibition de l'ostéogénèse par *S. aureus*. Enfin, les résultats obtenus par Fiedler *et al*, en utilisant des cellules souches mésenchymateuses, suggèrent que *S. aureus* réduit leurs capacités de différenciation en ostéoblastes [103].

Ensemble, ces données suggèrent que *S. aureus* diminue la capacité de minéralisation des ostéoblastes contribuant ainsi à la perte osseuse observée chez les patients atteints d'IOA.

b) Impact indirect de *S. aureus* sur la résorption osseuse

A la différence des conclusions unanimes sur l'impact des staphylocoques sur les ostéoblastes et leurs capacités de minéralisation, les résultats rapportés sur l'impact de ces bactéries sur la résorption osseuse via les ostéoclastes aboutissent à des conclusions divergentes [104-107]. Selon les protéines staphylococciques utilisées dans les modèles *in vitro* pour mimer l'effet des staphylocoques sur les ostéoclastes, les conclusions apportées par les auteurs de ces modèles s'opposent. Par exemple, Kim *et al* suggèrent que les lipopeptides bactériens conduisent à une augmentation de la différenciation ostéoclastique alors que Yang *et al* suggèrent que les acides lipotéichoïques inhibent l'ostéoclastogénèse [106, 107]. De nouvelles études s'avèrent nécessaires pour déterminer le rôle des ostéoclastes dans la perte osseuse au cours des IOA à *S. aureus*.

III. Relations hôte-pathogène au cours d'une IOA à *S. aureus*

Le chapitre précédent a permis de mettre en lumière les mécanismes impliqués dans l'ostéolyse observée lors d'IOA à *S. aureus*. Cette perte osseuse semble être la résultante de i) l'impact de la réponse inflammatoire induite par l'infection staphylococcique sur le remodelage osseux et de ii) l'impact direct de *S. aureus* sur les fonctions des cellules osseuses. Cette partie traitera des mécanismes physiopathologiques mis en jeu par *S. aureus* pour moduler ces fonctions cellulaires. Nous détaillerons ainsi les mécanismes impliqués dans l'invasion des cellules osseuses, du destin de la bactérie dans le compartiment intracellulaire et des conséquences tant chez la cellule hôte que chez les bactéries intracellulaires.

A. *S. aureus*, un pathogène intracellulaire ?

1. Techniques d'études des staphylocoques intracellulaires

Longtemps considéré comme un pathogène extracellulaire uniquement, plusieurs équipes ont mis au point des techniques permettant la visualisation et la quantification des staphylocoques intracellulaires, parmi lesquelles :

i) La technique « **gentamicin protection assay** » (**GPA**) : sans doute la plus utilisée, cette technique repose sur l'utilisation de gentamicine. Cet antibiotique, inactif dans le compartiment cytosolique des cellules, permet l'élimination des bactéries extracellulaires en préservant les bactéries intracellulaires. Après une étape de co-culture bactéries/cellules, l'ajout d'antibiotique permet d'éliminer les bactéries extracellulaires sans impacter la survie des bactéries internalisées. Après rinçage des puits et élimination des antibiotiques résiduels, les bactéries intracellulaires sont dénombrées après étalement des lysats cellulaires sur gélose [108, 109].

ii) L'utilisation de **bactéries modifiées génétiquement** : Cette méthode repose sur l'utilisation de bactéries modifiées génétiquement dans le but d'exprimer une molécule fluorescente. Classiquement, les bactéries sont transfectées avec le gène codant la *gfp* (green fluorescent protein) qui confère une fluorescence verte constitutivement exprimée par les bactéries. Après contact bactéries/cellules, les bactéries extracellulaires

et/ou intracellulaires peuvent être localisées grâce à l'utilisation d'un microscope à fluorescence ou quantifiées par cytométrie en flux [110].

iii) L'utilisation de **bactéries modifiées chimiquement** : Cette approche utilise des staphylocoques marqués à l'aide de marqueurs fluorescents tels que la phycoérythrine ou l'isothiocyanate de fluorescéine, avant l'étape d'infection afin qu'ils soient détectables par cytométrie en flux ou sous un microscope à fluorescence [111].

Chacune de ces techniques présente des inconvénients notables : i) la nécessité de la sensibilité des bactéries à la gentamicine pour la première ou ii) la modification génétique ou chimique des bactéries avant leur interaction avec les cellules hôtes pour les deux autres techniques. Malgré leurs défauts respectifs, ces techniques ont clairement permis d'établir le caractère intracellulaire des staphylocoques.

2. Mécanismes d'internalisation

Les ostéoclastes, cellules par définition immunitaires car dérivés de la lignée monocyte/macrophage, sont capables de reconnaître et de phagocyter des particules du non-soi comme les bactéries. Bien qu'aucune étude ne se soit penchée sur le mécanisme précis d'internalisation des bactéries dans les ostéoclastes, il est légitime d'émettre l'hypothèse que ce soit par phagocytose. Afin d'asseoir cette hypothèse, des expériences complémentaires utilisant des inhibiteurs de phagocytose seraient à envisager.

Les différentes techniques citées précédemment ont permis de démontrer le caractère invasif des staphylocoques dans différents types cellulaires appelés « phagocytes non professionnels » comme les cellules endothéliales et épithéliales humaines et bovines, les kératinocytes et les ostéoblastes humains [109, 112-117]. L'internalisation dans les ostéoblastes est un phénomène observé *in vitro* mais, également *in vivo*. En effet, Bosse *et al.* ont rapporté dans la littérature le cas d'un homme de 73 ans présentant une ostéite chronique du péroné, chez lequel une biopsie osseuse a été réalisée. Par microscopie électronique, cette biopsie a révélé la présence de bactéries typiques de *S. aureus* internalisées au sein d'ostéocytes et d'ostéoblastes (Figure 11) [118].

Devant ces observations, différentes études ont été menées pour comprendre le processus d'internalisation de cette bactérie dans les phagocytes non professionnels. Le mécanisme d'internalisation des staphylocoques repose sur un processus passif sur le versant bactérien. En effet, des staphylocoques vivants ou tués par la chaleur ont la même capacité d'internalisation. En revanche, il s'agit d'un processus actif sur le versant cellulaire. L'internalisation des bactéries s'apparente en fait à un phénomène de phagocytose faisant intervenir les microfilaments d'actine comme l'ont montré Ellington *et al.* (1999) en utilisant

différents inhibiteurs du cytosquelette comme la colchicine, la cytochalasine ou le monodansylcadaverine qui empêchent l'internalisation des bactéries [119].

Ce processus d'internalisation se découpe en deux étapes successives que sont l'adhésion de la bactérie à la membrane plasmique de la cellule puis son internalisation proprement dite.

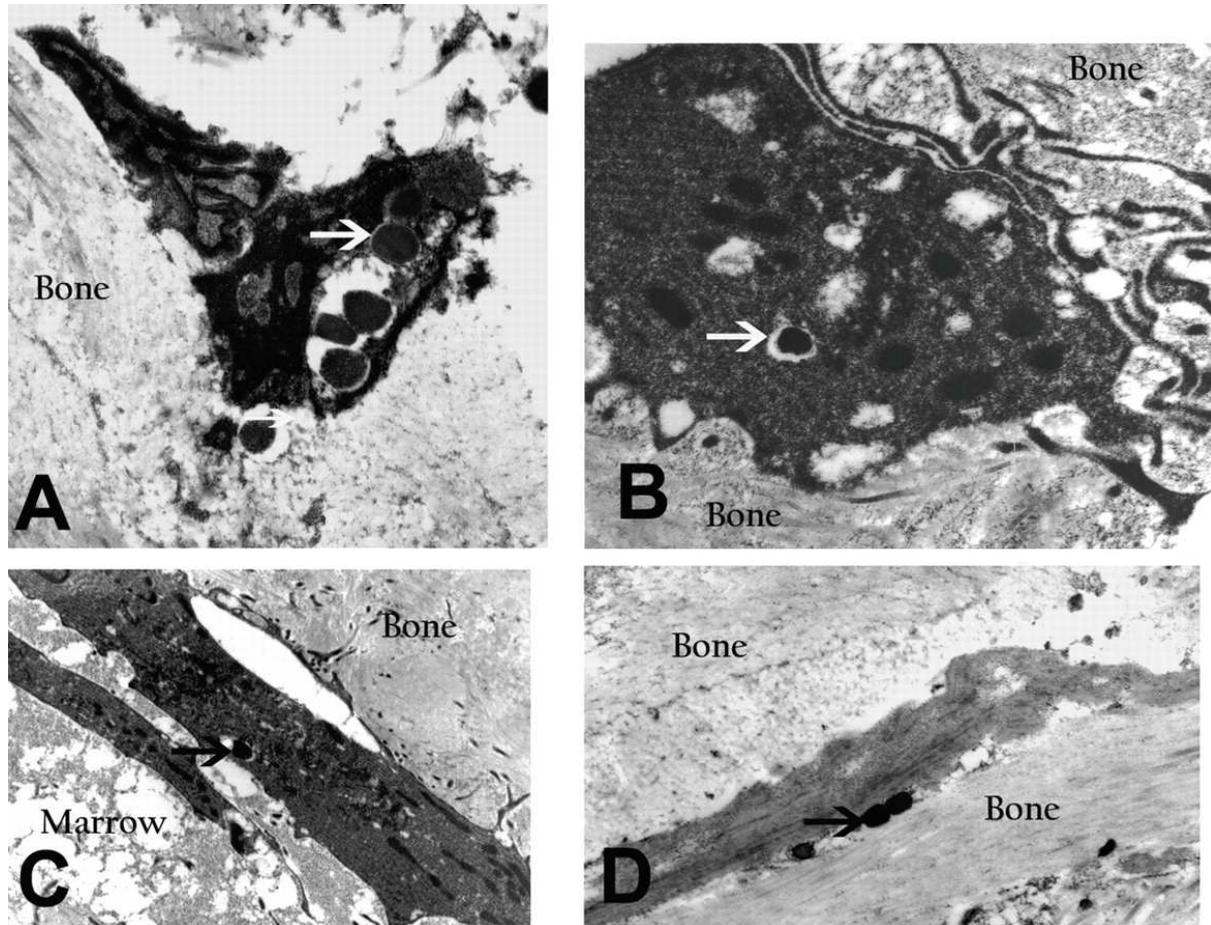


Figure 11 : Photographies en microscopie électronique documentant la présence de *S. aureus* (flèches) internalisés au sein d'ostéocytes (A et B), d'ostéoblastes (C) et dans la matrice osseuse (D) lors de l'analyse d'une biopsie osseuse réalisée chez un patient de 73 ans présentant une ostéite chronique du péroné, A, x 14,000 ; B, x 15,600 ; C, x 5,540 ; D, x 12,900. D'après [118]

a) Adhésion

Bien que les staphylocoques aient un rôle passif dans le processus d'internalisation, la présence de plusieurs constituants staphylococciques membranaires leur est indispensable. *S. aureus* possède un grand nombre de protéines exprimées à sa surface, parmi lesquelles celles appartenant à la famille des MSCRAMMs (Microbial Surface component Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Ces facteurs d'adhésion, liés de façon covalente au peptidoglycane, ont la capacité de lier les protéines de la matrice extracellulaire comme la laminine, l'élastine, le collagène, ou encore le fibrinogène et la fibronectine [120]. Les protéines liant la fibronectine (appelées Fibronectin binding protein (FnBP)), les mieux caractérisées, sont nécessaires et suffisantes à l'internalisation de la bactérie par la cellule

hôte. Les gènes *fnbA* et *fnbB*, codant respectivement les protéines FnBPA et FnBPB, sont retrouvés respectivement chez 98 % et 99 % des souches d'IOA[121]. Des mutants de *S. aureus* dont les gènes codant les deux FnBP, *fnbA* et *fnbB*, ont été inactivés, présentent une capacité d'invasion des cellules eucaryotes fortement atténuée [122-124]. L'invasion fait également intervenir la fibronectine et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ de l'hôte. *S. aureus* fixe la fibronectine via les FnBPs exprimés à sa surface ; la fibronectine joue alors un rôle de pont entre les FnBPs et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, cette dernière agissant comme un déclencheur de la phagocytose [122]. Cette liaison semble spécifique de *S. aureus* comme l'ont prouvé les travaux de Khalil *et al.* (2007) démontrant que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ n'est pas impliquée dans le processus d'invasion de *S. epidermidis* [125].

Cependant, il a été observé qu'une souche de *Staphylococcus aureus* (Newman) possédant une protéine FnBP tronquée à sa partie C-terminale était capable d'être internalisée par les cellules épithéliales et les fibroblastes. La question de l'implication d'autres facteurs de l'hôte et de la bactérie dans le processus de l'internalisation de la bactérie dans les phagocytes non professionnels s'est donc posée. La délétion des protéines « clumping factors » A (ClfA) et B (ClfB), et « serine aspartate repeat » SdrC, SdrD et SdrE ne modulent pas la capacité d'adhésion des staphylocoques. Par contre, la délétion de la protéine spa inhibe partiellement la capacité d'adhésion de *S. aureus* aux ostéoblastes. Claro *et al* ont alors démontré que l'interaction entre cette protéine spa et la protéine membranaire cellulaire TNFR-1 est capable d'induire son internalisation dans les ostéoblastes (Figure 12)[101].

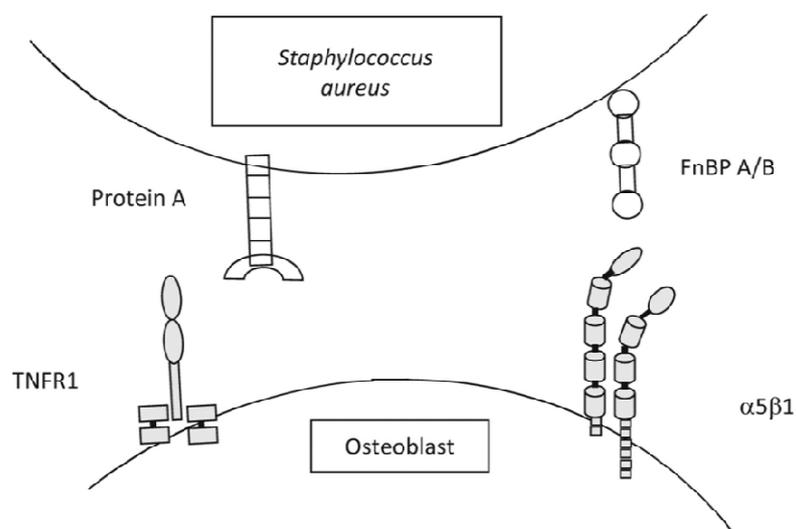


Figure 12 : Internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes. D'après [101].

b) Internalisation



Figure 13 : L'invasion cellulaire par *S. aureus* met en jeu des invaginations et protrusions membranaires. Visualisation par microscopie électronique à balayage avec pseudocouleurs (vert, surface cellulaire ; rouge, *S. aureus*) de l'invasion de fibroblastes murins par *S. aureus*. Après 1h de coculture de fibroblastes avec *S. aureus* à une MOI de 20, certaines bactéries sont déjà internalisées et sont visibles sous la membrane plasmique (flèche). Les autres bactéries sont en cours d'internalisation via de larges zones d'invagination formées sous la zone d'adhésion bactérienne (têtes de flèche). D'après [128].

L'interaction FnBP-fibronectine est en réalité la liaison entre une molécule de FnBP et une multitude de molécules de fibronectine présentes dans la matrice extracellulaire. La protéine FnBP est composée d'une succession de motifs capable de fixer plusieurs molécules de fibronectine. Cette forte densité de molécules de fibronectine liées à la paroi de la bactérie par FnBP induit le recrutement local et dense des intégrines $\alpha 5\beta 1$ reconnaissant chacune une molécule de fibronectine. Ce rassemblement d'intégrines émet un signal à l'origine d'un réarrangement du cytosquelette.

Dans un contexte physiologique, le pontage fibronectine - $\alpha 5\beta 1$ est impliqué dans l'adhésion entre cellules eucaryotes, et ce pontage implique une force de traction centripète du cytosquelette (cortex d'actine) exercée sous la surface cellulaire et nécessaire à la cohésion et à l'adhésion intercellulaire [126, 127]. La fibronectine par elle-même ne déclenche pas l'activation de l'endocytose par la cellule-hôte. Dans un contexte infectieux, le détournement de la liaison fibronectine - $\alpha 5\beta 1$ par la bactérie repose non pas sur la reconnaissance par la cellule hôte de molécules de fibronectine prises individuellement, mais sur la présentation simultanée d'une grande quantité de molécules de fibronectine

regroupées sur une surface très réduite (soit la surface d'une bactérie ou d'un cluster de bactéries). Cependant, lorsque la fibronectine n'est pas présentée de façon diffuse à la surface d'une cellule eucaryote, mais de façon très concentrée à la surface d'une bactérie, les forces de traction centripètes sont également concentrées sur une surface réduite. En conséquence apparaissent des protrusions membranaires venant recouvrir la surface bactérienne, ainsi qu'une invagination attirant la bactérie vers le cytoplasme cellulaire (Figure 13). La poursuite de ce phénomène aboutit à la séquestration de la bactérie dans une vacuole de membrane plasmique, désignée sous le terme de phagosome par analogie avec le phénomène de phagocytose observé chez les phagocytes.

Le rassemblement d'intégrine est alors à l'origine de l'accumulation, à proximité de la bactérie, de protéines d'adhésion focale comme la vinculine, la paxilline, la zyxine, la tensine, les « focal adhesion kinases » (FAK) [128]. Une ré-organisation du cytosquelette d'actine est alors observée, et la bactérie se retrouve alors dans le compartiment intracellulaire [129].

La prochaine partie traitera du destin qui s'offre à la bactérie une fois dans le compartiment intracellulaire : i) soit la bactérie internalisée provoque la mort de la cellule hôte, ii) soit la bactérie meurt après l'action des mécanismes de défense de la cellule hôte, iii) soit la bactérie s'adapte à la survie intra-cytoplasmique.

B. Destin de la bactérie et de la cellule hôte après internalisation de *S. aureus* dans une cellule eucaryote

1. Mort de la cellule hôte après internalisation de *S. aureus*

Bien que peu de données soient disponibles sur l'induction de la mort cellulaire et la persistance intracellulaire de la bactérie chez les ostéoblastes infectés par *S. aureus*, cette question a été étudiée chez d'autres types de phagocytes non professionnels. L'induction de la mort cellulaire chez ces cellules eucaryotes peut être causée par contact direct de *S. aureus* sur la cellule ou par action des toxines staphylococciques sécrétées.

a) Induction de la mort de la cellule hôte par contact direct avec *S. aureus*

Plusieurs voies de mort différentes ont été décrites aboutissant à la cytolysse des ostéoblastes après internalisation de *S. aureus*. Le clivage des pro-caspases 3 et 9 semble être impliqué dans l'induction de l'apoptose après internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes, comme le suggèrent les données décrites par Jin *et al* [102]. Parallèlement, Alexander *et al* ont montré qu'un contact entre *S. aureus* et les ostéoblastes déclenche l'expression de TRAIL (*tumour necrosis factor apoptosis inducing ligand*) [130, 131]. TRAIL fait partie des cytokines de la famille du TNF, capable de se lier à ses récepteurs transmembranaires contenant un domaine de mort à sa partie cytoplasmique. Cinq récepteurs de TRAIL sont connus ; seulement deux possèdent des domaines de mort, TRAIL-R1 et R2. Les récepteurs TRAIL-R3, R4 et l'ostéoprotégérine (OPG) sont des récepteurs capable de fixer TRAIL mais qui ne déclenchent pas de mort cellulaire étant dépourvus de domaine de mort. L'activation de ces récepteurs déclenche le recrutement de la protéine adaptatrice *Fas-associated protein with death domain* (FADD) qui active à son tour les caspases 8 et 10, aboutissant à l'engagement de l'ostéoblaste sur la voie apoptotique [132]. Le facteur TRAIL sécrété par des ostéoblastes infectés par *S. aureus* déclenche ainsi l'apoptose des ostéoblastes non infectés par la voie de la caspase 8 [130]. Ces derniers, lorsqu'ils sont cultivés en présence d'ostéoblastes infectés, expriment également TRAIL. Ces observations suggèrent que l'apoptose des ostéoblastes infectés par *S. aureus*, ainsi que celle des cellules avoisinantes et non infectées, participent à la perte de tissu osseux au cours de l'ostéomyélite.

b) Induction de la mort de la cellule hôte par les toxines staphylococciques

L'induction de la mort cellulaire par *S. aureus* est également causée par l'expression de ses facteurs de virulence représentés par les exotoxines bactériennes et les protéines de surface. Les toxines, régulées en très grande partie par un régulateur de virulence global appelé *accessory gene regulator (agr)*, ont comme fonction principale la lyse des cellules hôtes. Trois toxines peuvent être citées en exemple : l' α -toxine, la leucocidine de Pantone-Valentine et les phenol-soluble modulins.

L' α -toxine est le facteur de virulence de *S. aureus* le plus décrit et étudié car considéré comme majeur depuis de nombreuses années. Elle est codée par le gène *hla* qui est présent chez virtuellement toutes les souches de *S. aureus*. C'est une toxine appartenant à la famille des « pore-forming » toxines. L' α -toxine sécrétée sous forme de monomères, s'assemble en heptamomères formant un pore à la surface de la cellule (figure 14)[133]. Ce pore permet

la fuite d'ions K^+ et Ca^{2+} déclenchant ainsi la mort de la cellule-cible par nécrose ou par apoptose. De nombreux types cellulaires humains sont résistants à l'action de l' α -toxine, alors que les leucocytes humains et plusieurs types cellulaires d'autres mammifères sont très vite lysés par cette toxine. Ces données laissent suggérer que son action est liée à l'expression variable de récepteur(s) cellulaire(s) en fonction des types cellulaires. La métallo-protéase ADAM-10, et la calvéoline-1 ont récemment été identifiés comme des possibles récepteurs de l' α -toxine [134, 135]. Cette sensibilité différente à l' α -toxine serait le reflet direct de l'expression différente de ces récepteurs entre les types cellulaires [136]. Les processus faisant intervenir ces récepteurs ne sont pas encore totalement connus. L' α -toxine causerait la mort de la cellule par nécrose ou par apoptose selon sa concentration. Une étude récente suggère que la caspase 2 serait induite par l'efflux de potassium par les pores formés par l' α -toxine [137]. Ces résultats proviennent cependant d'études ayant utilisé des surnageants de culture ou des toxines purifiées et ne sont pas extrapolables à la mort cellulaire induites par les bactéries vivantes intracellulaires. Toutefois, une étude menée par Haslinger-Löffler *et al* en 2005 a pu démontrer que l' α -toxine pouvait déclencher l'apoptose une fois internalisée [138]. En effet, les cellules endothéliales humaines ne sont pas capables d'être lysées par un apport exogène d' α -toxine (protéine recombinante, surnageant,...). Une fois internalisées, des souches fortement hémolytiques (donc productrices d' α -toxine), provoquent la mort par apoptose de ces cellules. Des souches non hémolytiques dans lesquelles l'expression d' α -toxine a été restaurée possèdent un pouvoir d'induction de la mort cellulaire. Ainsi, ils démontrent que seules les souches hémolytiques et invasives, contrairement aux souches non-hémolytiques sont capables d'induire la mort cellulaire par apoptose avec activation des caspases sans l'implication des protéines Fas. Ceci suggère donc la propriété cytotoxique de l' α -toxine dans le compartiment intracellulaire [138].

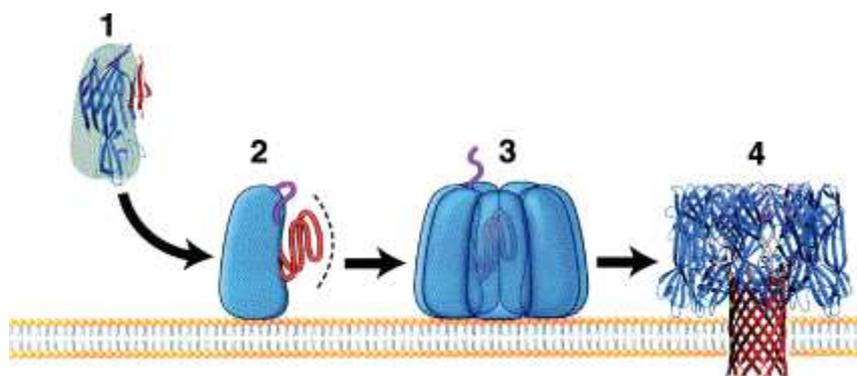


Figure 14 : Mécanisme de polymérisation de l' α -toxine à la surface des cellules-cibles. Un monomère d' α -toxine (1) se fixe à la membrane de la cellule sur un récepteur (2). La fixation et la polymérisation d'autres monomères aboutissent à la formation d'un heptamère formant un pré-pore (3), puis un pore transmembranaire en tonneau bêta qui possède une forme dite en « champignon » (4). D'après [139].

La **Leucocidine de Panton-Valentine (PVL)** est une autre toxine staphylococcique appartenant à la famille des "pore-forming" toxines. C'est une exotoxine à deux composants (synergohyménotrope) codés par les gènes *lukF-PV* et *lukS-PV*. Ces gènes forment l'opéron *lukPV* ou opéron *pvl* et sont portés par un phage lysogénique [140]. Différents phages codant la PVL ont été décrits. Le transfert horizontal des gènes de la PVL est possible entre souches de *S. aureus* grâce à cette localisation sur un phage. La PVL ne possède pas d'action hémolytique et cible les cellules de la lignée myéloïde : les polynucléaires neutrophiles, les monocytes-macrophages et les cellules dendritiques [140, 141]. De plus, cette toxine possède une spécificité d'espèce : les polynucléaires neutrophiles humains et de lapin sont sensibles à son action cytolytique contrairement aux polynucléaires murins. Comme pour l' α -toxine, cette spécificité d'espèce et de type cellulaire a mis les chercheurs sur la piste d'un récepteur à la PVL. Très récemment ; une équipe a identifié la fraction C5a du complément (C5aR et C5L2) comme étant le récepteur de la sous-unité *lukS-PV* de la PVL [142]. Bien qu'aucune étude ne se soit penchée sur le rôle de la PVL sur les ostéoclastes, il est fort probable qu'ils soient sensibles à cette toxine de part leur origine myéloïde d'une part et leur capacité d'expression du C5aR d'autre part [143]. Le complexe *LukS-PV* et *LukF-PV* va créer un pore à la surface des cellules cibles provoquant leur lyse. En fonction des doses appliquées, la PVL peut causer l'activation, l'apoptose ou la lyse des cellules cibles. Appliquée à une concentration sublytique, la PVL induit l'activation des polynucléaires neutrophiles avec sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène et de composés chimiotactiques [144], conduisant au final à une exacerbation de la réponse inflammatoire et au recrutement des leucocytes au site de l'infection. Dans le compartiment intracellulaire, il a été récemment que la PVL pouvait avoir un rôle dans le déclenchement de l'apoptose [145], en ciblant notamment les mitochondries [146].

Les phénol-soluble modulins (PSM), bien qu'appartenant au génome coeur des staphylocoques, n'ont été décrits que très récemment [147]. Ces peptides de petite taille (entre 20 et 30 AA) sont codés par des cadres de lecture dont la faible longueur explique probablement qu'ils n'aient pas été détectés par les analyses génomiques antérieures. Plusieurs types de PSM ont été identifiés : les $PSM\alpha$, les $PSM\beta$ et la delta-toxine. La régulation de leurs expressions est sous le contrôle strict et direct du système régulateur *agr*. La bactérie possède un système d'export des PSM qui a été récemment identifié : il s'agit d'un transporteur de type ABC (*ATP binding cassette*) à quatre composants [148]. Ce transporteur, nommé *Pmt* (*phenol-soluble modulins transporter*), joue un rôle essentiel dans la physiologie de *S. aureus* puisqu'en son absence, les PSM s'accumulent dans le cytoplasme de la bactérie, conduisant à la mort de celle-ci. Des homologues de *Pmt* ont été retrouvés chez d'autres espèces de staphylocoques, ce qui indique un rôle conservé de *Pmt* dans la sécrétion des PSM chez le genre *Staphylococcus*. De plus, de tels homologues sont absents des autres genres bactériens, ce qui peut expliquer que la production de PSM soit limitée aux staphylocoques.

Leur structure en hélice alpha et leur caractère fortement amphipathique leur confère une action surfactante qui leur permet de déstabiliser les membranes lipidiques créant ainsi la

lyse de la cellule [147]. Leur implication dans la pathogénie des staphylocoques hypervirulents a été démontrée à la fois par des approches de perte et de gain de fonction : l'inactivation des gènes codant les PSM induit une perte de virulence chez les souches hypervirulentes, alors qu'à l'inverse la surexpression de PSM chez des souches d'origine hospitalières non hypervirulentes s'accompagne d'une augmentation de virulence [147]. Contrairement à la PVL et à l' α -toxine, les PSM n'ont pas de spécificités d'espèces et de types cellulaires. Ils n'ont pas besoin de récepteurs à la surface des cellules pour causer la lyse, leurs propriétés surfactantes suffisent à déstabiliser les membranes plasmiques. Toutefois, Surewaard *et al* viennent de démontrer que les lipoprotéines présentes dans le serum inhibaient l'action des PSM [149]. Ces lipoprotéines sont également présentes dans le liquide interstitiel à une concentration faible mais qui augmente en cas d'inflammation. Les PSM pourraient conserver une certaine activité cytolytique dans d'autres milieux extracellulaires dépourvus de sérum dans lesquels ils sont produits à hautes concentrations, comme un abcès cutané, mais il découle de ces données que la participation des PSM cytolytiques à la pathogénicité de *S. aureus* s'exercerait principalement dans le milieu intracellulaire.

Lorsque *S. aureus* est internalisé dans les cellules osseuses, en causant la mort des ostéoblastes, soit par contact direct soit par action de ses toxines, ce pathogène amoindrit la capacité de minéralisation du tissu osseux. Ceci participe de manière active et directe à la perturbation du remodelage osseux observée lors d'IOA.

Outre sa capacité cytolytique, après son internalisation, *S. aureus* est également capable de s'adapter à la vie intracellulaire. Il détourne ainsi la machinerie cellulaire mise en marche par la cellule hôte pour tuer la bactérie, pour s'en servir comme sanctuaire.

2. Mécanismes de survie des *S. aureus* intracellulaires

Tout comme les phagocytes professionnels, les cellules phagocytaires non-professionnelles comme les ostéoblastes, les cellules endothéliales et épithéliales ont la capacité de dégrader les pathogènes ingérés. Bien qu'elles ne soient pas dotées de tous les mécanismes de défense que possèdent les phagocytes professionnels, ces cellules disposent de mécanismes capables de détruire les pathogènes intracellulaires parmi lesquels l'autophagie. Il s'agit d'un processus cellulaire catabolique qui se déroule schématiquement en trois phases (Figure 15). L'étape d'initiation aboutit au recrutement du pré-autophagosome (ou phagophore) issu du réticulum endoplasmique. Après reconnaissance, directe ou indirecte, de la bactérie par le pré-autophagosome, une étape d'élongation de la membrane vésiculaire du pré-autophagosome permet le cloisonnement de la bactérie formant un autophagosome

proprement dit. Enfin, l'étape de maturation et de fusion avec un lysosome donne naissance à un autolysosome qui aboutit à la lyse de la bactérie grâce à l'arsenal lysosomal [152].

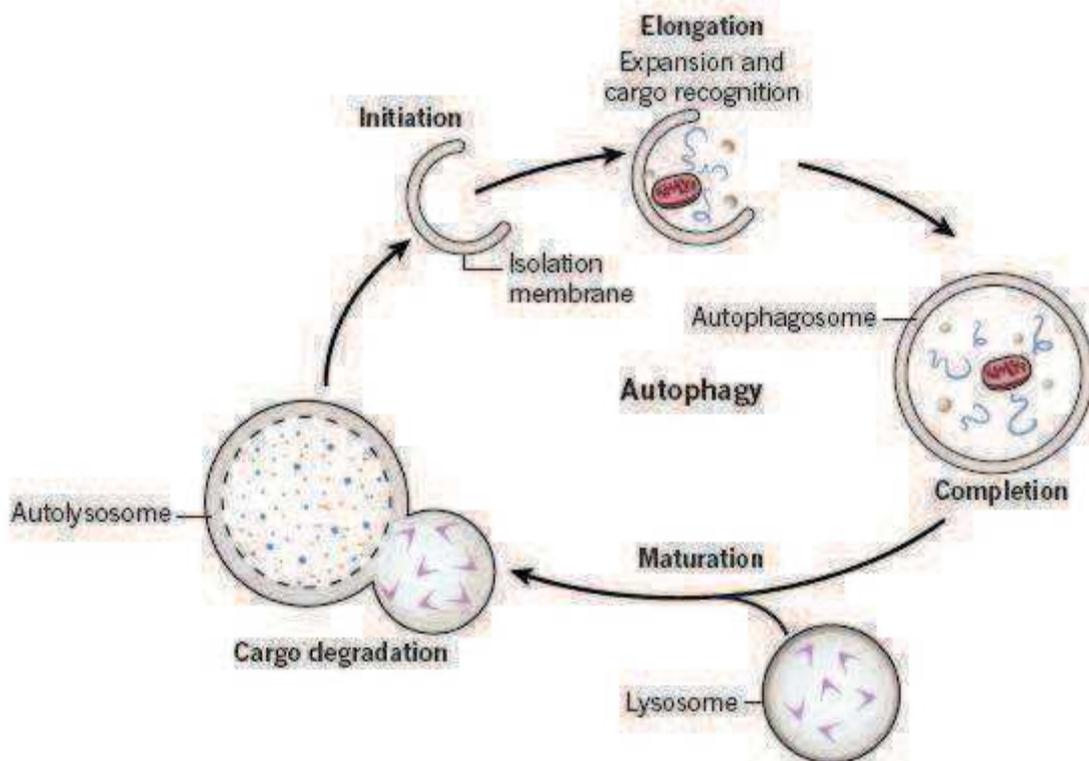


Figure 15 : Schéma des différentes phases de l'autophagie. D'après [152].

Les pathogènes ont développé des stratégies pour détourner le processus d'autophagie à leur profit, pour survivre voir même pour se multiplier à l'intérieur des autolysosomes. *S. aureus* en est un parfait exemple. Il a été démontré que certaines souches de *S. aureus* possédaient une remarquable résistance à l'élimination autophagique grâce à la sécrétion de facteurs régulés notamment par *agr*. Les autophagosomes qui contiennent des staphylocoques dorés ne fusionnent pas avec des lysosomes empêchant donc ainsi sa maturation et son acidification. Ils s'échappent alors de l'autophagosome et se retrouvent libres dans le cytoplasme pouvant causer la mort de la cellule hôte [153]. L' α -toxine et les PSM sont des facteurs participant à l'échappement phagosomal de *S. aureus*. Les phagosomes contenant des souches déficientes pour les gènes codant l' α -toxine sont capables de fusionner avec des lysosomes, et les microorganismes peuvent être alors éliminés [154]. Les différentes données de la littérature suggèrent aussi que ces microorganismes, libres dans le cytoplasme, peuvent s'adapter et persister très longtemps dans le compartiment intracellulaire. L'un des moyens mis en œuvre par la bactérie pour s'adapter à ce nouvel environnement est l'émergence d'un phénotype variant appelé small colony variant (SCV).

C. Le phénotype Small Colony Variant

La première description d'une souche de *Staphylococcus aureus* présentant un phénotype variant avec présence de microcolonies à croissance ralentie *in vitro* remonte à plus d'un siècle, par Kolle et Hetsch en 1911. Il aura cependant fallu attendre les années 2000 pour que les efforts de recherche se concentrent à nouveau sur ces populations bactériennes. Les SCV ne sont pas l'apanage de *S. aureus* et ont été décrits chez d'autres espèces bactériennes, comme les staphylocoques à coagulase négative, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Burkholderia cepacia* [8, 155]. Toutefois, les variants SCV de *S. aureus* restent à ce jour les mieux documentés.

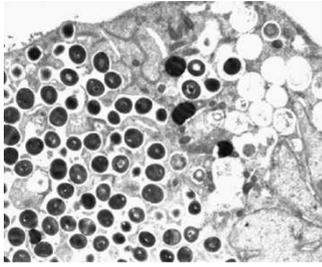
Différentes caractéristiques phénotypiques ont été associées aux formes SCV chez *S. aureus* parmi lesquelles i) une croissance ralentie aboutissant à la formation de colonies 10 fois plus petites que celles formées par le phénotype sauvage, ii) une réduction de l'activité hémolytique, iii) une perte de coloration des colonies, iv) une résistance accrue aux aminosides, et v) l'altération du métabolisme bactérien [121]. Plusieurs types de modification du métabolisme bactérien ont été décrits et sont à l'origine du ralentissement de la croissance bactérienne décrite chez les SCV. Parmi les souches cliniques de staphylocoques présentant un phénotype SCV se distinguent : i) celles présentant une interruption du fonctionnement de la chaîne de transport d'électron, et ii) celles présentant une inhibition de la biosynthèse de la thymidine. L'interruption de la chaîne de transport d'électron est causée par l'inhibition de la biosynthèse de la ménadione ou de l'hémine liées respectivement à l'expression des gènes *menD* et *hemB*. Il s'agit probablement d'une dysrégulation de l'expression de ces gènes sous la dépendance de stimuli extérieurs qui restent actuellement mal connus, mais qui seraient vraisemblablement liés au passage intracellulaire des bactéries. De ce fait, ces formes SCV sont capables de réverter vers une forme normale après subculture sur milieux gélosés en raison de l'absence de ces mêmes stimuli inducteurs. Cette faculté de réversion a poussé les chercheurs à créer des mutants possédant un phénotype stable. La plupart des travaux de laboratoire ont été menés sur des souches qui avaient subies une mutagénèse dirigée contre les gènes *hemB* ou *menD*, mimant ainsi le phénotype SCV. Les modèles *in vitro* d'infections cellulaires avec ces mutants ont permis de révéler que les souches possédant un phénotype SCV étaient capable de persister, pendant plusieurs jours, en grand nombre dans le compartiment intracellulaire sans induire une réponse inflammatoire importante [156, 157]. Ces travaux ont ainsi permis de démontrer que les souches de staphylocoques SCV stables avaient un phénotype totalement adapté à la persistance intracellulaire.

Toutefois, l'utilisation de ces mutants permet de comprendre le métabolisme bactérien, la persistance bactérienne et les réponses de la cellule hôte induite par ces variants phénotypiques mais ne permet pas de comprendre les mécanismes sous-jacents aboutissant à la genèse de ces SCV. Une question se pose alors : la formation de SCV est-elle un phénomène rare et marginal ou est-elle une étape indispensable à la chronicisation des

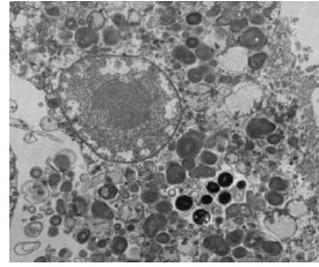
infections ? Très récemment, Tuchscher *et al* ont essayé de comprendre la dynamique de formation des SCV. A l'aide de modèle *in vitro* et *in vivo* d'infections chroniques, ils ont pu remarquer que la proportion de bactéries intracellulaires possédant un phénotype SCV augmentait continuellement avec le temps, et ce, jusqu'à plusieurs semaines suivant l'infection. Les auteurs ont pu observer la remarquable faculté de réversion des SCV après leur passage dans le compartiment intracellulaire. En effet, une seule étape de culture dans un milieu riche suffit pour que les souches, issues des modèles d'infections chroniques *in vitro* et *in vivo* et même de prélèvement de patients, possédant un phénotype SCV retrouvent un phénotype normal [158].

La formation des SCV est donc un phénomène dynamique dans l'établissement d'une infection chronique, une fois les bactéries internalisées dans des cellules phagocytaires non-professionnelles. Une partie de la réponse à la question posée précédemment est également émise dans une étude comparant la persistance intracellulaire de souches de staphylocoques présentant des degrés de virulence opposés, dans des phagocytes professionnels, comme les macrophages. Les données suggèrent que les staphylocoques hypervirulents sont totalement éliminés du compartiment intracellulaire contrairement aux souches très peu virulentes, comme la souche Newman, qui peuvent persister dans le cytoplasme des macrophages [159]. Ceci indique qu'un abaissement de la virulence, caractéristique que possèdent les SCV, semble être essentielle à la persistance intracellulaire des bactéries et donc à la chronicisation des infections (Figure 16).

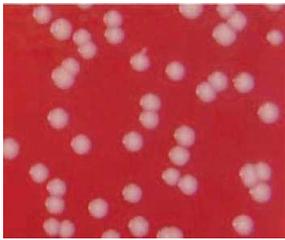
Infection aiguë



Infection chronique



Phénotype

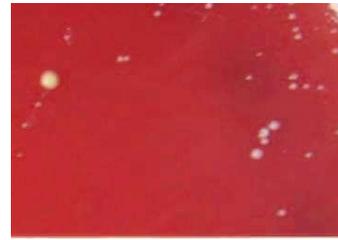


Stratégies d'adaptation bactérienne pour résister à la dégradation cellulaire



Réversion du phénotype en quittant le compartiment intracellulaire

Phénotype SCV



↑ *agr*
↑ Toxines
↓ Adhésines

↓ *agr*
↓ Toxines
↑ Adhésines



↑ Virulence
↑ Réponse immunitaire
→ Destruction cellule hôte et des tissus
→ Invasion des structures tissulaires profondes



↓ Virulence
↓ Réponse immunitaire
→ Protection vis -à-vis du système immunitaire et des antibiotiques
→ Persistance bactérienne

Figure 16 : Mécanismes d'adaptation bactérienne au cours de l'infection chronique. D'après [160]

Directement après l'infection, les cellules hôtes contiennent un grand nombre de *Staphylococci* exprimant fortement *agr* et les toxines qu'il régule, à l'origine de fortes réactions inflammatoires et cytotoxiques. Lors de l'infection chronique, un certain nombre de bactéries va résister à la dégradation cellulaire via des stratégies adaptatives impliquant la formation de phénotypes small colony variant (SCV), la régulation négative du système *Agr* et la régulation positive d'adhésines. En quittant le compartiment intra-cellulaire, les phénotypes SCV peuvent rapidement revenir au phénotype sauvage agressif et provoquer alors une nouvelle infection.

Ainsi, durant sa vie intracellulaire, les bactéries ne changent pas seulement leurs phénotypes pour devenir des SCV, elles modifient aussi l'expression de leurs facteurs de virulence. La

surexpression des protéines FnBP a notamment été reportée, augmentant ainsi leur capacité d'invasion. Cette observation a également été faite avec des souches mutantes ayant un phénotype stable [161, 162]. Ceci suggère que les staphylocoques ayant un phénotype SCV promeuvent leur endocytose par de nouvelles cellules hôtes après leur relargage dans le milieu extracellulaire. A l'inverse, l' α -toxine voit son expression diminuée lors de son passage en intracellulaire. Cette diminution de l'expression de toxine est corrélée à une moindre activité du système *agr*, pouvant expliquer la moindre activation de la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, lors d'infections persistantes, différents modèles ont montré que les marqueurs inflammatoires revenaient à des niveaux basaux malgré la présence de bactéries vivantes dans les tissus infectés [158, 163]. Cette faculté bactérienne à persister dans les cellules hôtes empêche leur reconnaissance par les cellules immunitaires et constitue une stratégie parfaite d'échappement au système immunitaire.

En outre, les SCV présentent une résistance accrue à différents antibiotiques, constituant un autre paramètre responsable de l'échec de traitement des infections persistantes. En effet, leur vitesse de croissance ralentie diminue l'action des antibiotiques ciblant la paroi. Une seconde caractéristique spécifique des SCV est une interruption du transport transmembranaire d'électrons. Cette interruption a pour conséquence de diminuer la pénétration des antibiotiques, comme les aminosides, qui utilisent le gradient électrochimique membranaire pour traverser la membrane bactérienne et atteindre leur cible [8]. Enfin, de nombreux antibiotiques sont inactifs dans le compartiment intracellulaire, ou n'arrivent pas à atteindre une concentration suffisante pour être bactéricide [164].

A l'abri du système immunitaire et des antibiotiques, les staphylocoques vivant dans le compartiment intracellulaire, notamment sous forme SCV, ont un rôle très important, dans la chronicisation des infections, notamment les IOA.

Dans cette partie, nous avons pu voir que plusieurs destins s'offraient à la bactérie une fois internalisée. Toutefois, il est important de mentionner que le destin des bactéries intracellulaires et de la cellule hôte dépend de la souche de *S. aureus*, de la présence et de l'expression de ses facteurs de virulence mais également du type de cellule hôte [165]. Plusieurs exemples peuvent être cités pour illustrer cette complexité. Premièrement, les capacités d'internalisation et de persistance d'une même souche de staphylocoque viennent d'être comparées dans une étude très récente menée par Hamza et Li [166]. La capacité d'internalisation de *S. aureus* par les macrophages est environ 100 fois plus importante que celles des ostéoblastes. De plus, certaines données de la littérature suggèrent que la MOI (multiplicity of infection ; c'est-à-dire le nombre de bactérie pour une cellule) et que la phase de croissance de la bactérie au moment de l'internalisation (stationnaire ou exponentielle) jouent un rôle dans le destin de la cellule hôte et de la bactérie internalisée. Un second exemple s'appuyant sur le rôle majeur des toxines peut être cité. *S. aureus* produit

différentes toxines, dont les hémolysines. La majorité des souches responsables de mammites bovines sont phénotypiquement positives pour la sphingomyelinase β -toxin, alors que très peu de souches isolées chez l'homme atteint de septicémie ou porteur au niveau nasal expriment cette toxine [167]. Il semble donc qu'il y ait une pression de sélection différente en fonction de l'hôte. Parallèlement, l'exemple de l' α -toxine cité précédemment indique que son action dépend de la présence de son récepteur [134-136]. Cette toxine présente donc une spécificité d'espèce et de type cellulaire. Enfin, la balance d'expression entre les exotoxines bactériennes et les protéines de surface, qui sont responsables du destin des bactéries internalisées et de la cellule hôte, semble être dépendante de système de régulation global, notamment *agr*. Les mutants Δagr de *S. aureus* sont incapables de déclencher la mort des cellules infectées [138, 159].

Ces quelques exemples nous permettent de comprendre que le destin des bactéries et des cellules hôtes, une fois la bactérie internalisée, est difficilement généralisable entre les différents types cellulaires, les hôtes et les souches. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle le caractère intracellulaire facultatif de *S. aureus* fournit à la bactérie une niche de protection, à l'abri du système immunitaire et de la plupart des antibiotiques, a progressivement été acceptée par une majorité d'auteurs. Elle est de plus considérée comme un phénomène explicatif plausible du caractère chronique, récurrent ou indolent de certaines infections osseuses d'une part, et d'autre part du taux élevé d'échec de l'antibiothérapie [168, 169].

D. Le biofilm

En plus de la vie intracellulaire, les bactéries, notamment les staphylocoques, peuvent former puis vivre dans une microstructure appelée biofilm, également responsable de l'échec thérapeutique et de la chronicisation des infections. De nombreuses définitions du biofilm existent, mais toute la communauté scientifique s'accorde sur certaines caractéristiques de la vie en biofilm. Le biofilm est une structure tridimensionnelle composée d'une communauté bactérienne sédentaire au sein de laquelle les bactéries adhèrent à un substrat extracellulaire, à une surface inerte et/ou entre elles. La vie en biofilm s'oppose donc à la vie planctonique, dans laquelle les bactéries sont libres et non adhérentes [170]. Cette structure tridimensionnelle est composée d'ADN extracellulaire, de protéines et de polysaccharides produits en grande partie par les bactéries elles-mêmes. De très nombreuses bactéries sont capables de vivre dans un biofilm, et la composition de ce biofilm varie largement entre les espèces bactériennes qui le composent. *Pseudomonas aeruginosa*, chez les bactéries Gram-négatives, et *Staphylococcus aureus*, chez les Gram-positives sont sans doute les mieux étudiées pour leur capacités à vivre en biofilm [171].

La formation de biofilm est un processus cyclique complexe (Figure 17). Elle implique **l'adhésion bactérienne initiale** sur une surface inerte, faisant d'abord intervenir différentes

forces électrostatiques impliquant les propriétés physicochimiques de la surface colonisée (hydrophobicité, charge électrostatique,...). Elle fait ensuite intervenir des macromolécules de l'enveloppe bactérienne, parmi lesquelles les MSCRAMMs qui interagissent de manière spécifique ou non avec la matrice extracellulaire qui recouvrent les surfaces colonisées. Favorisant cette première étape d'adhésion, la présence de matériel inerte, endogène (séquestres osseux) ou exogène (matériel prothétique) lors d'IOA rend ce type d'infection très propice au développement d'un biofilm.

Après leur adhérence au substrat, qui peut survenir dans les secondes qui suivent le contact avec une surface, les bactéries s'agrègent, se multiplient et forment des micro-colonies. La cohésion intercellulaire est permise par la sécrétion d'exopolysaccharides (tels que la poly-N-acetylglucosamine (ou PNAG) des staphylocoques), de protéines bactériennes spécifiques (comme BAP (biofilm associated protein), AAP (accumulation associated protein), PIA (l'adhésine polysaccharidique intracellulaire)), de molécules accessoires (comme les acides teichoïques), et d'ADN extracellulaire. L'ADN provient notamment de la lyse de cellules eucaryotes par les bactéries et constitue un élément essentiel à la cohésion du biofilm mature. Le biofilm mature prend alors une forme de champignons. Durant cette **étape de maturation**, de nombreux facteurs de régulation contrôlent la sécrétion des protéines citées précédemment, notamment le locus *ica* qui semblent contrôler la sécrétion de PIA [172] ; bien que la présence de ce locus ne semble pas absolument indispensable à la bactérie pour produire un biofilm [173].

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du **stade de dispersion** : des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm. Cette dernière étape, encore très mal connue, se produit lors du vieillissement du biofilm, ou de certains stress ou carences. Periasamy *et al* ont récemment montré que les PSM pouvaient jouer un rôle dans la dissémination du biofilm [174]. Les bactéries libérées ou les fragments de biofilm détachés pourront à leur tour coloniser une autre surface voisine et créer un biofilm mature.

La structure tri-dimensionnelle du biofilm et la présence de matrice extracellulaire réduit la diffusion des métabolites et des minéraux. Ceci entraîne l'apparition de gradients d'oxygène et de nutriments qui décroissent depuis la surface vers la base du biofilm, et de gradients de déchets du métabolisme bactérien qui s'accumulent vers la base du biofilm. Cette hétérogénéité de composition du biofilm est, en partie au moins, responsable d'une de ses caractéristiques les plus remarquables qui est la tolérance aux agressions extérieures [6]. Par rapport à des bactéries cultivées en milieu liquide, des données suggèrent que les bactéries vivants dans des biofilms peuvent survivre à des doses d'antibiotiques allant jusqu'à 1000 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) et qu'elles possèdent une résistance élevée aux ultraviolets, métaux lourds, acides et aux changements d'hydratation et de salinité [175]. Cependant, après remise en suspension du biofilm, les bactéries isolées en milieu liquide, donc redevenues planctoniques, présentent une sensibilité *in vitro* normale aux antibiotiques. Il s'agit donc d'une caractéristique réversible, phénotypique et non héritée.

Deux hypothèses ont été avancées pour comprendre cette **résistance aux antibiotiques** des bactéries en biofilm :

i) la matrice extracellulaire pourrait constituer une **barrière de diffusion**, ce qui permettrait une adaptation progressive de la physiologie des bactéries exposées au stress antibiotique [6, 175, 176],

ii) le **ralentissement de la croissance bactérienne** diminuerait l'activité de certains agents antibactériens. De nombreux antibiotiques, comme les β -lactamines, sont plus efficaces sur les bactéries se multipliant activement. Ce ralentissement de croissance bactérienne est expliqué par l'accès limité aux nutriments, la faible concentration en oxygène et le pH élevé des couches profondes du biofilm [6, 175, 177].

Le métabolisme lent, caractéristique phénotypique propre aux bactéries vivants en biofilm, pose une difficulté diagnostique aux microbiologistes : certains tests phénotypiques utilisés pour l'identification bactérienne, comme les tests d'agglutination ou les galeries d'identification biochimique, et retarde la positivité d'autres tests comme la détection de coagulase libre ou la pigmentation des colonies de *S. aureus*. Ces particularités font courir le risque d'une erreur diagnostique, ces bactéries à métabolisme ralenti, pouvant être méconnus ou identifiés à tort comme des staphylocoques à coagulase négative. Ces isolats, particulièrement dans un contexte d'infection chronique, doivent idéalement faire l'objet d'une confirmation d'espèce par une méthode non phénotypique comme la détection par PCR de gènes spécifiques de *S. aureus* [8]. Ce métabolisme ralenti est une caractéristique des bactéries vivant en biofilm qu'elles partagent avec les bactéries ayant un phénotype SCV.

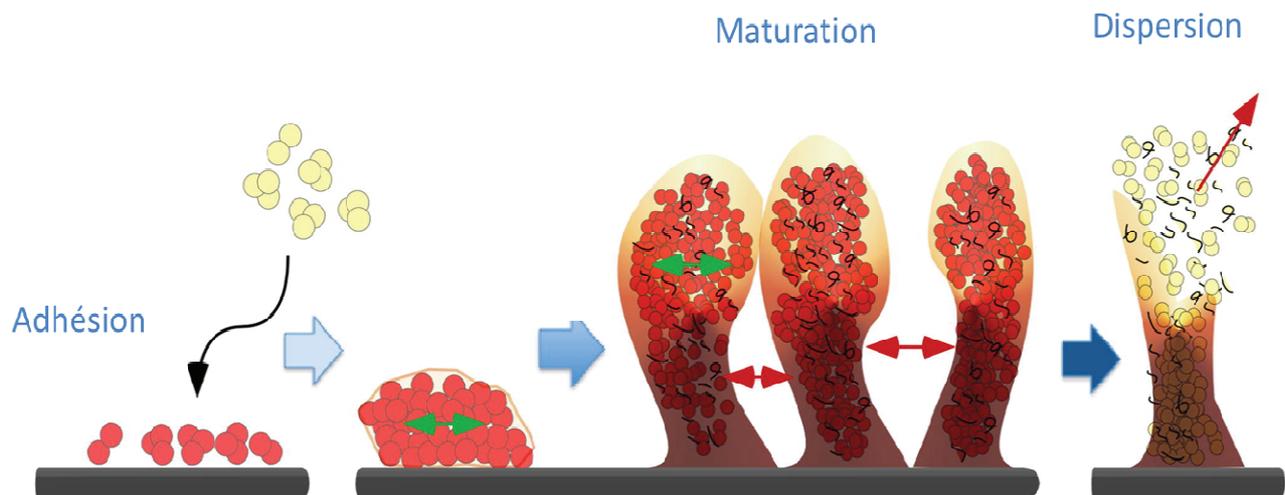


Figure 17 : Cycle de vie d'un biofilm. Phase 1 : les bactéries libres, ou planctoniques, adhèrent à une surface inerte et sécrètent une matrice extracellulaire. Phase 2 : la communauté en biofilm acquiert une architecture tridimensionnelle comprenant un réseau de canaux qui permet l'acheminement des nutriments vers les zones profondes. Les bactéries ont un métabolisme ralenti et sont protégées du système immunitaire de l'hôte et de la plupart des antibiotiques. Phase 3 : des microcolonies ou des bactéries libres se détachent de la surface du biofilm. Elles dérivent dans le milieu extérieur et peuvent coloniser une nouvelle surface. D'après [178]

L'inefficacité de la plupart des antibiotiques sur les bactéries vivants en biofilm s'ajoute à **l'inefficacité des moyens mis en œuvre par le système immunitaire**. En effet, les bactéries planctoniques sont en général efficacement phagocytées et tuées par les phagocytes (polynucléaires et macrophages). Lorsque les bactéries sont associées à des biofilms, elles donnent lieu à un phénomène de « phagocytose frustrée » au cours duquel la phagocytose est inefficace, y compris du fait de l'inaccessibilité des anticorps opsonisants. Les phagocytes sécrètent néanmoins leurs facteurs microbicides, y compris des enzymes qui sont délétères pour les tissus adjacents et en accélèrent la destruction [179].

L'ensemble de ces données a mis en lumière la capacité d'adaptation des staphylocoques aux différents environnements auxquels ils peuvent être confrontés, que ce soit la vie en biofilm, la vie intracellulaire, la colonisation de l'hôte ou au contraire l'invasion. Cette capacité d'adaptation est rendue possible par la modulation de l'expression de leurs facteurs de virulence.

E. Contrôle de l'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* lors d'une interaction hôte-pathogène

Finement régulée, la virulence de *S. aureus* repose sur l'expression de protéines membranaires et d'exotoxines protéiques dont certains représentants ont été décrits précédemment (PVL, PSM, ...). Les niveaux d'expression de ces déterminants sont contrôlés par un réseau complexe et interconnecté de régulateurs. Ces systèmes de régulation globaux, interagissant entre eux, vont contrôler les gènes de virulence en fonction de l'avancement du processus infectieux [180]. L'identification de ces régulateurs est toujours le sujet d'intenses recherches comme le démontre la découverte ces dernières semaines d'un nouveau régulateur jusqu'ici encore inconnu nommé catabolite control protein E (CcpE) [181]. Le nombre de régulateurs connus à ce jour s'élève à plus de vingt [182]. Devant cette complexité, nous ne présenterons ici que les régulateurs d'importance majeure pour l'expression des exotoxines et des FnBP : *agr*, *sarA* et *saeRS*.

1. L'accessory gene regulator (*agr*)

Le système *agr* est le principal régulateur de *S. aureus* et le plus étudié à ce jour. Les premières observations ont montré que la régulation par *agr* des facteurs de virulence est plus prononcée pendant les phases de croissance post-exponentielle et stationnaire [183]. Néanmoins, dans un milieu de culture épuisé en nutriment, le système *agr* peut être activé indépendamment de la phase de croissance, suggérant ainsi qu'un facteur sécrété est capable de moduler les fonctions d'*agr* [184]. En fractionnant ce milieu, des analyses en spectrométrie de masse combinées à des techniques de séquençage ont révélé que le facteur sécrété est la thiolactone cyclique. Ce signal fonctionnel est également appelé peptide auto-inducteur (AIP) [185, 186]. Ce travail pionnier a défini le système *agr* comme un système de quorum-sensing à deux composants (senseur membranaire et effecteur), et a ouvert les portes à d'intensives recherches examinant les mécanismes moléculaires et biochimiques de ce système et son rôle dans la pathogénèse et la formation de biofilm.

C'est *agr* lui-même qui code son propre peptide effecteur. Système à deux composants, sa régulation est fonction de la densité bactérienne ou « quorum sensing ». Lors de la phase exponentielle de croissance, la faible densité bactérienne s'accompagne d'une faible concentration en peptide auto-inducteur et donc un bas niveau d'activité *agr*. Lorsque la densité bactérienne augmente, *agr* est activé via l'augmentation de la concentration en peptide auto-inducteur, marquant le passage en phase stationnaire dans laquelle les ressources disponibles peuvent venir à manquer [182]. Le système *agr* réprime la transcription de différentes protéines membranaires, et notamment les FnBP et la protéine A, et active l'expression d'exotoxines telles que l' α -toxine et la β -toxine. Ainsi, l'expression d'adhésines de surface est importante lors de la phase initiale de croissance permettant la colonisation. L'activation d'*agr* stimule ensuite l'expression de toxines associées à la destruction tissulaire et à la libération de nouvelles ressources pour la bactérie (Figure 18).

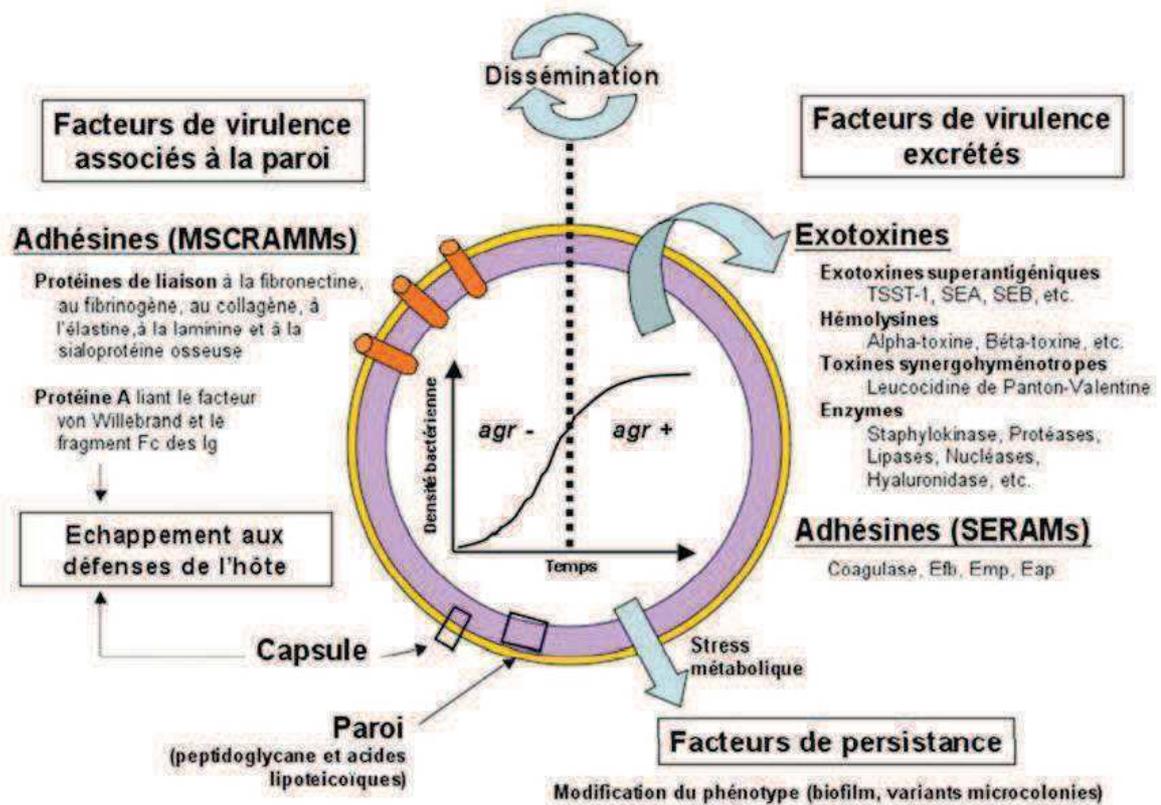


Figure 18 : facteurs de virulence associés à la paroi ou excrétés modulés par le système *agr*. D'après [187]

Le locus *agr* comprend cinq gènes, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* et *hld*. (Figure19). Il comporte deux unités transcriptionnelles disposées en sens opposé et contrôlées par deux promoteurs indépendants : P2 et P3. L'effecteur du système est le transcrit de l'opéron P3 : l'ARN_{III}. C'est l'augmentation de la transcription de l'ARN_{III} qui entraîne une augmentation de l'expression des gènes codant les exotoxines staphylococciques et réprime la production des facteurs de virulence associés à la surface de la bactérie [188]. L'ARN_{III} peut interagir avec les différents promoteurs et ARNm des exoprotéines permettant leurs stabilisations et leurs traductions. Ainsi, l'interaction ARN_{III} / ARNm des adhésines inhibe leur synthèse [189]. L'opéron P2 code quant à lui un ARN de 3,5kB appelé ARN_{II} qui possède quatre cadres de lecture codant l'*agrD*, l'*agrB*, l'*agrA* et l'*agrC*. Les protéines codées par cet ARN_{II} permettent l'auto-activation du système *agr* par la synthèse du peptide auto inducteur (AIP). Il est synthétisé sous forme d'un précurseur dont le clivage est dépendant d'*agrB*. L'AIP active alors le récepteur *agrC* qui est une protéine transmembranaire dont la fonction est de phosphoryler *agrA* [190]. Une fois phosphorylée, *agrA*, protéine cytoplasmique de 34kD va activer les promoteurs P2 et P3 aboutissant à une augmentation d'ARN_{III} [191, 192]. Bien que majoritairement non traduit, il porte cependant un court cadre de lecture codant la δ -toxine (*hld*), laquelle n'est pas impliquée dans la régulation. Bien que la majorité des effets

transcriptionnels et post-transcriptionnels du système *agr* soient imputables à l'action de l'ARN_{III}, la protéine *AgrA* possède également une cible en dehors du promoteur P₂, activant la transcription d'exotoxines protéiques analogues à la δ -toxine, les PSM [182].

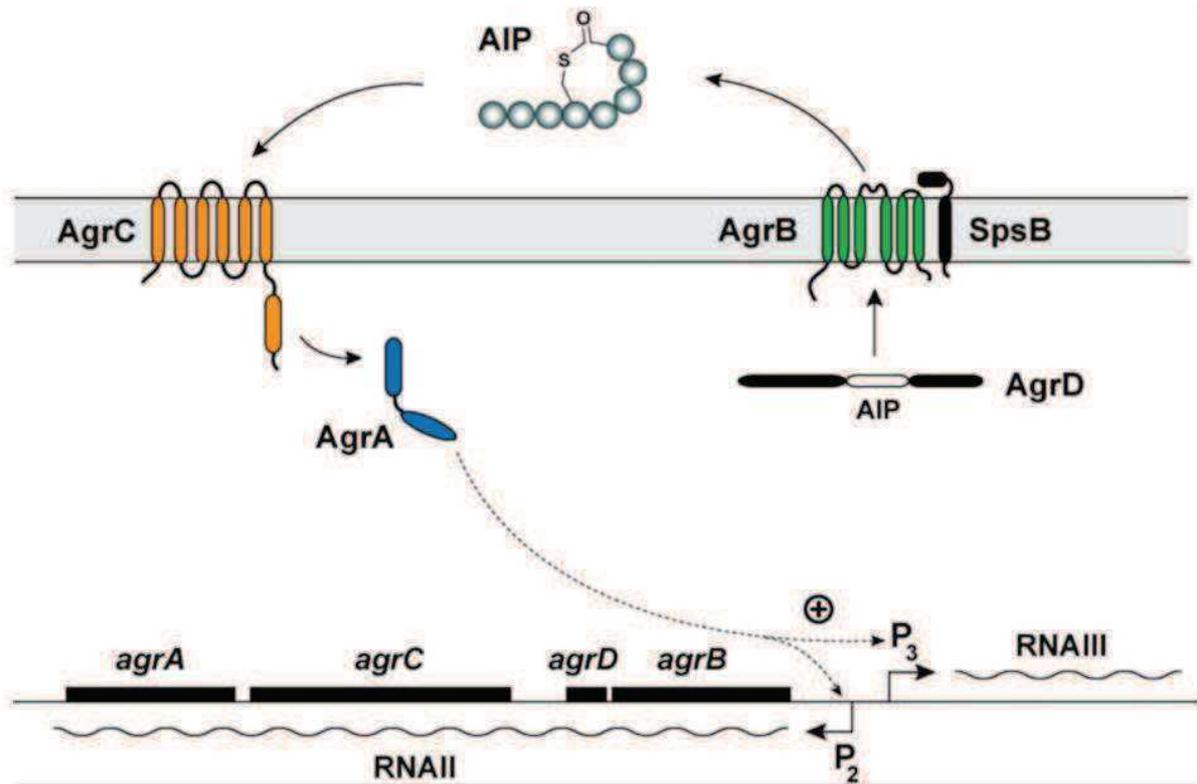


Figure 19 : Vue schématique du locus *agr*. D'après [182].

2. Le système *Sar* ou « Staphylococcal Accessory Regulator »

Le système *Sar* est également un régulateur global de l'expression des exoprotéines staphylococciques. Contrairement à *agr*, il s'agit d'un facteur de transcription et non d'un système à deux composants. La protéine *SarA* est encodée par trois produits de transcription différents situés sur l'opéron *sarA* et possédant chacun leur propre promoteur [235]. Ce régulateur active de nombreux promoteurs en se liant à des séquences d'ADN spécifiques, désignées sous le terme de *Sar boxes* [193]. Les premières expériences ont montré que les souches mutantes délétées pour *sarA* expriment moins les transcrits d'*agr* RNA_{II} et RNA_{III} [194, 195]. *SarA* active la transcription du locus *agr* en se fixant sur les promoteurs P₂ et P₃.

Par ailleurs, la protéine SarA peut également se lier directement aux promoteurs des gènes de virulence tels que celui de la protéine A, de l'hémolysine α , de la TSST-1 ou des entérotoxines. Enfin, de nombreux homologues de SarA, tels que SarR, SarS, SarT et SarU ont été décrits. Ils possèdent des activités proches de celle de SarA [191, 196].

3. Le système SaeRS ou « Staphylococcal Accessory Element »

Régulateur global de la virulence de *S. aureus*, le locus *Sae* code un système à deux composants, SaeR (Régulateur) et SaeS (Senseur). Le système *SaeRS* exerce une régulation transcriptionnelle sur les gènes codant les hémolysines α et β , mais aussi la protéine A, la coagulase, les protéines liant la fibronectine et le fibrinogène. Cette régulation est de nature directe et ne fait pas intervenir de modification du niveau d'expression d'*agr* ou du régulateur *sarA* [238,239]. La nature du ligand de SaeS reste inconnue à ce jour.

4. Adaptation de la virulence lors d'une interaction hôte-pathogène

Les récentes avancées dans le domaine du séquençage à haut-débit ont permis le développement de puces capables d'analyser les variations d'expression génique à l'échelle d'un génome complet. Garzoni *et al* ont mis au point un modèle d'infection de cellules pulmonaires épithéliales humaines par *S. aureus* afin d'extraire l'ARN des bactéries intracellulaires puis d'analyser le transcriptome. En utilisant de la cytochalasine dans le milieu de culture afin de bloquer l'internalisation de *S. aureus* dans la cellule eucaryote, ils ont tout d'abord pu analyser la modification de l'expression génique de *S. aureus* au contact d'une cellule. Les résultats montrent que l'adhésion de *S. aureus* à une cellule épithéliale ne modifie pas l'expression de ces gènes [197]. Ces résultats sont concordants avec ceux disponibles dans la littérature démontrant que l'internalisation de *S. aureus* dans une cellule eucaryote est un phénomène totalement passif du point de vue bactérien [122]. A l'opposé, de profonds changements dans le transcriptome bactérien affectent 40% des ORF (Open-Reading Frame) ce qui suggèrent une adaptation bactérienne active au nouvel environnement que constitue le compartiment intracellulaire. La majorité des gènes impliqués dans la production d'énergie (cycles ATP et du citrate, métabolisme du pyruvate, phosphorylation oxydative) sont inhibés après 2h d'internalisation, ceci ayant pour conséquence directe une diminution drastique de plus de 75% de l'expression des protéines ribosomales chez *S. aureus*. Cette évolution métabolique est à mettre en parallèle d'une surexpression massive de plusieurs transporteurs. Garzoni *et al* décrivent que plus de 40

transporteurs impliqués dans les échanges d'ions, de nucléotides ou de peptides, ou d'urée sont significativement surexprimés. Ceci traduit le « reroutage » direct des ressources cellulaires au profit de la bactérie internalisée [197]. Ces observations s'associent à une croissance bactérienne limitée et une sécrétion de toxines finement contrôlée par les régulateurs de facteurs de virulence.

D'autres données disponibles dans la littérature montrent que le staphylocoque est capable de s'adapter à la vie intracellulaire et par conséquent à la chronicisation des infections. Cette adaptation est en grande partie régulée par les régulateurs globaux de virulence détaillés ci-dessus. En effet, la diminution d'expression des facteurs de virulence via la régulation négative du système *agr* pourrait également jouer un rôle dans l'échappement de la bactérie au système immunitaire de l'hôte et par conséquent dans la chronicisation des infections à *S. aureus*. Il a été montré d'une part que les souches défectives pour *agr* étaient plus fréquemment isolées chez les patients souffrant d'infections chroniques [198], d'autre part que ces souches avaient une forte capacité d'internalisation tout en induisant moins d'inflammation et de cytotoxicité [138, 199]. Cette baisse des facteurs de virulence au cours de l'infection chronique serait un phénomène dynamique et réversible, médié par un réseau complexe de régulateurs comme *agr* mais également *Sae* ou *SarA* [198].

Parallèlement, plusieurs études ont souligné le rôle de la perte des polysaccharides de capsules dans le passage à la chronicité des infections à *S. aureus* [200-203]. L'une d'entre elles s'est spécifiquement intéressée aux souches de *S. aureus* impliquées dans les ostéomyélites et a pu montrer que seulement 47% (31/66) des isolats responsables d'ostéomyélites chroniques exprimaient les polysaccharides de capsule contre 79% (26/33) des souches d'ostéomyélites aiguës [200]. En se délestant des polysaccharides capsulaires, *S. aureus* démasquerait les adhésines présentes à sa surface et faciliterait ainsi son adhésion puis son internalisation au sein des ostéoblastes [203-205]. L'expression des polysaccharides de capsule est sous le contrôle des régulateurs *agr* et *sarA* [205-207].

Ensemble, ces données démontrent ainsi que la réponse bactérienne globale suite à son internalisation est complexe mais tout à fait adaptée à la vie intracellulaire des staphylocoques.

TRAVAIL PERSONNEL

INTRODUCTION

La revue de la littérature présentée dans la section précédente a permis de souligner la problématique complexe de la prise en charge des IOA. De nombreuses inconnues demeurent quant à la physiopathologie de ces infections, notamment celles causées par les staphylocoques, compliquant ainsi le diagnostic et la prise en charge des patients. Le travail accompli au cours de cette thèse a donc visé à améliorer les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu au cours de ces infections en se focalisant notamment sur les relations hôtes-pathogènes.

Le début de nos travaux ayant marqué le lancement d'un nouvel axe de recherche sur la physiopathologie des IOA, au sein de l'équipe « pathogénèse des infections à staphylocoques » du CIRI (INSERM-U1111), il a été nécessaire en premier lieu de mettre en place un modèle d'étude adapté d'infection *in vitro* d'ostéoclastes et d'ostéoblastes par *S. aureus* et *S. epidermidis*. La comparaison de différentes souches cliniques ou isogéniques requiert l'obtention de mesures fiables de la quantité de bactéries adhérentes ou internalisées, viables ou non-viables. Or, les techniques expérimentales disponibles jusque-là étaient connues pour leur manque de reproductibilité et étaient d'une lourdeur difficilement compatible avec l'étude d'un nombre élevé de conditions et de souches. La première partie de nos travaux personnels a donc consisté à rechercher et optimiser différentes techniques de mesure de l'adhésion et de l'internalisation de *S. aureus* au sein d'ostéoblastes humains. Ces travaux ont permis de définir un protocole expérimental compatible avec une utilisation à haut débit et dont la description a donné lieu à une publication dans Journal of Microbiological Methods.

Bien que *S. aureus* soit le pathogène majoritairement impliqué dans les IOA, *Staphylococcus epidermidis* est responsable d'un grand nombre d'IOA avec une prévalence dépassant même celle de *S. aureus* dans certaines séries, notamment au cours des IOA sur matériel prothétique. Pourtant très peu de données existent sur la physiopathologie des infections causées par cette espèce. C'est pourquoi, dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes attachés, en utilisant une collection de souches cliniques issues d'IOA et de portage nasal, à i) comparer les mécanismes mis en jeu par *S. aureus* et par *S. epidermidis* lors des IOA et ii) à étudier les mécanismes impliqués dans la survenue de ces IOA à *S. epidermidis* (biofilm, persistance intracellulaire,...). Les résultats ont donné lieu à une publication dans Plos One.

Dans les deux parties suivantes de cette thèse, nous avons consacré nos travaux à tenter d'associer les phénotypes de virulence de souches de staphylocoques avec la présentation clinique des infections dont elles sont l'origine. Deux séries de travaux ont été menées : i) la première a consisté à l'utilisation de clones de MRSA d'origine hospitalière et

communautaires à l'origine de tableaux cliniques très différents, ii) la seconde a été réalisée à partir d'une collection de souches cliniques de MSSA isolées d'IOA chroniques ou aiguës. Ces deux travaux ont pour la première fois permis d'associer la persistance intracellulaire de souches cliniques avec le degré de sévérité et l'évolution des infections osseuses. Les résultats obtenus ont été décrits dans deux publications, dont l'une est d'ores et déjà acceptée à Plos One et l'autre soumise à Clinical Microbiology and Infection.

La dernière partie de nos travaux a été dédiée à comprendre les mécanismes physiopathologiques responsables de la destruction osseuse observée chez les patients atteints d'IOA. Ces lésions osseuses sont à l'origine du descellement des prothèses en cas d'IOA sur matériel mais sont surtout responsables des lourdes séquelles fonctionnelles observées chez nombre de patients. Les travaux que nous avons entrepris avaient pour but d'étudier les interactions entre *S. aureus* et les ostéoclastes, seules cellules responsables de la résorption osseuse. Ces travaux ont permis de démontrer que cette bactérie était à l'origine de l'augmentation de la capacité de résorption des ostéoclastes par deux mécanismes complémentaires, conférant aux ostéoclastes, un rôle central et pivot dans la physiopathologie des IOA. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Infectious Diseases.

Au final, l'objectif global de cette thèse a été d'approfondir les connaissances sur les interactions hôtes-pathogènes mis en jeu lors d'IOA et plus spécifiquement les interactions entre les staphylocoques et les deux principales cellules osseuses que sont les ostéoblastes et les ostéoclastes. Le cahier des charges de nos travaux était de dépister des mécanismes physiopathologiques pertinents dans la compréhension des IOA, permettant l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge des patients.

PREMIERE PUBLICATION : A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus*

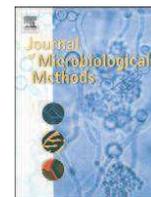
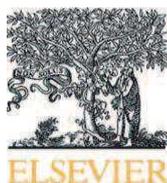
L'étude des interactions entre bactéries et cellules eucaryotes nécessite de pouvoir quantifier avec précision l'adhésion et l'invasion bactérienne. Une technique classiquement utilisée dans les modèles de culture cellulaire est la protection à la gentamicine (« gentamicin protection assay »). Cette technique consiste, après une étape de co-culture bactéries-cellules pendant laquelle a lieu l'invasion, à ajouter dans le milieu de culture un composé bactéricide, le plus souvent la gentamicine, qui permet de tuer les bactéries extracellulaires sans altérer les bactéries intracellulaires. A l'issue de l'incubation et après rinçage du milieu extracellulaire, les cellules infectées sont lysées et le lysat ensemencé sur gélose pour dénombrer des colonies formant unités (CFU) intracellulaires. Cette méthode ne permet pas de quantifier l'invasion indépendamment de la survie bactérienne (seules les bactéries viables pouvant être dénombrées) et requiert que les souches utilisées soit sensibles à la gentamicine.

Pour s'affranchir de cette limite et quantifier les bactéries internalisées indépendamment de leur viabilité, des méthodes basées sur la cytométrie en flux ont été développées. L'utilisation d'un marqueur fluorescent ciblant un antigène de *S. aureus* a permis de marquer spécifiquement les bactéries intracellulaires et de quantifier d'une part la proportion de cellules infectées, et d'autre part le niveau de fluorescence par cellule comme marqueur de la biomasse bactérienne intracellulaire. Ces techniques présentent cependant une limite importante: le marquage des bactéries est réalisé préalablement à l'étape d'infection, soit par construction génétique (la bactérie exprime une molécule fluorescente), soit chimiquement (la bactérie est marquée à l'aide d'anticorps). Cette approche est donc peu physiologique en ce sens que les bactéries utilisées dans le modèle ont subi une transformation avant leur utilisation dans le modèle d'infection, ce qui peut impacter leur comportement vis-à-vis des cellules cibles.

Afin d'optimiser la pertinence physiologique des modèles d'infection et de s'affranchir des limites évoquées ci-dessus, nous avons développé une méthode d'analyse dans laquelle le marquage des bactéries a lieu après l'étape d'infection. Les bactéries co-cultivées avec les

cellules sont donc dans un état aussi physiologique que possible. Cette approche a été rendue possible par l'emploi d'un fluorophore spécifique couplé à un antibiotique ciblant avec une haute affinité le peptidoglycane des bactéries Gram positif, la vancomycine (vancomycin-bodipy).

Cette technique robuste a été utilisée dans la suite de nos travaux pour étudier les interactions hôtes-pathogènes, notamment entre les ostéoblastes ou les ostéoclastes et *S. aureus* et *S. epidermidis*.



A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells

Sophie Trouillet^{a,b,*}, Jean-Philippe Rasigade^{a,b}, Yannick Lhoste^{a,b}, Tristan Ferry^{a,c}, François Vandenesch^a, Jerome Etienne^a, Frederic Laurent^{a,b}

^a INSERM U851, National Reference Center for Staphylococci, University of Lyon, 8 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France

^b Department of Clinical Microbiology, Hospices Civils de Lyon, Northern Hospital Group, 103 Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France

^c Department of Infectious and Tropical Diseases, Hospices Civils de Lyon, Northern Hospital Group, 103 Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2011

Received in revised form 15 April 2011

Accepted 16 April 2011

Available online 27 April 2011

Keywords:

Bacterial adhesion

Bacterial fibronectin-binding proteins

Bacterial invasion

Flow cytometry

Host–pathogen interactions

Staphylococcus aureus

ABSTRACT

Flow cytometry is a powerful tool for analyzing the adhesion to and invasion of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) to eukaryotic cells. Established techniques have used bacteria that have been genetically modified to express fluorescent proteins or directly labeled with fluorochromes prior to infection. Such approaches are appropriate in most cases; however, the use of genetically or chemically altered bacteria could introduce a bias when measuring fine differences in adhesion and invasiveness. Here, we describe a combined flow cytometry-based invasion and adhesion assay that does not require the processing of bacteria prior to internalization. This method was performed on osteoblastic MG-63 cells infected with *S. aureus* reference strain 8325-4 and its invasion-deficient isogenic mutant, which carries deletions in the genes encoding fibronectin-binding proteins A and B. The data from this assay were compared to those obtained using the standard gentamicin protection assay. The results obtained by the two methods were consistent. Moreover, quantification of internalized bacteria was more reproducible using the flow cytometry-based assay than the gentamicin protection assay, which allowed for the simultaneous quantification of host cell adhesion and invasion.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is the leading cause of bone and joint infection (BJI) (Berendt and Byren, 2004). The successful cure of these infections is challenging due to frequent chronicization and relapse (Stevens et al., 2007). The recurrent nature of BJIs is related to the ability of *S. aureus* to invade and survive within host cells (Jevon et al., 1999). Initially, bacteria adhere to the cell membrane by means of several surface proteins, including a group of surface adhesins called microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) (Foster and Hook, 1998). Among these MSCRAMMs, the fibronectin-binding proteins (FnBPs) are necessary and sufficient for internalization of bacteria (Ahmed et al., 2001; Sinha

et al., 2000). Internalization is an active process with respect to the host cell and a passive process with respect to the bacteria (Ellington et al., 1999).

Several *in vitro* models have been developed to investigate the internalization process and to quantify membrane-bound and intracellular *S. aureus*. The widely used antibiotic protection assay relies on the specific protection of intracellular bacteria from membrane-impermeable antimicrobial agents and the quantification of live bacteria by plate counting after host cell lysis (Jevon et al., 1999; Wright and Friedland, 2004). Consequently, this method is time-consuming and lacks reproducibility. More recently, high-throughput methods that use flow cytometry have been proposed. However, the methods published to date have required that the bacteria be either genetically modified to express fluorescent proteins or chemically labeled prior to the experiment (Agerer et al., 2004; DeLoid et al., 2009; Pils et al., 2006).

Here, we describe a combined flow cytometry-based invasion and adhesion assay. To mimic the physiological conditions of bacteria–cell interactions, this assay does not require the processing of bacteria prior to internalization. This method was applied to *S. aureus* reference strain 8325-4 and its invasion-defective isogenic mutant DU5883, which has deletions in the genes encoding the fibronectin-binding proteins ($\Delta fnbA/B$), and the results were compared to the gentamicin protection assay.

Abbreviations: BJI, bone and joint infection; FCBA, flow cytometry based approach; GPA, gentamicin protection assay; VBFL, vancomycin-Bodipy FL.

* Corresponding author at: Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie Nord, Groupement Hospitalier Nord, INSERM U851, Centre National de Référence des Staphylocoques, 103, Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France. Tel.: +33 472 07 18 37; fax: +33 472 07 18 42.

E-mail addresses: trouillet sophie@aol.com (S. Trouillet), jean-philippe.rasigade@chu-lyon.fr (J.-P. Rasigade), yanlho@hotmail.com (Y. Lhoste), tristan.ferry@chu-lyon.fr (T. Ferry), francois.vandenesch@univ-lyon1.fr (F. Vandenesch), jerome.etienne@univ-lyon1.fr (J. Etienne), frederic.laurent@univ-lyon1.fr (F. Laurent).

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). Human MG-63 osteoblastic cells (LGC Standards, Teddington, UK) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine and 25 mM HEPES and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin and streptomycin (referred to here as culture medium). The cells were passaged twice a week up to passage 10 after being thawed from stock culture.

2.2. Bacterial isolates

Methicillin- and gentamicin-susceptible *S. aureus* reference strain 8325-4 and mutant strain DU5883 were a generous gift from Tim Foster (Greene et al., 1995). DU5883 is an isogenic mutant of strain 8325-4 with deletions in the *fnbA/B* genes. The bacteria were grown overnight in brain heart infusion broth. Before the internalization step, the bacteria were washed with DMEM and suspended in DMEM with 10% FBS.

2.3. Infection of MG-63 cells by *S. aureus*

MG-63 cells were seeded (50,000 cells/ml) into 24-well culture plates and incubated in culture medium at 37 °C in 5% CO₂ for 48 h until 80% confluence. Cells were washed twice with 1 ml of DMEM before the addition of bacteria at a multiplicity of infection (MOI) of approximately 50:1. Cell cultures were then incubated at 37 °C to allow for the adhesion and internalization of bacteria. After 2 h, cells were washed twice with 1 ml of DMEM, and unbound bacteria were discarded.

2.4. Flow cytometry-based assay (FCBA)

After the infection step, the cells used for the adhesion assay were trypsinized, washed twice in ice-cold phosphate buffer saline (PBS), and incubated in the dark with a 1:1 mixture of vancomycin and vancomycin-Bodipy FL® (VBFL) fluorochrome (Invitrogen) at a concentration of 0.8 µg/ml (100 µl/sample) for 15 min on ice (VBFL specifically binds the cell wall peptidoglycan of Gram-positive bacteria and does not penetrate intact cells).

After the infection step, the cells used for the invasion assay were incubated with 10 µg/ml of membrane-impermeable lysostaphin for 20 min to disrupt the extracellular bacteria. The intracellular bacteria were not disrupted. Then, the cells were washed, trypsinized and permeabilized on ice using 0.1% saponin in PBS for 20 min to allow for the cell penetration of VBFL. After a triple wash with ice-cold PBS, cells bearing intracellular bacteria were labeled with VBFL as described above. A subset of cells treated with lysostaphin without permeabilization was labeled with VBFL to serve as the negative control and to confirm the complete lysis of the extracellular bacteria.

After labeling, the cells for both adhesion and invasion assays were washed twice with PBS, fixed in 1% formal and stored at 4 °C prior to flow cytometry analysis.

The fixed samples were analyzed on a Canto II cytometer (Becton Dickinson) using the FL-1 channel to measure fluorescence intensity and the FSC/SSC stopping gate to exclude cellular debris and unbound bacteria (Fig. 1). The fluorescence intensity marker *M* was set to include less than 2% of the negative control (uninfected) cells. The total number of bacteria was estimated as the mean fluorescence intensity of cells in *M* multiplied by the proportion of cells in *M*. This measurement was expressed in arbitrary fluorescence units (AFUs) (Sinha et al., 1999). The data were represented as the mean ± standard deviation (SD) of four independent experiments performed in duplicate.

2.5. Gentamicin protection assay (GPA)

For the adhesion assay, infected cells were lysed using osmotic shock in pure sterile water with extensive pipetting immediately following the infection step. Viable adherent and internalized bacteria released after host cell lysis were enumerated by serial dilution and plate counting on agar plates.

For the internalization assay, cells were incubated after the infection step with 100 µg/ml gentamicin for 1 h to kill extracellular bacteria. The cells were then lysed, and viable bacteria were counted as described above. The data were represented as the mean ± standard deviation (SD) of four independent experiments performed in duplicate.

The coefficients of variation (CV%) of the results obtained using the FCBA and the GPA were calculated for comparative analysis.

2.6. Microscopic evaluation of extra- and intracellular bacteria

Two days before infection, MG-63 cells were seeded on glass coverslips at 50,000 cells/well in 24-well culture plates and incubated in culture medium at 37 °C in 5% CO₂. Then, cells were washed twice with DMEM and infected with *S. aureus* at a MOI of 10:1 for 2 h.

Then, glass coverslips for the adhesion assay were washed twice and cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min and incubated in the dark with 250 µl of a 1:1 mixture of vancomycin and vancomycin-Bodipy FL® (VBFL) fluorochrome (Invitrogen) at a 4 µg/ml concentration for 8 min. After a triple wash with ice-cold PBS, cells were permeabilized on ice using 0.05% Triton X100 for 15 min on ice. Cells were washed three times, and F-actin was stained using TRITC-conjugated rhodamine-phalloidin fluorescein (200 µl, 165 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at RT.

Cells for the invasion assay were incubated with 10 µg/ml of lysostaphin for 20 min to disrupt the extracellular bacteria. Then, they were washed twice, fixed and permeabilized as described in Section 2.4. Then, F-actin and intracellular bacteria were labeled as described above.

Finally, the cells for both adhesion and invasion assays were washed three times with PBS, fixed and coverslips were dried. Photos were taken using a Leica DFC 420 C digital camera. Fluorescence signals of labeled specimens were serially recorded with appropriate excitation and emission filters, to avoid bleed-through. Images were digitally processed with Photoshop 6.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

2.7. Statistical analysis

The differences in continuous variables were tested for statistical significance using Student's *t*-test without an equal variance assumption (Cochran-Cox method). The significance threshold was set at 0.05.

3. Results

3.1. Flow cytometry analysis

The adhesion to and the internalization by MG-63 cells of *S. aureus* strain 8325-4 and its isogenic mutant DU5883 ($\Delta fnbA/B$) were compared by flow cytometry after selective VBFL-labeling of bacteria. The adhesion AFUs for strains 8325-4 and DU5883 were 4.07 ± 1.35 and 0.93 ± 0.27 , respectively ($p < 0.001$), whereas the invasion AFUs were 8.21 ± 2.4 and 0.2 ± 0.13 , respectively ($p < 0.001$). The background fluorescence controls (uninfected cells) for the adhesion and invasion assays were low (AFU = 0.07 ± 0.03 and 0.07 ± 0.01 , respectively). This finding demonstrates the specificity of VBFL for bacterial peptidoglycan. The efficient disruption of extracellular bacteria by lysostaphin treatment was confirmed by the absence of fluorescence staining outside of control cells for both strains (AFU = 0.65 ± 0.25 and 0.09 ± 0.06 for strains 8325-4 and DU5883, respectively). To allow comparisons to the data obtained using the GPA, the results

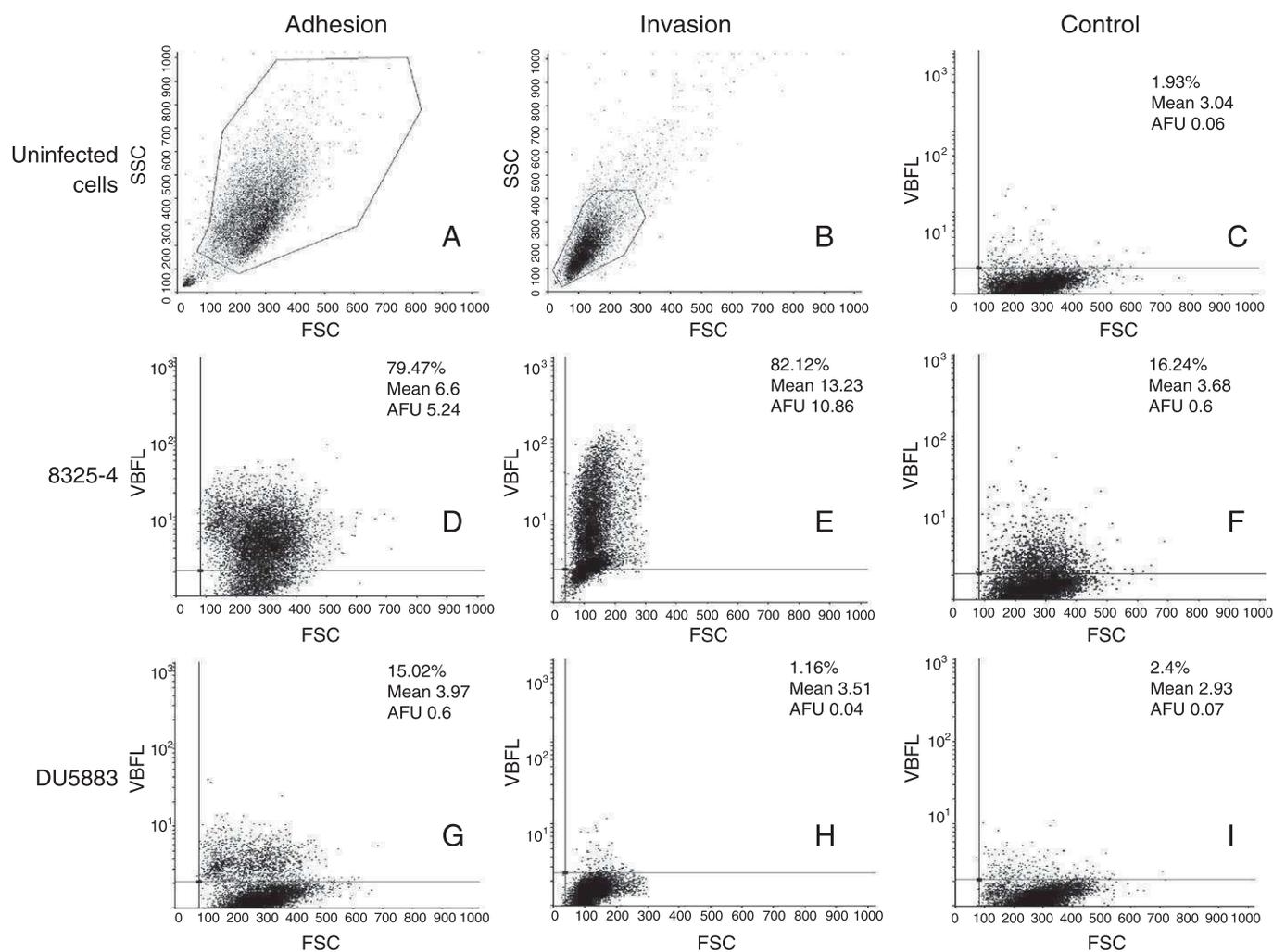


Fig. 1. Flow cytometry quantification of adhesion to and invasion of MG-63 cells by *S. aureus* strain 8325-4 and its invasion-defective isogenic mutant DU5883 ($\Delta fnbA/B$). The results are presented as the original dot plots of a representative experiment. Flow cytometry analysis was performed using an FSC/SSC stopping gate with untreated, uninfected cells (A, adhesion assay) or uninfected cells permeabilized by saponin (B, invasion assay). The fluorescence intensity marker *M* was set to include <2% of uninfected cells (C). The values in each panel are the percentage of cells in *M*, the mean fluorescence of cells in *M*, and the arbitrary fluorescence unit (AFU) value that corresponds to the multiplication of the two previous parameters. For the adhesion assay, extracellular bacteria were labeled using the membrane-impermeable fluorochrome vancomycin-Bodipy FL (VBFL) (D, G). For the invasion assay, extracellular bacteria were disrupted by lysostaphin treatment, cells were permeabilized by saponin and intracellular bacteria were labeled with VBFL (E, H). The infected cells that were treated with lysostaphin without permeabilization and labeled with VBFL served as a negative control and confirmed the disruption of extracellular bacteria (F, I).

were also expressed as percentages of AFUs obtained for strain 8325-4 (Fig. 2).

3.2. Gentamicin protection assay

The results of the GPA were expressed as percentages of colony-forming units (CFUs) per well recovered for strain 8325-4 (Fig. 2). The adhesion level of strain DU5883 was $52.1 \pm 20.4\%$, $p < 0.01$, whereas the invasion level of the same strain was virtually abolished ($0.4 \pm 0.4\%$, $p < 0.001$).

3.3. Microscopic evaluation of extra- and intracellular bacteria

Fixed samples were labeled with VBFL and examined microscopically to confirm results obtained with flow cytometry. After infection step, adherent staphylococci were extracellularly observed (arrow, Fig. 3). In agreement with flow cytometry, after lysostaphin incubation, extracellular staphylococci were disrupted, and no adherent bacteria were detectable. Finally, after lysostaphin incuba-

tion and permeabilization, the inspection of infected samples showed the presence of intracellular bacteria (arrowhead, Fig. 3).

4. Discussion

Robust and time-efficient methods for quantifying staphylococcal adhesion to and internalization by host cells are crucially needed in the research field of host–pathogen interactions. The flow cytometry-based assay presented here provides a new tool for simultaneously assessing the adhesion and invasion properties of unprocessed *S. aureus* in an *ex vivo* cell culture model. We used the fluorescent vancomycin derivative VBFL, which specifically binds to the cell wall of Gram-positive bacteria, to label membrane-bound and internalized *S. aureus* in less than 15 min.

Previous reports have established that either FnBP A or B is required for *S. aureus* host cell invasion (Sinha et al., 2000). Thus, the use of an isogenic couple of *S. aureus* strains (8325-4 and DU5883 [$\Delta fnbA/B$]) allowed us to assess the specificity of the FCBA method for both adhesion and invasion. The differences in the adhesion and invasion levels of this isogenic couple were in agreement with

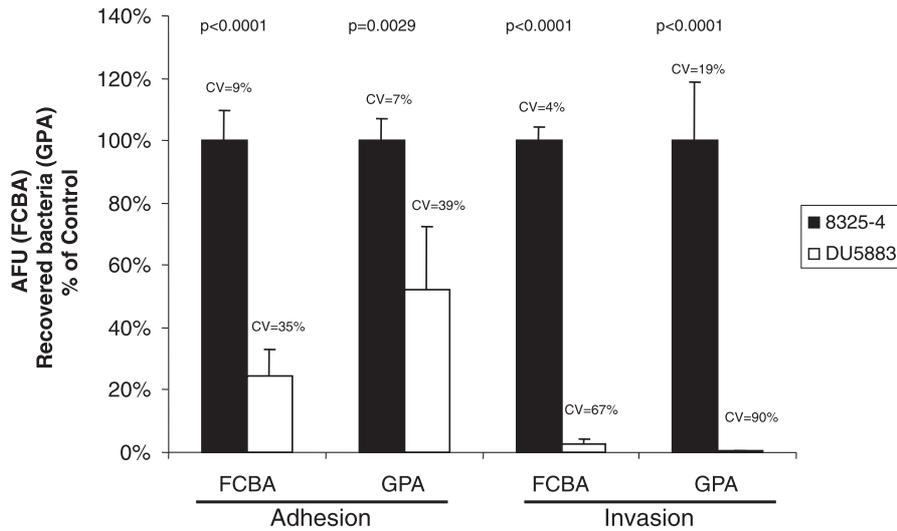


Fig. 2. Comparison of the adhesion and invasion levels of *S. aureus* strain 8325-4 and its invasion-defective isogenic mutant DU5883. Adhesion and invasion into MG-63 cells were quantified using either the flow cytometry-based assay (FCBA) or the gentamicin protection assay (GPA). Means \pm SD of arbitrary fluorescence units (AFUs) measured using FCBA, and CFUs per well measured using GPA, were expressed as percentages of values obtained for strain 8325-4, derived from four independent experiments performed in duplicate. Coefficients of variation (CV%) were calculated to compare the reproducibility of the two methods.

previously published results and reached statistical significance (Sinha et al., 1999). The results obtained using the FCBA were also consistent with the results obtained using the widely used GPA. Two major observations emerged from the comparison between the FCBA and GPA results on a comparable ratio scale (Fig. 2). First, although the FCBA exhibited similar reproducibility to the GPA in terms of CV% for the adhesion assay, this reproducibility was appreciably improved with respect to the invasion assay. The FCBA offers an opportunity to be more discriminative when comparing *S. aureus* isolates or populations. Second, differences in adhesion between strain 8325-4 and its weakly adherent mutant were emphasized by comparing the FCBA to the GPA. A likely explanation for this is that weakly bound bacteria are more efficiently removed from the host cell surface during the centrifugation steps performed on the suspended cells used in the FCBA than during the cell monolayer washing procedure used in the GPA.

The updated flow cytometric approach described here presents several advantages. In contrast to methods using genetically modified or pre-labeled bacteria, the FCBA uses post-adhesion and post-invasion processing of bacteria; thus, the FCBA avoids potential biases related to interference with bacterial viability and the physiological state during the infection process. Moreover, the FCBA allows for a rapid and simultaneous quantitative analysis of extracellular (adhesion) and intracellular (invasion) bacteria. A similar analysis is not possible when using genetically modified or pre-labeled bacteria. Although the fluorescent signal of extracellular bacteria can be selectively attenuated by the use of a membrane-impermeable fluorescence quencher, such as trypan blue, there is no method described to date that allows specific quenching of intracellular bacteria. Moreover, the method presented here could potentially be applied to other eukaryotic cell models and Gram-positive bacteria on the basis of the high specific binding of vancomycin to bacterial peptidoglycan.

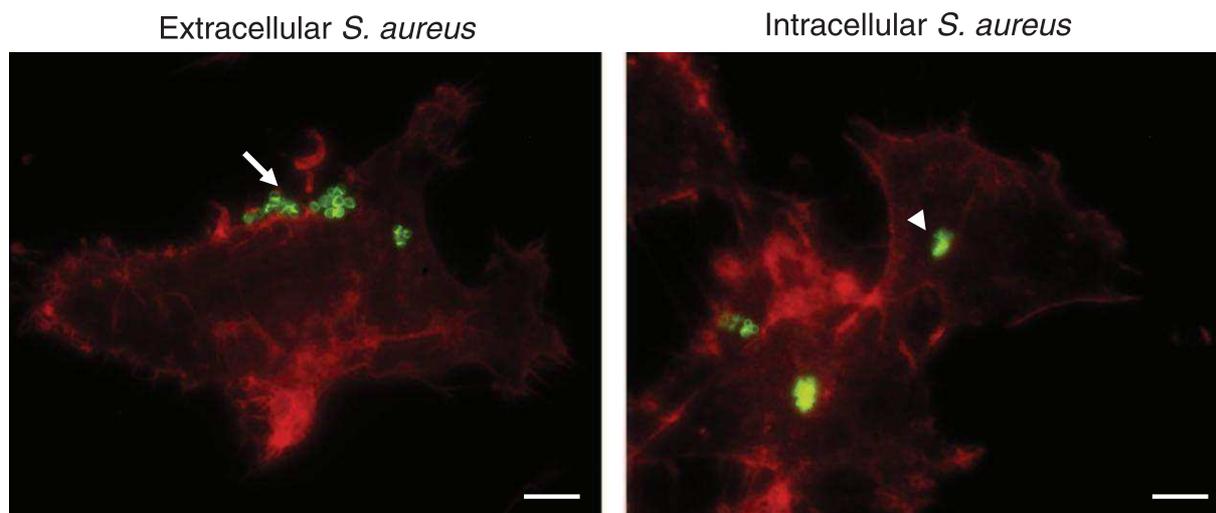


Fig. 3. Microscopic evaluation of extra- and intracellular *S. aureus*. MG-63 cells were infected with *S. aureus* reference strain 8325-4 for 2 h at a MOI of 10:1. For the adhesion assay, extracellular bacteria (arrow) were labeled using the membrane-impermeable fluorochrome vancomycin-Bodipy FL (VBFL). For the invasion assay, extracellular bacteria were disrupted by lysostaphin treatment, cells were permeabilized by Triton 0.05% and intracellular bacteria (arrowhead) were labeled with VBFL. The actin cytoskeleton of the cells was counterstained using phalloidin-red. Bars represent 10 μ m.

Two limitations of the FCBA approach should be acknowledged. Bacteria used for the invasion assay must be completely disrupted (not only killed) by a membrane-impermeable compound that does not affect the host cell. We successfully used the endopeptidase lysostaphin to disrupt *S. aureus*. However, lysostaphin susceptibility has been shown to be modulated by various factors: i) culture media that can influence capsular polysaccharide production (Dassy et al., 1991; Stringfellow et al., 1991); ii) mutations affecting *femA*, a gene responsible for the addition of the second and third glycines to the pentaglycine cross-bridges in peptidoglycan (Kusuma et al., 2007); and iii) the acquisition of the endopeptidase resistant gene (*epr*) that results in lysostaphin resistance due to the substitution of serine for glycine in the pentaglycine cross-bridges (Dehart et al., 1995). All of these features might limit the panel of staphylococcal isolates that could be studied for invasion. The second limitation of the FCBA is that the AFU values obtained from the same isolate in the adhesion and invasion assays are independent because these values are obtained in separate wells. Thus, AFU values cannot be compared as CFU/well values are compared in the GPA.

5. Conclusions

This novel FCBA approach maintains the advantages of previously described cytometry-based invasion assays in terms of reproducibility and cost- and time-efficiency. This approach also introduces two additional features: the use of live and unprocessed bacteria during the infection step and the simultaneous quantification of host cell adhesion and invasion. Therefore, the FCBA method should be a useful addition to the evolving research field of *S. aureus*–host cell interactions.

Potential conflicts of interest

All the authors report no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank P. Tarquis and M. Chetail for their technical assistance.

References

- Agerer, F., Waeckerle, S., Hauck, C.R., 2004. Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. *J. Microbiol. Methods* 59, 23–32.
- Ahmed, S., M.S., Williams, R.J., Henderson, B., Brock, J.H., Nair, S.P., 2001. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69, 2872–2877.
- Berendt, T., Byren, I., 2004. Bone and joint infection. *Clin. Med.* 4, 510–518.
- Dassy, B., Stringfellow, W.T., Lieb, M., Fournier, J.M., 1991. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1155–1162.
- Dehart, H.P., Heath, H.E., Heath, L.S., Leblanc, P.A., Sloan, G.L., 1995. The lysostaphin endopeptidase resistance gene (*epr*) specifies modification of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2811.
- DeLoid, G.M., Sulahian, T.H., Imrich, A., Kobzik, L., 2009. Heterogeneity in macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* strains: high-throughput scanning cytometry-based analysis. *PLoS One* 4, e6209.
- Ellington, J.K., Reilly, S.S., Ramp, W.K., Smeltzer, M.S., Kellam, J.F., Hudson, M.C., 1999. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 26, 317–323.
- Foster, T.J., Hook, M., 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6, 484–488.
- Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P., Lew, D., Foster, T., 1995. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* 17, 1143–1152.
- Jevon, M., Guo, C., Ma, B., Mordan, N., Nair, S.P., Harris, M., Henderson, B., Bentley, G., Meghji, S., 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect. Immun.* 67, 2677–2681.
- Kusuma, C., Jadanova, A., Chanturiya, T., Kokai-Kun, J.F., 2007. Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51, 475–482.
- Pils, S., Schmitter, T., Neske, F., Hauck, C.R., 2006. Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 65, 301–310.
- Sinha, B., Francois, P., Nube, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M., Krause, K.H., 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell. Microbiol.* 1, 101–107.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y.A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K.H., Peters, G., Herrmann, M., 2000. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.* 68, 6871–6878.
- Stevens, Q.E., Seibly, J.M., Chen, Y.H., Dickerman, R.D., Noel, J., Kattner, K.A., 2007. Reactivation of dormant lumbar methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis after 12 years. *J. Clin. Neurosci.* 14, 585–589.
- Stringfellow, W.T., Dassy, B., Lieb, M., Fournier, J.M., 1991. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 618–621.
- Wright, K.M., Friedland, J.S., 2004. Regulation of chemokine gene expression and secretion in *Staphylococcus aureus*-infected osteoblasts. *Microbes. Infect.* 6, 844–852.

DEUXIEME PUBLICATION :

Staphylococcus epidermidis in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation

Longtemps considéré comme un simple commensal universel de la peau et des muqueuses, *S. epidermidis* est un staphylocoque à coagulase négative désormais reconnu comme un pathogène opportuniste majeur, notamment responsable d'infections nosocomiales et/ou sur matériel étranger. Ces staphylocoques à coagulase négative, et en particulier *S. epidermidis*, sont ainsi responsables de 30 à 43% des IOA sur matériel orthopédique, devançant même *S. aureus* en termes de fréquence dans certaines séries.

Etonnement, très peu de données sont disponibles sur la physiopathologie des IOA à *S. epidermidis*. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux IOA sur matériel à *S. epidermidis* qui sont aujourd'hui principalement expliquées par l'inoculation bactérienne, lors de la chirurgie, de souches de portage du patient. Or, si le portage de *S. epidermidis* est décrit comme universel, les infections sur matériel orthopédique restent peu fréquentes. En dehors du rôle indéniable des facteurs liés à l'hôte (immunodépression par exemple) ou à l'environnement (non-respect d'une asepsie chirurgicale stricte notamment), la question de l'expression de facteurs bactériens chez certaines souches commensales favorisant la survenue des IOA sur matériel paraît légitime. Les souches de *S. epidermidis* responsables d'IOA pourraient alors représenter une sous-population particulière au sein des souches de portage, que l'on pourrait distinguer par la présence de caractères de virulence particuliers.

De plus, certaines données suggèrent que ce pathogène possède des propriétés communes avec *S. aureus*. En effet, de nombreux travaux ont démontré que *S. epidermidis* est parfaitement adapté à la formation et à la survie au sein de biofilm. Comme *S. aureus*, il possède de nombreuses protéines d'adhésions spécifiques (MSCRAMMs), impliquées dans l'adhésion aux cellules eucaryotes. Enfin, la capacité d'internalisation de *S. epidermidis* dans

des cellules non phagocytaires a été montrée avec les cellules épithéliales mammaires bovines et les cellules endothéliales humaines.

L'objectif de ce travail a ainsi été de comparer deux populations de *S. epidermidis*, l'une regroupant des souches responsables d'IOA et la seconde des souches de portage nasal, vis-à-vis de deux de ces caractères de virulence que sont les capacités d'internalisation dans les ostéoblastes humains et de formation de biofilm. Les capacités d'internalisation des souches ont été mesurées dans un modèle *in vitro* d'infection staphylococcique dans des ostéoblastes par la technique de « gentamicin protection assay » et par la méthode de cytométrie en flux décrite dans la première publication présentée dans cette thèse. Les capacités de formation de biofilm, quant à elles, ont été mesurées par la technique de biofilm ring testTM, commercialisée par Biofilm Control®. De plus, en incluant une souche de contrôle de *S. aureus* dans ces modèles expérimentaux, nous avons exploré si les mécanismes physiopathologiques connus chez *S. aureus* lors d'IOA étaient également retrouvés chez *S. epidermidis*.

Notre étude représente par ailleurs la première évaluation de la capacité d'interaction d'une large collection de souches cliniques de *S. epidermidis* responsables d'IOA avec les ostéoblastes.

Le premier résultat apporté par ce travail est l'impossibilité de discriminer les souches de *S. epidermidis* commensales et invasives sur la base de leurs capacités d'internalisation au sein des ostéoblastes et de formation de biofilm. Nos résultats sont concordants avec ceux rapportés par plusieurs études qui se sont intéressées à cette question, sans pouvoir mettre en évidence de facteur génotypique clairement associé au pouvoir invasif de certaines souches de portage. L'utilisation de marqueurs phénotypiques associés aux IOA (internalisation par les ostéoblastes et formation de biofilm) n'a pas été plus discriminante. Ces résultats renforcent donc l'hypothèse de certains auteurs selon laquelle l'infection à *S. epidermidis* constitue un évènement accidentel survenant à partir de souches appartenant à la flore commensale, les souches de portage et invasives constituant une seule entité microbiologique.

Enfin, nous avons mis en évidence un très faible taux d'internalisation dans les cellules osseuses de l'ensemble des souches testées, par rapport à ce que nous avons pu observer pour *S. aureus*. Ce résultat suggère une importance moindre de ce mécanisme physiopathologique dans les IOA à *S. epidermidis* par rapport à *S. aureus*.

Staphylococcus epidermidis in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation

Florent Valour^{1,2,3*}, Sophie Trouillet-Assant^{1,2}, Jean-Philippe Rasigade^{1,2}, Sébastien Lustig^{1,4,7}, Emmanuel Chanard⁵, Hélène Meugnier^{6,7}, Sylvestre Tigaud², François Vandenesch^{1,6,7,8}, Jérome Etienne^{1,6,7,8}, Tristan Ferry^{1,3,7}, Frédéric Laurent^{1,2,7,8}, on behalf of the Lyon BJI Study Group[¶]

1 INSERM U1111, International Center for Research in Infectiology, Lyon, France, **2** Laboratory of Bacteriology, North Lyon University Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **3** Infectious Diseases Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **4** Orthopedic Surgery Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **5** Laboratory of Bacteriology, Nov  cia, Lyon, France, **6** Laboratory of Bacteriology, East Lyon University Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **7** Claude Bernard University, Lyon, France, **8** French National Reference Center for Staphylococci, Lyon, France

Abstract

Background: *Staphylococcus epidermidis* orthopedic device infections are caused by direct inoculation of commensal flora during surgery and remain rare, although *S. epidermidis* carriage is likely universal. We wondered whether *S. epidermidis* orthopedic device infection strains might constitute a sub-population of commensal isolates with specific virulence ability. Biofilm formation and invasion of osteoblasts by *S. aureus* contribute to bone and joint infection recurrence by protecting bacteria from the host-immune system and most antibiotics. We aimed to determine whether *S. epidermidis* orthopedic device infection isolates could be distinguished from commensal strains by their ability to invade osteoblasts and form biofilms.

Materials and Methods: Orthopedic device infection *S. epidermidis* strains (n = 15) were compared to nasal carriage isolates (n = 22). Osteoblast invasion was evaluated in an *ex vivo* infection model using MG63 osteoblastic cells co-cultured for 2 hours with bacteria. Adhesion of *S. epidermidis* to osteoblasts was explored by a flow cytometric approach, and internalized bacteria were quantified by plating cell lysates after selective killing of extra-cellular bacteria with gentamicin. Early and mature biofilm formations were evaluated by a crystal violet microtitration plate assay and the Biofilm Ring Test method.

Results: No difference was observed between commensal and infective strains in their ability to invade osteoblasts (internalization rate 308+/-631 and 347+/-431 CFU/well, respectively). This low internalization rate correlated with a low ability to adhere to osteoblasts. No difference was observed for biofilm formation between the two groups.

Conclusion: Osteoblast invasion and biofilm formation levels failed to distinguish *S. epidermidis* orthopedic device infection strains from commensal isolates. This study provides the first assessment of the interaction between *S. epidermidis* strains isolated from orthopedic device infections and osteoblasts, and suggests that bone cell invasion is not a major pathophysiological mechanism in *S. epidermidis* orthopedic device infections, contrary to what is observed for *S. aureus*.

Citation: Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade J-P, Lustig S, Chanard E, et al. (2013) *Staphylococcus epidermidis* in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation. PLoS ONE 8(6): e67240. doi:10.1371/journal.pone.0067240

Editor: Stefan Bereswill, Charit  -University Medicine Berlin, Germany

Received: April 3, 2013; **Accepted:** May 15, 2013; **Published:** June 28, 2013

Copyright:    2013 Valour et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: florent.valour@chu-lyon.fr

¶ Membership of the Lyon BJI Study Group is provided in the Acknowledgments.

Introduction

Staphylococcus epidermidis, coagulase-negative staphylococci, have been considered innocuous commensals of human skin and mucous membranes but are now accepted as the leading opportunistic pathogens responsible for numerous nosocomial infections [1]. In particular, they account for 30 to 43% of joint prosthesis infections [2]. The current accepted pathophysiological mechanism of *S. epidermidis* orthopedic device infection is the direct inoculation of skin colonizing strains at the time of surgery [2–4].

The contrast between the low incidence of *S. epidermidis* orthopedic device infection and the highly prevalent *S. epidermidis* carriage suggests that *S. epidermidis* bone and joint infections might either correspond to accidental events due to colonizing strains or to a specific, more virulent sub-population of commensal isolates. The existence of such specificity could be crucial because it may impact the prevention and management of these severe infections. The ability of a commensal pathogen to cause chronic diseases that are difficult to treat suggests that these infections are

attributable to the ability of this organism to escape the immune system and antibiotic therapy [1,5].

Two predominant mechanisms have been proposed to be implicated in orthopedic device infections: i) bacterial invasion and persistence within non-professional phagocytes such as osteoblasts, as previously demonstrated for *S. aureus* [6], and ii) the ability of bacteria to form biofilms [7–10]. The aim of the present study was to determine if *S. epidermidis* strains implicated in orthopedic device bone and joint infections can be distinguished from colonizing ones on the basis of these proposed mechanisms. We assayed 22 nasal carriage *S. epidermidis* strains and 15 bone-infective isolates in *ex vivo* models of human osteoblast infection and biofilm formation assays. This study received the approval of the French South-East ethics committee.

Materials and Methods

Ethical Statement

This study received the approval of the French South-East ethics committee, with the reference number 2013-018. In accordance with the French legislation, written informed patient consent was not required for any part of the study, and especially for the human primary osteoblasts collection.

Bacterial Strains

We analyzed all *S. epidermidis*-positive bacteriological samples collected in the orthopedic department of our institution between 2001 and 2011. Twenty-four strains that contributed to mono-microbial orthopedic device infections (i.e., clinical evidence of infection and at least 2 deep bacteriological *S. epidermidis*-positive samples [2]) were considered for inclusion. For technical reasons, gentamicin-resistant strains were excluded ($n=9$); thus, 15 clinical orthopedic device infection isolates were included in the study (total hip prosthesis ($n=5$), total knee prosthesis ($n=6$), intramedullar osteosynthesis device ($n=4$)). Thirty-three *S. epidermidis* colonizing isolates were selected from the staphylococcal strains collected from nasal swabs of patients at admission in the orthopedic surgery unit from June to December 2010. After exclusion of gentamicin-resistant strains, 22 commensal isolates were analyzed in this study. Identification of all *S. epidermidis* isolates was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) as previously described [11].

The nasal colonizing *S. epidermidis* NCTC11047 strain, previously evaluated in a similar bone cell infection model [12], was used as a control in each experiment. The *S. aureus* 8325-4 laboratory strain, which has been well characterized in its ability to invade osteoblasts [13], was used as a control in each osteoblast infection experiment. Prior to performing the assays, *S. epidermidis* cells were grown overnight (18 h) in a brain heart infusion (BHI) (AES, Bruz, France) aerobically at 36.5°C. Five hundred microliters of this suspension were transferred in a sterile BHI and grown for 3 h aerobically at 36.5°C to obtain log-phase cultures. Bacteria were harvested by centrifugation and suspended in an assay medium. Suspensions were standardized on the basis of optical density at 600 nm (OD_{600}) using a photometric regression formula established in preliminary experiments (data not shown): $CFU/mL = 7 \cdot 10^8 \times OD_{600} - 10^8$ for *S. epidermidis* and $CFU/mL = 7 \cdot 10^8 \times OD_{600} - 3 \cdot 10^7$ for *S. aureus*.

Human Osteoblast Culture

All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). The human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427), which was purchased from LGC standard (USA), was

routinely cultured in growth medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FBS) and contained 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin ("growth medium with antibiotics"). Cells were passaged twice a week and were used in experiments up to passage 20 after being thawed from a stock culture.

Primary human osteoblasts were isolated from non-infected patients and sampled during routine hip surgery. Bone specimens were collected on the day of surgery in phosphate-buffered saline (PBS, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) containing penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) and processed the same day. Excess blood and soft tissue were removed with a scalpel aided by several PBS rinses. Samples were cut into fragments of 1 to 2 mm³ and cultured in routine growth medium with antibiotics and supplemented with 50 µg/mL of ascorbic acid (Sigma Aldrich, St Louis, USA). The medium was thereafter changed once a week until cells became confluent. Osteoblasts were characterized by an osteocalcin assay, frozen, and used only once upon thawing.

Invasion of Osteoblasts by *S. epidermidis* Using a Gentamicin Protection Assay (Fig. 1)

Osteoblasts were seeded at 40,000 cells per well into 24-well tissue cultures plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 1 mL of growth medium with antibiotics and cultured for 2 days until 70 to 80% confluence. Cells were washed twice with 1 mL of DMEM before the addition of bacteria. Bacterial suspensions in growth medium without antibiotics were added to the bone cell culture wells at a multiplicity of infection (MOI) of 500:1 for *S. epidermidis* and 100:1 for *S. aureus*. After 2 h of co-culture of bacteria and osteoblasts in a 37°C/5% CO₂ incubator, cell cultures were washed twice with 1 mL DMEM and incubated 1 hour with growth medium supplemented with 200 µg/mL gentamicin (PAA, Pasching, Austria) to kill the remaining extracellular staphylococcal cells. One hundred microliters of each culture supernatant were plated onto tryptic soy agar plates (TSA, Oxoid, Dardilly, France) to confirm the absence of living extracellular bacteria. Osteoblast cultures were washed twice with DMEM and subsequently lysed by a 10-minute incubation period with sterile purified water. To quantify internalized bacteria, suspension dilutions of cell lysates were plated in duplicate on TSA plates followed by an overnight incubation at 37°C.

Adhesion of *S. epidermidis* to Osteoblasts (Fig. 1)

Staphylococcus epidermidis adhesion to osteoblasts was assessed using a flow cytometry-based assay as previously described [13]. Three colonizing and three infective *S. epidermidis* strains were randomly selected and tested in addition to *S. epidermidis* NCTC11047 and *S. aureus* 8325-4 strains, which were used as controls. Briefly, after 2 h of bacterial co-culture (MOI of 500:1 and 100:1 for *S. epidermidis* and *S. aureus*, respectively), osteoblasts were washed twice with DMEM, harvested from the plates using a 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO, Paisley, United Kingdom) treatment for 2 min at 37°C, and washed twice with ice-cold PBS. Then, they were incubated on ice and in the dark for 15 min with a 1:1 mixture of vancomycin and BODIPY FL vancomycin (Invitrogen, Grand Island, USA) at a concentration of 0.8 µg/mL, which targets the bacterial peptidoglycan and cannot penetrate intact cells. After labeling, cells were washed twice with PBS and fixed in 1% formaldehyde (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Flow cytometry analysis was performed with a Canto II cytometer (Becton Dickinson) using the FL-1 channel to measure the fluorescence intensity and the FSC/SCC stopping gate to exclude

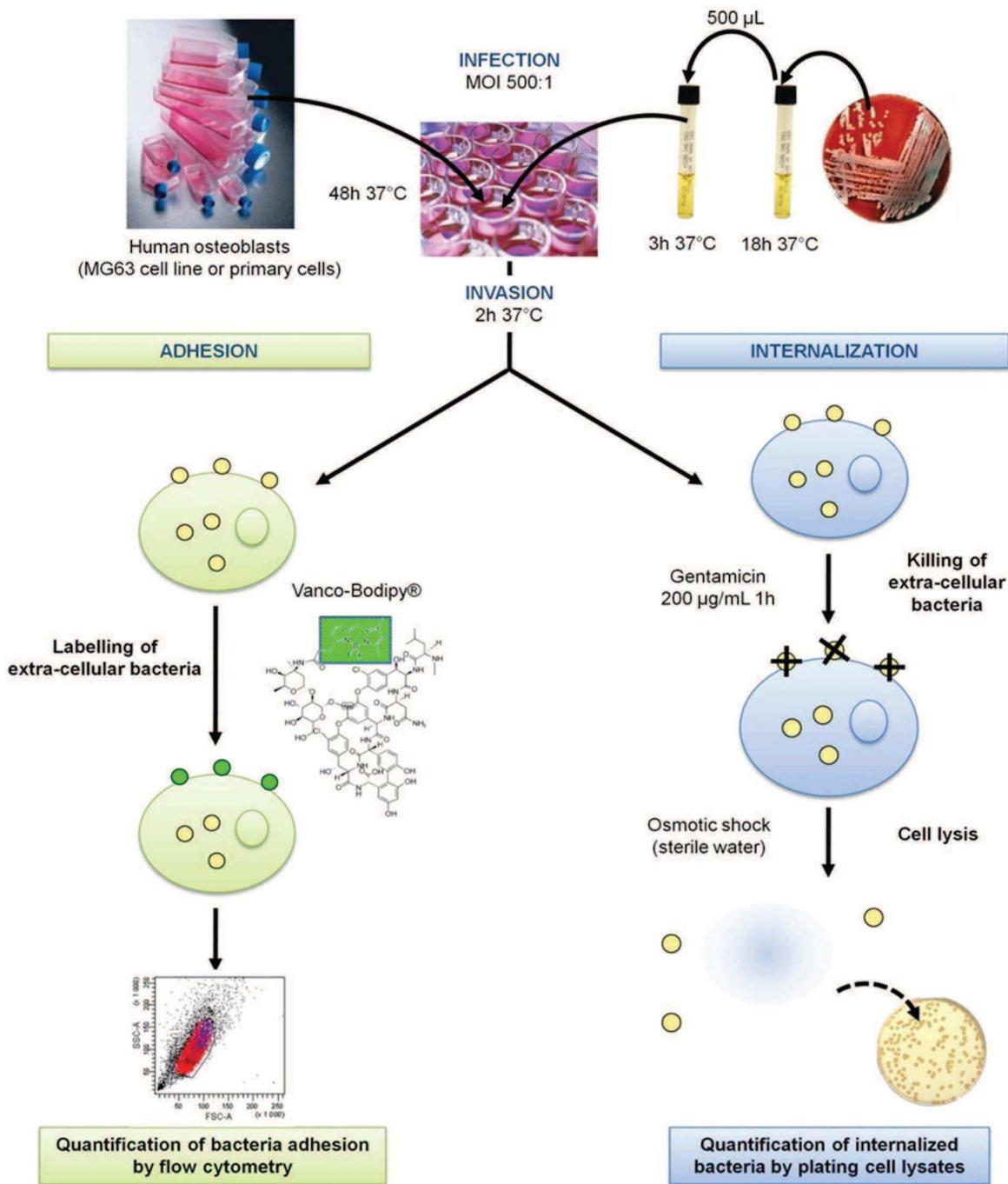


Figure 1. Gentamicin protection assay. MOI: Multiplicity of infection. doi:10.1371/journal.pone.0067240.g001

cellular debris and unbound bacteria. The fluorescence intensity marker (M) was set to include less than 2% of uninfected cells (negative control). The total number of bacteria was estimated as the mean fluorescence intensity of cells in M multiplied by the proportion of cells in M, which is represented in arbitrary fluorescence units (AFU) [13].

***S. epidermidis* Biofilm Formation**

Biofilm formation was evaluated by a tissue culture plate method using crystal violet, which allows for a semi-quantitative measurement of mature biofilms [14]. After adjusting the OD₆₀₀ of overnight bacterial suspensions at 1+/-0.05, they were diluted 1:100 in sterile BHI, and 100 µL of bacterial suspension were seeded in 96-well flat bottom plates (Becton Dickinson). Four wells were used for each isolate. Negative control wells contained BHI alone.

After 24 and 48 h of growth at 37°C, the contents of each well were gently removed, and the wells were washed three times with water to suppress the free-floating bacteria. Biofilms formed by adherent bacteria were fixed with 100 µL of 99% methanol (VWR International, Briare, France) per well for 20 min and air dried for 1 h under a chemical hood. Fixed bacteria were colored with 100 µL of 0.1% crystal violet (Merck, Fontenay-sous-bois, France) per well for 10 min, and excess stain was rinsed off by washing five times with water before air-drying. Dye bound to the biofilm was resolubilized with 100 µL of 33% acetic acid (VWR International) per well. The OD₄₉₀ was measured in each well with a micro ELISA Auto Reader, Model 680 (BioRad, Hercules, USA). Tests were performed in triplicate, and an average OD₄₉₀ value was calculated for each strain and for the negative controls. Finally, the OD₄₉₀ value of the tested strain was expressed as an average OD₄₉₀ value of the tested strain normalized to the control OD₄₉₀ value.

The ability to form biofilms was also explored using the BioFilm Ring test (BioFilm Control, Saint Beauzire, France), as described by Chavant et al [15]. Briefly, this technique includes the immobilization of magnetic beads embedded in bacterial aggregates following biofilm formation. After adjusting the OD₆₀₀ of overnight bacterial suspensions at 1+/-0.05, the suspensions were diluted 1:250 in fresh BHI and mixed with 1% of tonner solution corresponding to a magnetic bead suspension. The mixtures were homogenized, and 200 µL were deposited in each well of a 96-well microplate (12 8-well polystyrene strips). Each strain was cultured in duplicate. Every 2 h for 24 h, wells of one plate were covered with 100 µL of contrast solution (white opaque oil). The entire strip was placed for 1 min on a dedicated block test (magnet support) for magnetization contact and scanned with the plate reader to obtain an image for each well. During magnetization contact, free beads were attracted to the center of the bottom of wells and formed a spot, but beads blocked within the biofilm remain in suspension. The BioFilm Control software (BioFilm Elements) analyzes the images of each well before and after magnetization and calculates a value termed the BioFilm Index (BFI). Each observed BFI (BFI_o) was normalized to a proportion of immobilized beads (RBI for Relative Bead Immobilization) compared with controls with (BFI_{reference}) and without (BFI_{minimal}) beads using the following formula: $RBI = [(BFI_{reference} - BFI_o) / (BFI_{reference} - BFI_{minimal})]^{0.5}$.

Molecular Characterization by Pulsed-field Gel Electrophoresis

Staphylococcus epidermidis isolates were submitted to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis to assess their genetic diversity. Genomic DNA was extracted from log-phase cultures grown for 2 h in BHI broth, prepared in low-melting point agarose plugs (InCert agarose, Lonza, Basel, Switzerland) and digested with the endonuclease *Sma*I (Roche, Rosny-sous-bois, France). DNA fragments were resolved on a 1% agarose gel (SeaKem agarose, Lonza, Basel, Switzerland) with a contour-clamped homogeneous electric field apparatus GenePath (BioRad, Marnes-la-coquette, France) at 6 V/cm with switching times ramped from 5 to 35 s for 20 h at 14°C. Gels were stained with Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, USA). PFGE profiles and phylogenetic analysis were performed with the GelCompar II software included in Bionumerics from Applied Maths (Kortrijk, Belgium). A dendrogram was generated using the Pearson correlation coefficient and by clustering using the unweighted pair group method analysis (UPGMA) with average linkages at a maximum position tolerance of 2%. The PFGE profiles were interpreted according to the criteria of Tenover et al. Isolates with DNA fingerprints differing

by more than three bands and a similarity of less than 80% provided by the dendrogram analysis were interpreted as different PFGE types.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were used to estimate the frequencies of the study variables, which are described as the means and standard deviations. Differences between colonizing and infective strains were analyzed using the Mann-Whitney U tests, except for the Biofilm Ring test kinetic of biofilm formation, which was assessed by a two-way ANOVA test. A value of p<0.05 was significant. All analyses were performed using XLSTAT v.2011.1.02 (Addinsoft).

Results

Internalization of *S. epidermidis* in Human Osteoblasts

MG63 osteoblasts were infected with increasing MOIs of the reference strain NCTC11047 (fig. 2A), and the results demonstrated that the number of bacteria that are internalized was MOI-dependent, where more *S. epidermidis* was internalized when the MOI rose from 250:1 to 500:1. Based on these results, the MOI of 500:1 was chosen for all further invasion experiments. The ability of each of the clinical *S. epidermidis* strains to invade MG63 osteoblasts was evaluated in triplicate using a gentamicin protection assay. No difference in the osteoblast invasion rate was observed between colonizing and orthopedic device infection strains, where the numbers of internalized bacteria were 308+/-631 and 347+/-431 CFU/well, respectively, corresponding to 0.0008+/-0.0013% and 0.0004+/-0.0005% of the inoculums (p = 0.973) (fig. 2B). The internalization rate of the reference strain *S. epidermidis* NCTC11047 was estimated at 5165+/-2748 CFU/well (0.013+/-0.009% of the inoculums). The internalization rate of *S. aureus* 8325-4 was estimated at 0.37+/-0.20% of the inoculums.

To exclude a bias due to a "cell line effect", this low internalization rate of *S. epidermidis* in MG63 cells was confirmed using primary bone cells by testing the invasion ability of the reference strain NCTC11047 (0.0018+/-0.002%) and a randomly-chosen clinical strain (0.0001+/-0.0002%) (fig. 2C).

Adhesion of *S. epidermidis* to Human Osteoblasts

Given the low rate of invasion observed for *S. epidermidis* and that adhesion is a prerequisite for internalization, we assessed the ability of six randomly selected *S. epidermidis* clinical strains to adhere to MG63 osteoblasts. *S. epidermidis* NCTC11047 and *S. aureus* 8325-4 were used as controls (fig. 3 and 4). The AFU for the NCTC11047 reference strain and clinical strains were 3.38+/-1.1 and 6.04+/-3.8, respectively, corresponding to 4.5% +/-1.3% and 6.7% +/-3.4% of cells bearing bacteria. No significant differences between nasal colonizing (n=3) and infective (n=3) strains were observed (p = 0.513). For comparison, the AFU obtained for *S. aureus* was higher at 158.5+/-4.93, corresponding to 61.7% of cells associated with bacteria. As expected, the background fluorescence control (uninfected cells) was low (AFU = 1.6).

Biofilm Formation

The Biofilm Ring test was used to assess the early biofilm-forming ability of the clinical *S. epidermidis* strains. No differences were observed between the nasal colonizing and infective strains (two-way ANOVA, p = 0.81), and the results agreed with those observed for the reference strain NCTC11047. All strains produced biofilms and completely immobilized the beads after 8 to 12 hours (fig. 5A). For comparison, in our experimental

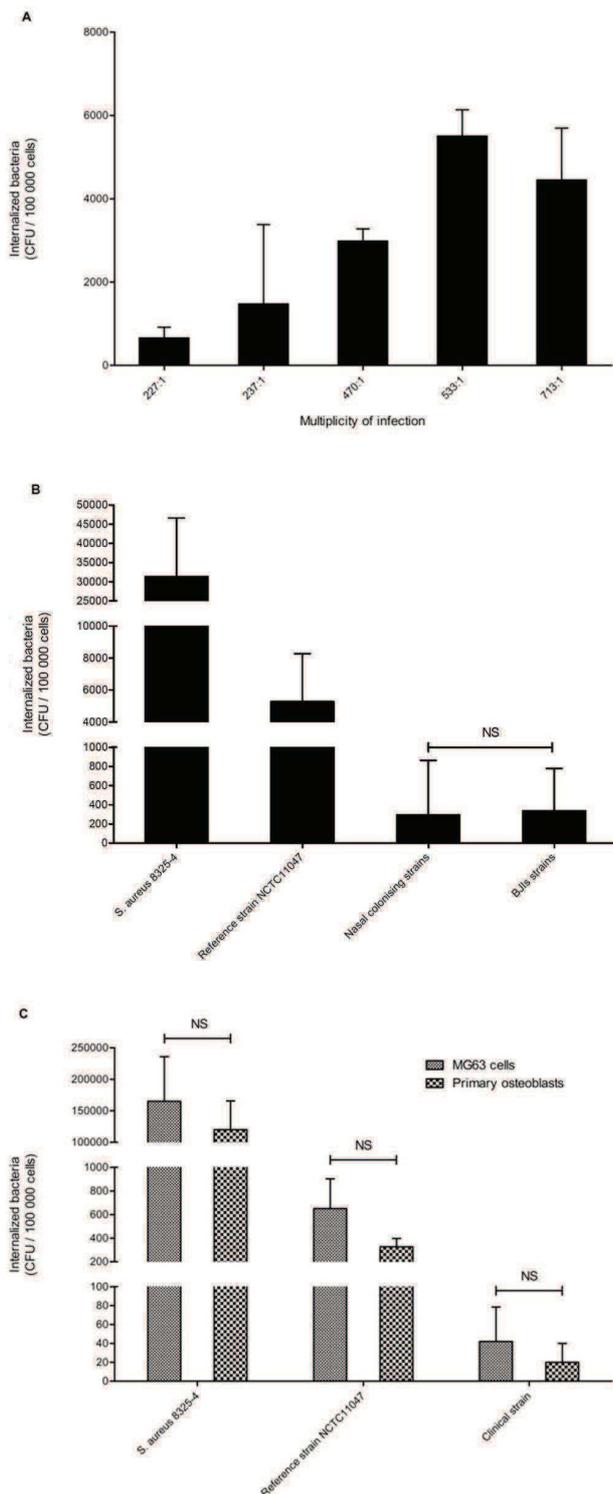


Figure 2. Invasion of human osteoblasts by *S. epidermidis* clinical isolates. A. Determination of the optimal multiplicity of infection (MOI) for use in osteoblast invasion assays (reference strain NCTC11047). B. Evaluation of the rate at which *S. epidermidis* strains invade the MG63 osteoblastic cell line for nasal colonization (n=22) versus orthopedic infection (n=15) isolates. C. Comparison of the invasion rate in MG63 osteoblastic cells and primary human osteoblasts for *S. aureus* 8325-4, *S. epidermidis* NCTC11047, and one randomly chosen *S. epidermidis* clinical isolate. Data are represented as the means

and standard deviations of three replicate cultures from one gentamicin protection assay. NS: Not significant. doi:10.1371/journal.pone.0067240.g002

conditions, *S. aureus* 8325-4 completely immobilized the beads in less than 4 hours as did most of the clinical *S. aureus* isolates (data not shown).

Similarly, the crystal violet staining method revealed no differences in mature biofilm-forming ability between the two groups at 24 h (p = 0.051) and 48 h (p = 0.93) (fig. 5B).

Genetic Diversity: Pulse-field Gel Electrophoresis (PFGE) Patterns Analysis

The 38 *S. epidermidis* isolates exhibited 34 *SmaI* PFGE types, demonstrating a high genetic diversity between the tested strains (fig. 6). One strain remained resistant to the *SmaI* restriction enzyme and was assigned a specific non-restricted profile.

Discussion

Our study investigated whether internalization in osteoblasts and biofilm formation represented virulence factors that could discriminate *S. epidermidis* strains causing orthopedic device infections from colonizing ones. No differences were demonstrated between the two clinical populations (nasal versus orthopedic device infection strains) concerning their ability to invade MG63 osteoblastic cell lines. Similarly, biofilm formation, measured in its early and late phases by the Biofilm Ring test and crystal violet staining method, respectively, failed to discriminate these two isolate groups. Molecular typing of all strains by PFGE demonstrated a great diversity within the tested strains, which excluded the possibility that a low diversity was contributing to the absence of observed differences.

Some limitations of this study must be addressed. First, the selective use of gentamicin-susceptible isolates due to technical requirements to evaluate bone cells invasion using a gentamicin protection assay may have introduced a selection bias. Indeed, strains that may have acquired specific virulence factors associated with gentamicin resistance were excluded. However, we did not observe support for such a hypothesis in the published literature, so we consider that this bias likely does not alter our results. Second, based on the physiopathological model of *S. epidermidis* orthopedic device infection, colonizing strains from skin would have been more appropriate than from nares. Again, we did not identify any data that has demonstrated that colonizing *S. epidermidis* strains differed according to the site of carriage.

Several studies have attempted to identify features that distinguish invasive and pathogenic *S. epidermidis* strains from colonizing ones by mostly focusing on specific virulence factors. The IS256 mobile element has been epidemiologically related to *S. epidermidis* infecting isolates and proposed as a molecular marker for invasive strains [16,17]. This insertion sequence has been identified in 26 out of 32 prosthetic joint infection isolates, whereas only one of the commensal strains harbored it [17]. Moreover, Gu et al. reported that insertion of IS256 within the *agr* locus in clinical isolates decreased *agr* expression and consequently induced a global disruption of staphylococcal virulence factors that finally enhanced the success of *S. epidermidis* during infection of indwelling medical devices [16]. The role of the IS256 element in infection has also been attributed to its potential direct impact on biofilm formation due to its insertion within the poly-N-acetyl-glucosamine (PNAG)/polysaccharide intercellular adhesin (PIA) gene [18], which allows for the production of mature biofilms. Given that the production of PNAG/PIA is also regulated by the *ica*

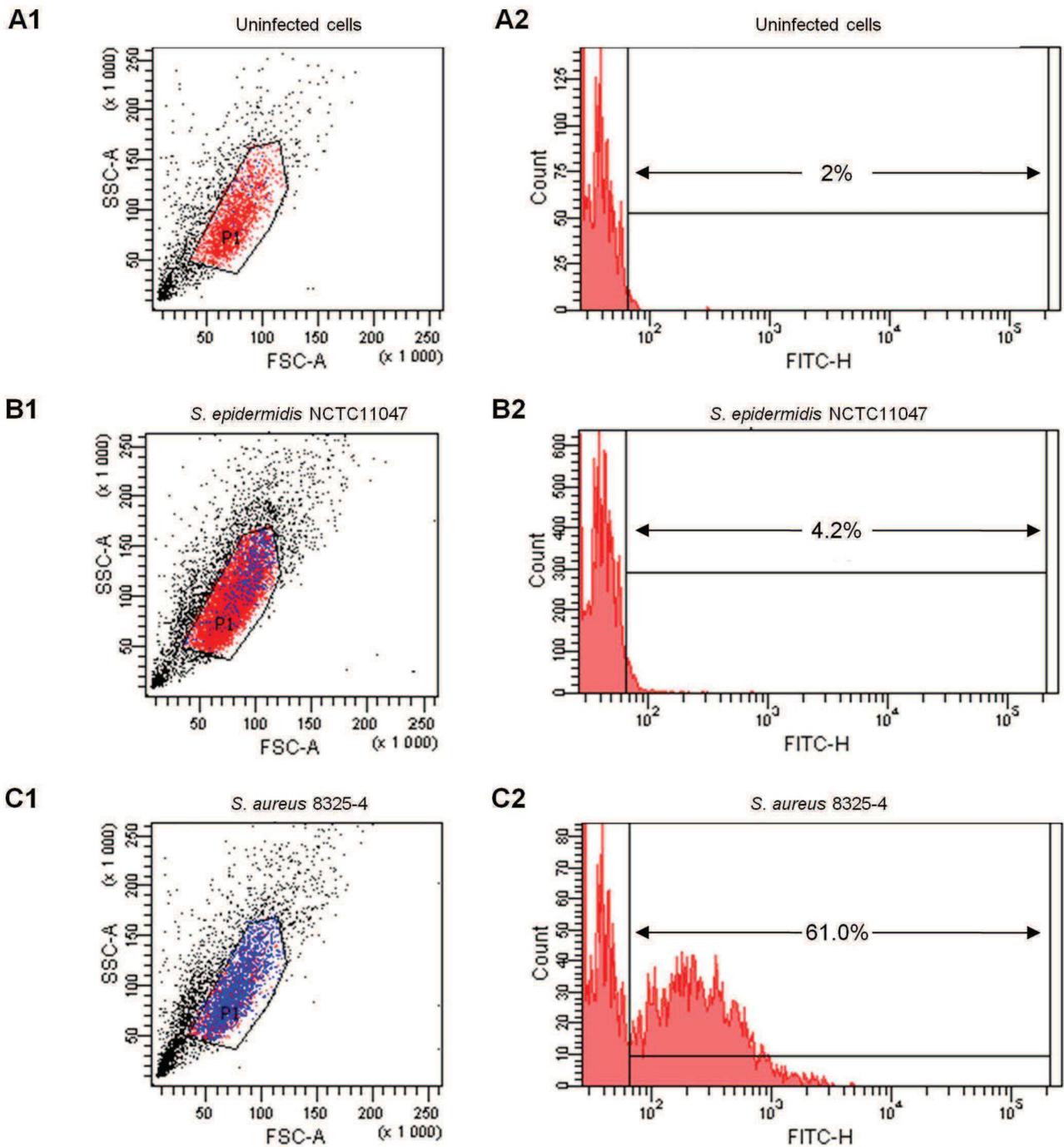


Figure 3. Flow cytometric quantification of adhesion to MG63 osteoblasts by *S. epidermidis*. Flow cytometry analysis was performed using an FSC/SSC stopping gate with uninfected cells (A1), with a fluorescence intensity marker M set to include <2% of uninfected cells (A2). The results from the original cytogram (1) and the distribution of FL1-positive events (2) of a representative experiment are shown, including the reference strains *S. epidermidis* NCTC1147 (B) and *S. aureus* 8325-4 (C). doi:10.1371/journal.pone.0067240.g003

operon genes, this operon has been proposed as a discriminating marker between *S. epidermidis* strains responsible for infection and colonization [19]. This marker was detected in 54 *S. epidermidis* strains collected from patients with bone and joint infections (81.5%), whereas only 17.4% of commensal isolates (n=23) harbored this operon (p<0.01) [19]. Nevertheless, PNAG/PIA has

been excluded as the unique pivotal factor for biofilm formation, and isolates lacking *ica* operon have been demonstrated to form biofilms through other adhesion proteins such as biofilm-associated protein (BAP) or accumulation-associated protein (AAP) [20]. More globally, if biofilms, and consequently most biofilm-associated virulence factors, participate in pathogenesis, they are

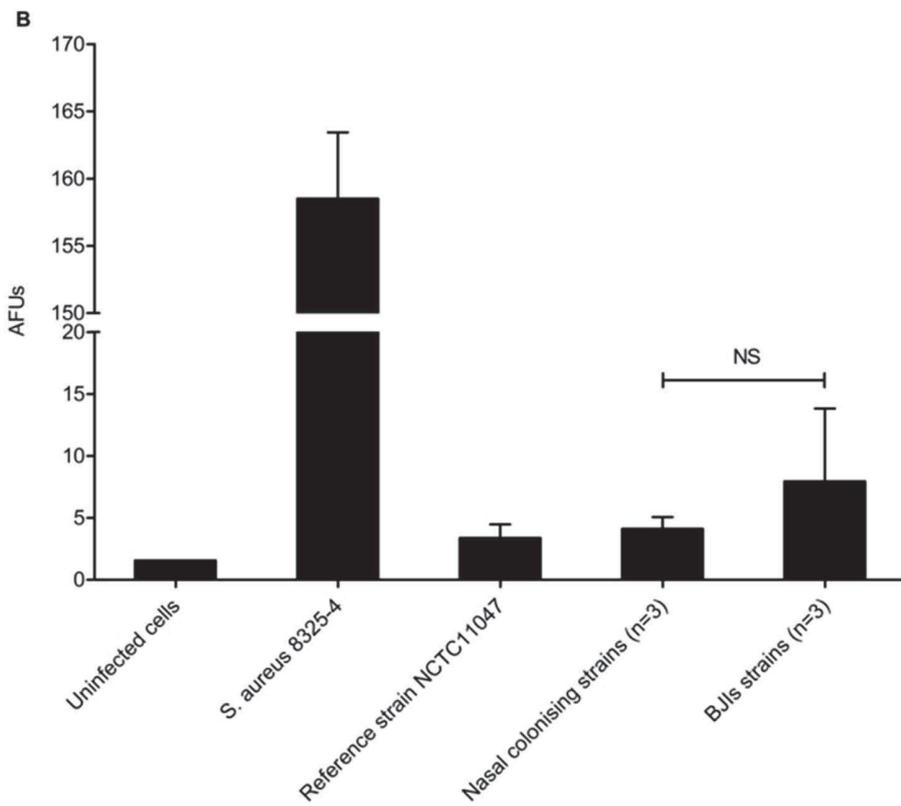
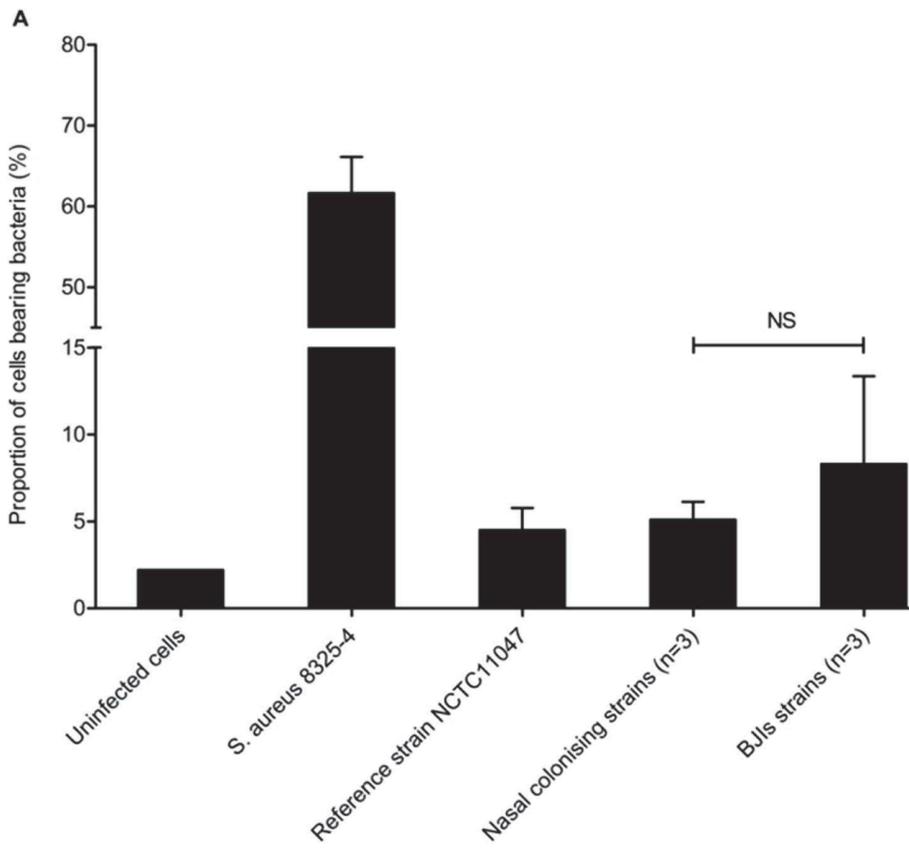


Figure 4. Quantification of *S. epidermidis* adhesion to MG63 osteoblasts. After 2 h of co-culture of MG63 osteoblasts with infective and colonizing *S. epidermidis* strains (n = 3 each) and *S. aureus* strains at an MOI of 500:1 and 100:1, respectively, adhered bacteria were labeled using the membrane-impermeable fluorochrome BODIPY FL vancomycin. The results are presented as the means and standard deviations of the proportion of cells bearing bacteria (A) and of arbitrary fluorescence units (AFUs) (B).
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g004

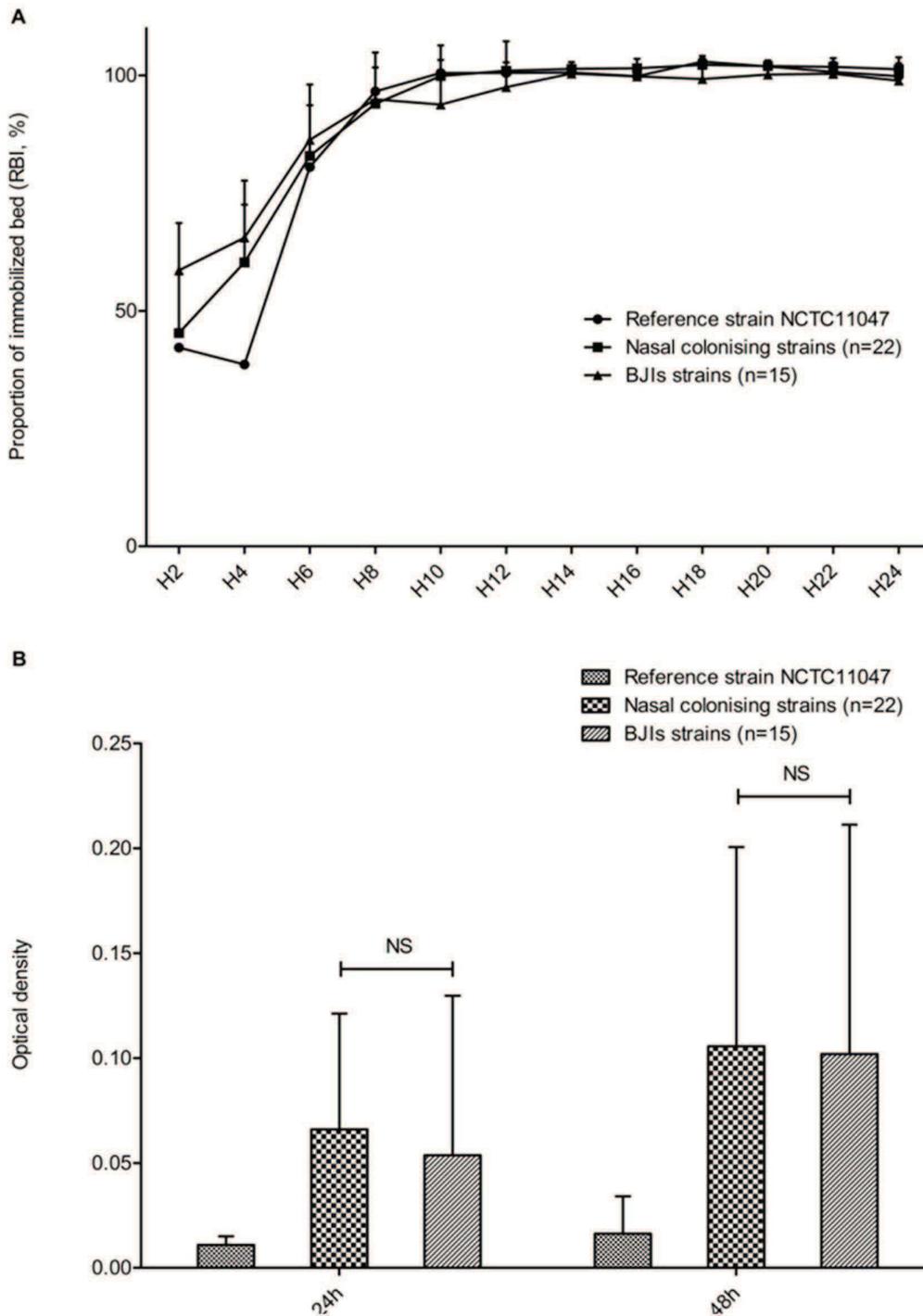


Figure 5. Evaluation of biofilm-formation ability of *S. epidermidis* clinical isolates. A. Kinetics of early biofilm formation was assayed by the Biofilm Ring Test method for the reference strain NCTC11047 and for infective (n = 15) and colonizing (n = 22) *S. epidermidis* strains. B. Quantification of mature biofilm formation after 24 and 48 h by the crystal violet staining method for the *S. epidermidis* reference strain NCTC11047 and 37 clinical isolates.
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g005

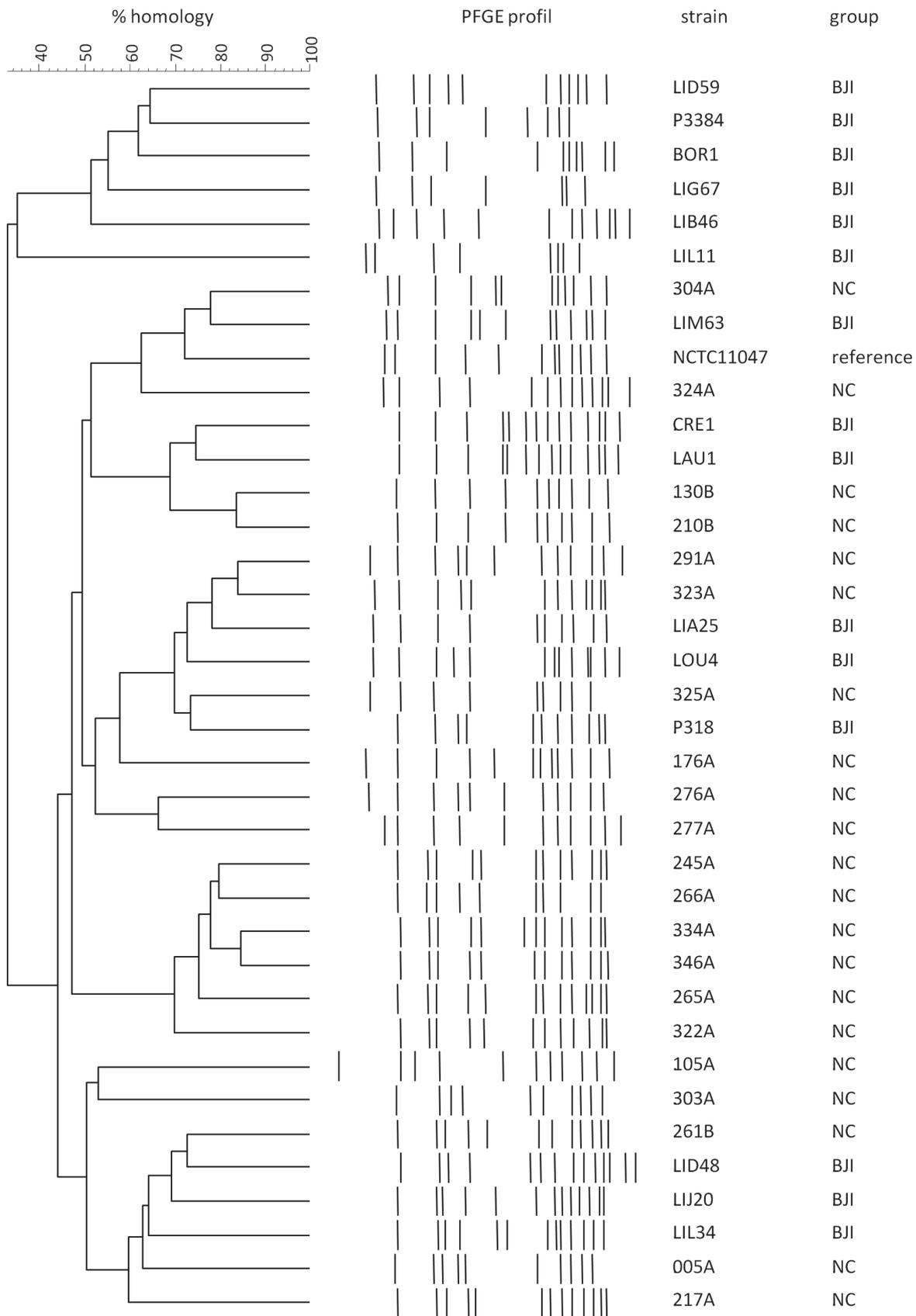


Figure 6. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern analysis. The number on horizontal lines indicates the percentage of homology by the Pearson correlation. BJ: Bone and joint infective strains; NC: Nasal carriage stains. One strain remained resistant to *Sma*I digestion and was assigned a specific non-restricted profile.
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g006

also likely involved in maintaining species in a commensal state. For example, the importance of adhesins and proteins involved in the physiological biofilm formation (such as PNAG/PIA) during skin and mucous membrane colonization, where bacteria are subjected to significant mechanical forces, has been thoroughly demonstrated [21]. This finding could explain why numerous other studies have shown that invasive and commensal *S. epidermidis* strains could not be distinguished on the basis of their virulence factors [21–23], which supports the hypothesis of some authors of an accidental origin of infection from colonizing strains.

An unexpected insight from our study is the difference in bone cell invasion rates between the *S. epidermidis* and *S. aureus* strains. In 2007, Khalil et al. suggested a role for osteoblast invasion in the pathogenesis of *S. epidermidis* bone and joint infections based on the results from a limited number of clinical isolates (n = 4), which included only one bone-infective strain [12]. Here, we describe the first evaluation of the ability of a large collection of clinical *S. epidermidis* strains to invade bone cells. We demonstrated an extremely low internalization rate, 0.006% of the inocula, compared to 0.5 to 5%, which was classically observed for *S. aureus* in the same model. The particular nature of cell lines that are classically associated with the loss of some phenotypic characters led us to consider a possible “cell line effect” that may not reflect the *in vivo* reality [24]. Therefore, we repeated experiments on primary human osteoblasts, which yielded concordant results and confirmed the low ability of *S. epidermidis* to be internalized by cultured human osteoblasts in our model. As *S. aureus* adhesion to osteoblasts (via the staphylococcal fibronectin-binding protein (FnBP) interaction with cellular $\alpha 5\beta 1$ integrin) had been shown as necessary and sufficient for its internalization [6], we explored this step of the osteoblast - *S. epidermidis* interaction. Our results demonstrated that *S. epidermidis* adhered to osteoblasts at an extremely low rate. Nevertheless, the flow cytometric-based approach only evaluates strong interactions, such as $\alpha 5\beta 1$ integrin/FnBP. As FnBP are absent in *S. epidermidis*, the mechanisms of cell adhesion may be different. However, this does not challenge the results observed in the *S. epidermidis* internalization model, as the method quantifying bone cell invasion is independent of interaction type. Our data also suggest that internalization within osteoblasts is a less important pathophysiological mechanism for *S. epidermidis* orthopedic device infections than for *S. aureus*. Similarly, this mechanism seems to be more important in other clinical contexts involving *S. epidermidis*, such as bovine mastitis or urinary or endovascular infections. Indeed, several studies have demonstrated a high *S. epidermidis* internalization rate within endothelial [25], urothelial [26] or bovine mammary epithelial cells [27,28]. Given that *S. epidermidis* is a universal commensal that expresses virulence factors that do not necessarily differ depending on the site of infection, it would be

interesting to evaluate strains that are highly internalized in epithelial mammary cells in the context of our osteoblast infection model and vice versa. This proposal is supported by the Khalil et al. study, which demonstrated that a strain isolated from peritonitis was more internalized by osteoblasts than the bone-infective strain [12]. Nevertheless, it may be misleading to compare data from different protocols obtained with different cell lines and strains. A cross-comparison of the strains used in both models is ongoing and should reveal whether the phenomenon is dependent on the cell or bacterial type.

Conclusions

The abilities of *S. epidermidis* to internalize in osteoblasts and to form biofilms failed to distinguish *S. epidermidis* strains isolated from infected orthopedic devices from nasal carriage isolates. These results support the hypothesis that *S. epidermidis* infections are an accidental event arising from the commensal flora, which colonize and infect strains that are clustered in a single microbiological entity. Given that a sub-group of patients with a higher risk of surgical site infection could not be detected based on the virulence of their *S. epidermidis* colonizing strains, only strict surgical asepsis may be able to reduce the incidence of *S. epidermidis* orthopedic device infections.

Our study provides the first assessment of the interaction between osteoblasts and a collection of clinical *S. epidermidis* strains responsible for bone and joint infections. Given our results obtained in our *ex vivo* models, internalization of *S. epidermidis* in human osteoblasts is not a likely major pathophysiological mechanism in orthopedic device infections, contrary to what is observed in other clinical situations, such as bovine mastitis or endovascular infections, or with other pathogens, such as *S. aureus*.

Acknowledgments

Lyon Bone and Joint Infection Study Group: Physicians – Tristan Ferry, Thomas Perpoint, André Boibieux, François Biron, Florence Ader, Anissa Bouaziz, Judith Karsenty, Fatiha Daoud, Johanna Lippman, Evelyne Braun, Marie-Paule Vallat, Patrick Mialhes, Florent Valour, Christian Chidiac, Dominique Peyramond; **Surgeons** – Sébastien Lustig, Franck Trouillet, Philippe Neyret, Olivier Guyen, Gualter Vaz, Christophe Lienhart, Michel-Henry Fessy, Cédric Barrey; **Microbiologists** – Frédéric Laurent, François Vandenesch, Jean-Philippe Rasigade; **Nuclear Medicine** – Isabelle Morelec, Emmanuel Deshayes, Marc Janier, Francesco Giammarile; **PK/PD specialists** – Michel Tod, Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle; **Clinical Research Assistant** – Marion Martinez

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FV STA JPR FL. Performed the experiments: FV STA. Analyzed the data: FV JPR HM TF FL. Contributed reagents/materials/analysis tools: FV JPR SL HM EC ST FV JE. Wrote the paper: FV STA TF FL.

References

- Otto M (2009) Staphylococcus epidermidis—the ‘accidental’ pathogen. Nature reviews 7: 555–567.
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE (2004) Prosthetic-joint infections. New Engl J Med 351: 1645–1654.
- Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. Lancet 364: 369–379.
- Uckay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, et al. (2009) Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis (2009) Ann Med 41: 109–119.
- Schierholz JM, Beuth J (2001) Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. J Hosp Infect 49: 87–93.
- Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, et al. (1999) Mechanisms of Staphylococcus aureus invasion of cultured osteoblasts. Microbiol pathog 26: 317–323.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318–1322.
- Fey PD, Olson ME (2010) Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. Future Microbiol 5: 917–933.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P (2009) Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol 11: 1034–1043.

10. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME (2008) Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 13–22.
11. Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere AM, Bes M, et al. (2011) Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 343–354.
12. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, et al. (2007) Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect* 9: 460–465.
13. Trouillet S, Rasigade JP, Lhote Y, Ferry T, Vandenesch F, et al. (2011) A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods* 86: 145–149.
14. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic 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: 891–899.
15. Chavant P, Gaillard-Martinié B, Talon R, Hebraud M, Bernardi T (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* 68: 605–612.
16. Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, et al. (2005) Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* 61: 342–348.
17. Koskela A, Nilsson-Augustinsson A, Persson L, Soderquist B (2009) Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 655–660.
18. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lossner I, Gotz F, et al. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 32: 345–356.
19. Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Rydén C, El Solh N (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* 182: 351–355.
20. Tormo MA, Knecht E, Gotz F, Lasa I, Penades JR (2005) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* 151: 2465–2475.
21. Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstkotte MA, et al. (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 42: 5614–5619.
22. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M (2005) Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* 191: 289–298.
23. Yao Y, Sturdevant DE, Villaruz A, Xu L, Gao Q, et al. (2005) Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infect Immun* 73: 1856–1860.
24. Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, et al. (2004) Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* 24: 3743–3748.
25. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Gotz F, Peters G, et al. (2010) A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol* 12: 1746–1764.
26. Pils S, Schmitter T, Neske F, Hauck CR (2006) Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry. *J Microbiol Methods* 65: 301–310.
27. Almeida RA, Oliver SP (2001) Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* 31: 205–212.
28. Anaya-Lopez JL, Contreras-Guzman OE, Carabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, Lopez-Meza JE, et al. (2006) Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci* 81: 358–361.

TROISIEME PUBLICATION : PSMs of Hypervirulent *Staphylococcus aureus* Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts

Les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (MRSA) posent un problème majeur en terme de santé publique du fait de leurs antibio-résistances mais surtout en raison de leurs prévalence importante dans de nombreux pays. Selon leurs origines, ils sont généralement classés en deux catégories : les HA-MRSA (hospital-acquired-MRSA) d'origine hospitalière et les CA-MRSA (community-acquired-MRSA) d'origine communautaire. Ces derniers sont à l'origine d'infections particulièrement sévères, ce pourquoi ils sont qualifiés d'hypervirulents.

La virulence particulière des CA-MRSA a modifié la prise en charge et le pronostic des IOA dans les pays à forte prévalence comme les Etats-Unis. En comparaison à leurs homologues hospitaliers, les CA-MRSA induisent par exemple des ostéomyélites d'évolution plus aiguë, de pronostic plus sévère, nécessitant un recours quasi-systématique à une chirurgie de débridement lourd et une admission fréquente en réanimation ou soins intensifs. L'état actuel des connaissances indique que la PVL est impliquée dans la physiopathologie de ces formes particulières d'IOA. Cette toxine joue un rôle indirect dans la destruction osseuse en assurant le recrutement des leucocytes au site de l'infection, leur activation et leur lyse, qui induit localement une libération de composés cytotoxiques aboutissant à une nécrose tissulaire. Cependant, les interactions directes entre ostéoblastes et CA-MRSA n'ont jamais été étudiées spécifiquement. Au-delà de l'action indirecte de la PVL, il est apparu nécessaire de rechercher chez les CA-MRSA, l'existence de mécanismes de virulence qui impliqueraient une activité directe sur les ostéoblastes.

Notre hypothèse de travail était la suivante : si les CA-MRSA sont capables d'envahir et détruire les ostéoblastes, alors ces pathogènes présenteront une cytotoxicité supérieure aux HA-MRSA dans un modèle d'infection intracellulaire d'ostéoblastes humains. Nous avons testé cette hypothèse sur un panel de souches de CA-MRSA et HA-MRSA incluant les principaux clones circulant dans le monde, et montré que la cytotoxicité des CA-MRSA vis-à-vis des ostéoblastes n'était pas l'apanage d'une seule souche ou lignée mais bien un facteur commun aux différents clones de CA-MRSA.

Nous avons alors cherché à déterminer s'il existait un facteur de virulence spécifiquement associé à la cytotoxicité observée. Nous avons centré nos investigations sur les trois principaux déterminants de virulence des CA-MRSA que constituent la production de PVL, la surexpression d' α -toxine et la surexpression des PSMs. La comparaison des phénotypes cytotoxiques de souches isogéniques pour la PVL a permis d'éliminer un rôle de cette dernière dans la mort des ostéoblastes. De même, nous avons montré que i) le niveau d'expression d' α -toxine, quant à lui, n'était pas corrélé à la cytotoxicité et que ii) les souches isogéniques pour *hla* présentaient le même phénotype de cytotoxicité.

En revanche, l'inactivation des gènes codant les PSM de type alpha était associée à une diminution de cytotoxicité, indiquant un rôle de ces derniers dans la virulence des CA-MRSA vis-à-vis des ostéoblastes.

A l'aide de mutants isogéniques délétés sur les principaux régulateurs de l'expression des toxines, *agr*, *sarA* et *saeRS*, nous avons déterminé quelles voies de régulation étaient associées à la cytotoxicité. L'expression d'un phénotype cytotoxique était dépendante du caractère fonctionnel d'*agr* et *sarA*, mais pas de celui de *saeRS*. Il est intéressant de noter qu'*agr* et *sarA* contrôlent étroitement l'expression des PSMs, alors que *saeRS* ne l'influence pas. Ainsi, les voies de régulation associées à la cytotoxicité sont en faveur du rôle des PSM. Ces résultats améliorent notre connaissance de la physiopathologie des IOA à CA-MRSA à plusieurs titres. D'abord, le fait que ces pathogènes soient capable d'induire la mort des ostéoblastes infectés de façon plus efficace que les HA-MRSA dévoile un nouveau mécanisme de virulence, indépendant de la PVL et de l' α -toxine. Ces résultats démontrent que, contrairement au modèle établi, le rôle physiopathologique de l'internalisation de *S. aureus* par les ostéoblastes ne procède pas toujours d'un échappement à l'action des antibiotiques et du système immunitaire avec passage à l'état quiescent et sanctuarisation de *S. aureus* (à l'origine de rechutes) comme cela semble le cas chez les HA-MRSA ; mais que l'internalisation permet à *S. aureus* de tuer sa cellule hôte dans le cas de certains clones, comme les CA-MRSA.

Enfin, nous apportons la première démonstration de l'existence de toxines à action intracellulaire chez *S. aureus*. Le rôle des PSM, récemment remis en question pour leur action extracellulaire, semblent au contraire être une arme bactérienne efficace pour tuer sa cellule hôte après invasion.

PSMs of Hypervirulent *Staphylococcus aureus* Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts

Jean-Philippe Rasigade^{1,2,3*}, Sophie Trouillet-Assant¹, Tristan Ferry¹, Binh An Diep⁴, Anaïs Sapin³, Yannick Lhoste³, Jérémy Ranfaing¹, Cédric Badiou¹, Yvonne Benito², Michèle Bes², Florence Couzon¹, Sylvestre Tigaud³, Gérard Lina^{1,2}, Jérôme Etienne^{1,2}, François Vandenesch^{1,2}, Frédéric Laurent^{1,2,3}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1111, University of Lyon, Lyon, France, **2** National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, **3** Department of Clinical Microbiology, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **4** Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America

Abstract

Epidemic community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) is associated with more severe and acute forms of osteomyelitis than healthcare-associated (HA-) MRSA. Although *S. aureus* is now recognized as a facultative intracellular pathogen, the contribution of osteoblast invasion by CA-MRSA to the pathogenesis of osteomyelitis is unknown. Using an ex vivo model of intracellular infection of human osteoblasts, we demonstrated that CA-MRSA strains of diverse lineages share an enhanced ability to kill infected osteoblasts compared to HA-MRSA. Cytotoxicity comparisons of CA-MRSA isogenic deletion mutants revealed that phenol-soluble modulins (PSMs), a class of membrane-damaging exoproteins that are expressed at higher levels in CA-MRSA than in HA-MRSA, are involved in this osteoblast killing, whereas other major CA-MRSA virulence determinants, the Panton-Valentine leukocidin and alpha-toxin, are not involved. Similarly, functional *agr* and *sarA* regulators, which control the expression of PSMs and alpha-toxin, were required for the expression of the intracellular cytotoxic phenotype by CA-MRSA, whereas the *saeRS* regulator, which controls the expression of alpha-toxin but not PSMs, had no impact on cytotoxicity. Finally, PSM transcript levels determined by quantitative reverse-transcriptase PCR were significantly higher in CA-MRSA than in HA-MRSA strains and associated with cell damage in MRSA-infected osteoblasts. These findings provide new insights into the pathogenesis of severe CA-MRSA osteomyelitis and unravel a novel virulence strategy of CA-MRSA, based on the invasion and subsequent killing of osteoblasts by PSMs acting as intracellular toxins.

Citation: Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, et al. (2013) PSMs of Hypervirulent *Staphylococcus aureus* Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts. PLoS ONE 8(5): e63176. doi:10.1371/journal.pone.0063176

Editor: J. Ross Fitzgerald, University of Edinburgh, United Kingdom

Received: March 8, 2013; **Accepted:** March 29, 2013; **Published:** May 14, 2013

Copyright: © 2013 Rasigade et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Dr. Binh An Diep is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: jean-philippe.rasigade@chu-lyon.fr

Introduction

Staphylococcus aureus is the leading cause of osteomyelitis, which is defined as an infection of the bone [1]. This versatile pathogen has evolved a remarkable ability to resist antibiotics such as methicillin and other beta-lactams, complicating the management of osteomyelitis [2]. Until the 1990s, methicillin resistance was recognized as a specific trait of healthcare-associated *S. aureus* (HA-MRSA), which was first described in the early 1960s [3]. The incidence of community-acquired (CA-) MRSA infections has since dramatically increased in several countries [4], and this pandemic has altered the clinical landscape of osteomyelitis, particularly in the pediatric setting [5,6]. In the United States, CA-MRSA infections are more frequent than their methicillin-susceptible counterparts [7–10], and the dissemination of these strains has been coincident with an increase in both the incidence and the severity of osteomyelitis [5,9–12]. Children with osteomyelitis caused by CA-MRSA, compared to other *S. aureus* lineages, exhibit greater systemic inflammatory responses [13], experience longer durations of fever and longer hospital stays [5,10], and more frequently

require surgical procedures [5]. Case series also suggested that these patients often require admission to the intensive care unit [6,9]. Notably, CA-MRSA infections have added to, rather than replaced, infections caused by other microorganisms, including methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA).

Investigations of the basis of CA-MRSA virulence are crucial for understanding its pathogenesis and the development of novel therapeutics against these recently emerged pathogens. Data from in vitro and animal models have shown that the virulence potential of CA-MRSA is multifactorial. This virulence potential has evolved via the acquisition of the *pvl* genes encoding the Panton-Valentine leukocidin (PVL) and through the increased expression of core genome-encoded toxins, mainly alpha-toxin and phenol-soluble modulins (PSMs) [8]. These pore-forming toxins induce apoptosis and lysis in different cell types. PVL and PSMs target immune effector cells such as neutrophils [8], while alpha-toxin targets a much wider spectrum of cells, including erythrocytes, alveolar epithelial cells [14], endothelial cells [15], lymphocytes, and monocytes [16]. Experimental investigations of CA-MRSA virulence have mainly focused on models of skin

and soft tissue infections or pneumonia because these diseases are the most frequent or the most severe, respectively, in the spectrum of CA-MRSA infections [17]. As a consequence, few experimental data are available regarding the pathogenesis of CA-MRSA osteomyelitis. PVL has been shown to contribute to the severity of infection in a rabbit model of osteomyelitis [18]. The expression of the *S. aureus* surface protein A, although not specific to CA-MRSA strains, is also associated with bone destruction through its binding to the tumor necrosis factor receptor 1 of osteoblasts [19–21]. However, the roles of CA-MRSA-specific virulence determinants other than PVL are unknown. Direct interactions of *S. aureus* with osteoblasts are crucial in the pathogenesis of osteomyelitis [22,23]. The ability of *S. aureus* to invade and gain access to the cytoplasm of so-called non-professional phagocytes such as osteoblasts has gained increased attention [22–25] and is now regarded as a key factor in therapy-refractive infections [26,27].

The primary objective of this work was to compare the ability of CA-MRSA and HA-MRSA strains to invade and damage human osteoblasts in an ex vivo model. To achieve adequate representation of MRSA strains circulating worldwide, 35 strains of the major CA-MRSA and HA-MRSA lineages were investigated. Our secondary objective was to determine if specific virulence determinants were associated with either osteoblast invasion or killing by MRSA. The roles of PVL, alpha-toxin, and PSM production and of the regulators *agr*, *sarA*, and *saeRS* in the virulence of MRSA during intracellular infection were examined. Finally, we investigated whether osteoblast killing was associated with the expression levels of the bacterial genes encoding alpha-toxin, PSMs and the *agr* effector RNAPIII.

Results

Intracellular CA-MRSA causes Higher Osteoblast Damage than HA-MRSA

We examined the cytotoxicity induced in human osteoblasts by 35 genetically diverse clinical strains of MRSA selected from the collection of the French National Reference Center for Staphylococci. These strains belonged to 3 major lineages of *pvl*⁺ CA-MRSA, namely sequence type (ST)8, pulsotype USA300, staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) IV (ST8-USA300-IV clone), the ST80-IV European clone, and the ST30-USA1100-IV Southwest Pacific clone [28], and to 4 major lineages of HA-MRSA, namely the ST239-III Brazilian clone, the ST228-I Southern Germany clone, the ST8-EMRSA2-IV Lyon clone, and the ST22-EMRSA15-IV Barnim clone (n = 5 strains each) [29,30].

The infection protocol was comprised of a 2 h co-culture step of MRSA and MG-63 osteoblastic cells in antibiotic-free medium with a bacteria-host cell ratio of 100, followed by a selection step in medium containing gentamicin and lysostaphin to kill non-internalized bacteria. After 24 h of incubation, the *S. aureus*-induced cytotoxicity was estimated by a lactate dehydrogenase (LDH) assay. The results were reported as the mean and 95% CI of the n-fold change in LDH compared to cells infected with the *S. aureus* reference strain 8325-4 (control); each strain was tested in duplicate.

A significant difference was observed in the capacity of CA-MRSA and HA-MRSA to induce osteoblast damage after 24 h. The relative LDH release by CA-MRSA-infected cells was 1.7-fold higher than that by HA-MRSA-infected cells (1.67 [1.53–1.81] vs. 0.99 [0.93–1.04], respectively; $P < 0.0001$, Welch's *t*-test; Figure 1A and Table S1). ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test was used to determine if the cytotoxicity was also dependent on the

lineage of the strains. Pairwise comparisons showed that (i) any of the 3 CA-MRSA lineages induced significantly higher LDH release than any of the 4 HA-MRSA lineages ($P < 0.01$ for all differences) and (ii) no significant difference in LDH release was observed between the lineages within the CA-MRSA or HA-MRSA groups.

The Intracellular Bacterial Load is Higher in HA-MRSA- than CA-MRSA-infected Osteoblasts

The viable intracellular bacterial loads (VIBL) within MRSA-infected osteoblasts were determined using the infection assay described above, followed by the osmotic lysis of infected cells at 24 h post-infection to release the bacteria, which were enumerated by plate counting. The results were expressed as the mean and 95% CI of the n-fold change in the VIBL compared to cells infected with the *S. aureus* strain 8325-4 (control) and were derived from the same experiments as those used to quantify cytotoxicity.

The relative VIBL was 3.5-fold higher in HA-MRSA-infected osteoblasts than in CA-MRSA-infected osteoblasts (2.50 [2.15–2.84] vs. 0.72 [0.54–0.91], respectively; $P < 0.0001$; Fig 1B and Table S1). The differences between the lineages were analyzed using the same ANOVA procedure as described above. Pairwise comparisons showed that (i) the relative VIBL was significantly higher among the 4 HA-MRSA lineages than the 3 CA-MRSA lineages ($P < 0.05$ for all differences, Tukey's HSD test) and (ii) no significant difference in the relative VIBL was observed between the lineages within the CA-MRSA or HA-MRSA groups.

The Lower Intracellular Bacterial Load of CA-MRSA is not Explained by Host Cell Killing

Following the observation that CA-MRSA induced both higher cytotoxicity and lower VIBL than did HA-MRSA, we tested the hypothesis that cytotoxicity was negatively correlated with VIBL. Because bacteria that kill their host cells are released into the extracellular space and excluded from the intracellular bacterial pool, the higher cytotoxicity of a given strain could directly yield a lower VIBL. We thus searched for an association between cytotoxicity and VIBL with and without controlling for the CA-MRSA or HA-MRSA status of the strain. Figure 1C shows a plot of relative LDH release against VIBL. The VIBL was significantly associated with cytotoxicity levels upon simple regression analysis ($P < 0.0001$, *F*-test). However, multiple linear regression controlling for CA-MRSA or HA-MRSA status demonstrated that there was no independent association between VIBL and cytotoxicity ($P = 0.6$).

To further explore the relationships between bacterial invasion, intracellular persistence, and the CA-MRSA or HA-MRSA status of the strains, we quantified the number of viable bacteria per viable osteoblast in kinetics experiments. The first time point was 3 h after the beginning of the infection step to reflect the efficiency of the invasion process. Subsequent time points were taken at 24 and 48 h after infection to investigate the clearance of intracellular bacteria with respect to the initial VIBL. Two strains (the ST80-IV CA-MRSA strain HT20020209 and the ST8-EMRSA2-IV HA-MRSA strain HT20040117) were randomly selected from the 35 MRSA strains and included in these experiments (see arrows in Figure 1C). The results are reported as the means and 95% CI derived from three independent experiments in triplicate. At 3 h post-infection, the osteoblasts harbored an average of 0.77 [0.52–1.03] ST80-IV cells and 3.59 [2.30–4.89] ST8-EMRSA2-IV cells, which corresponded to approximate intracellular passages of 1%

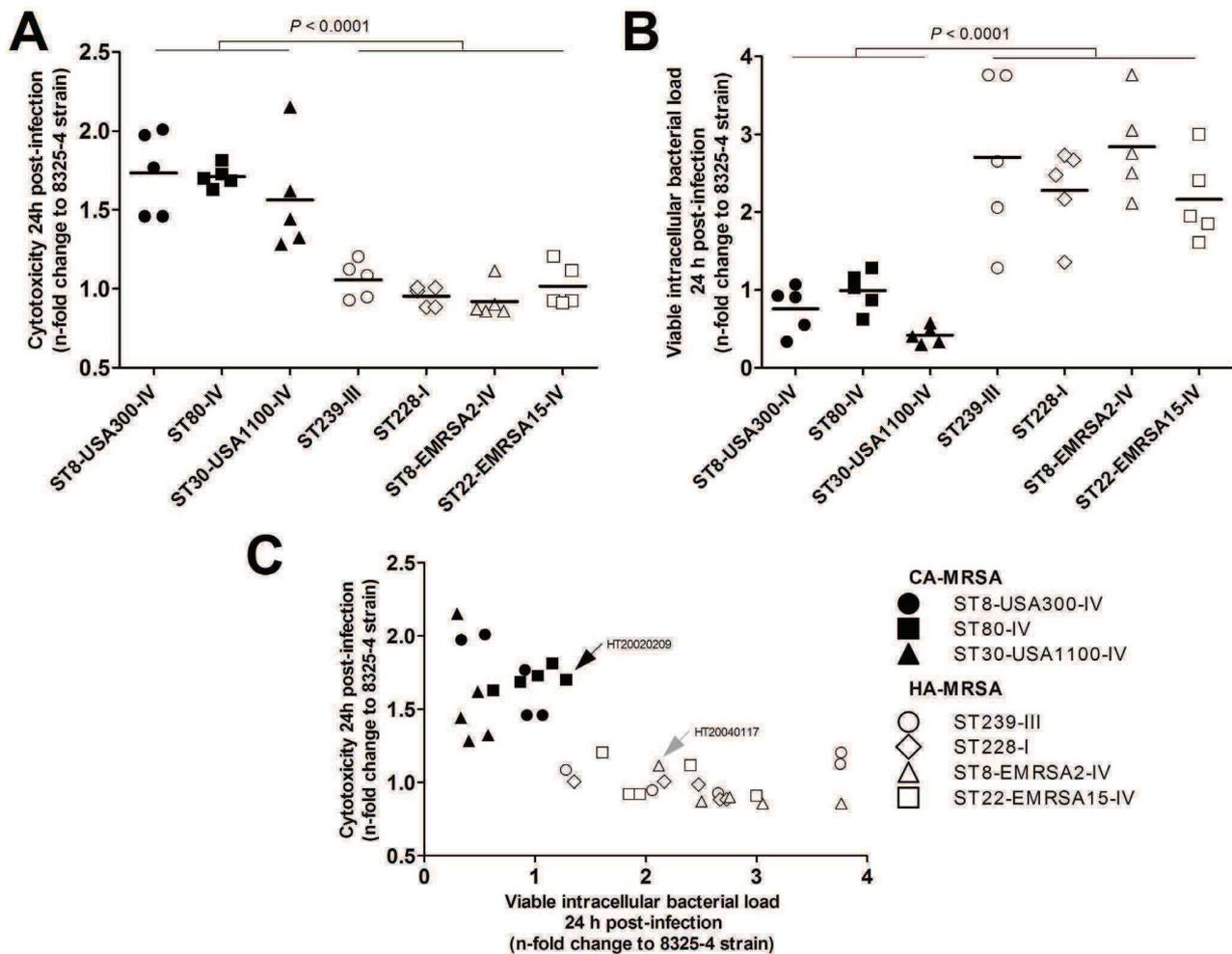


Figure 1. Viable intracellular bacterial loads and host cell damage differentiate CA-MRSA and HA-MRSA strains in a model of intracellular challenge of cultured osteoblasts. Osteoblastic MG-63 cells were infected with one of 35 *S. aureus* strains belonging to 3 distinct CA-MRSA lineages (closed marks) and 4 HA-MRSA lineages (open marks) at an MOI of 100:1 and incubated for 24 h. Cytotoxicity was estimated by quantifying the LDH release by damaged cells. The infected cells were lysed, and viable intracellular bacterial counts were enumerated. All results were expressed as the n-fold change relative to the *S. aureus* 8325-4 control strain and were derived from duplicate experiments. The *P*-values were calculated using Welch's *t*-test. (A) Comparison of the relative cytotoxicity of CA-MRSA and HA-MRSA strains. (B) Comparison of the viable intracellular bacterial loads in osteoblasts infected with CA-MRSA and HA-MRSA strains. (C) Plot of relative cytotoxicity and intracellular bacterial loads, indicating differences between the CA-MRSA and HA-MRSA strains. Strains HT20020209 and HT20040117, which were included in the kinetics experiments in Figure 2, are indicated by arrows. doi:10.1371/journal.pone.0063176.g001

and 4%, respectively, of the bacterial inoculum set at 100 bacteria per osteoblast (Figure 2A). These figures remained stable from 3 to 24 h post-infection, at which time the bacteria per osteoblast ratios were 0.86 [0.44–1.27] and 5.78 [4.13–7.44] for the ST80-IV and ST8-EMRSA2-IV strains, respectively. Significant bacterial clearance occurred between 24 and 48 h, at which time the ratios fell to 0.02 [0.01–0.03] for the ST80-IV strain and 0.55 [0.06–1.03] for the ST8-EMRSA2-IV strain, corresponding to 46.3- and 10.6-fold reductions, respectively, in the bacterial load. Comparisons of the ST8-EMRSA2-IV and ST80-IV strains revealed that the bacteria per osteoblast ratios after 3, 24, and 48 h of incubation were 4.6-, 6.8-, and 29.5-fold higher, respectively, for the HA-MRSA strain than for the CA-MRSA strain ($P < 0.05$ for all differences, Welch's *t*-test). Collectively, these findings indicated that the invasion process itself and the ability to survive intracellularly after invasion were less efficient in the CA-MRSA strain HT20020209 than in

the HA-MRSA strain. Moreover, these experiments confirmed that the difference in the amounts of intracellular bacteria between CA-MRSA and HA-MRSA was independent of the host cell death caused by CA-MRSA.

Additional experiments to investigate osteoblast infection were conducted as described above using the same two strains, HT20020209 and HT20040117, to estimate the mortality of infected osteoblasts. The results were reported as the means and 95% CI derived from three independent experiments in triplicate. The percent mortality in osteoblasts infected with the CA-MRSA strain HT20020209 and the HA-MRSA strain HT20040117 were 51.8% [46.6–56.9] and 21.0% [16.6–25.5], respectively ($P < 0.0001$, Welch's *t*-test; Figure 2B). These results, together with those of the infection kinetics experiments, confirmed the potent cytotoxic activity of intracellular CA-MRSA by showing

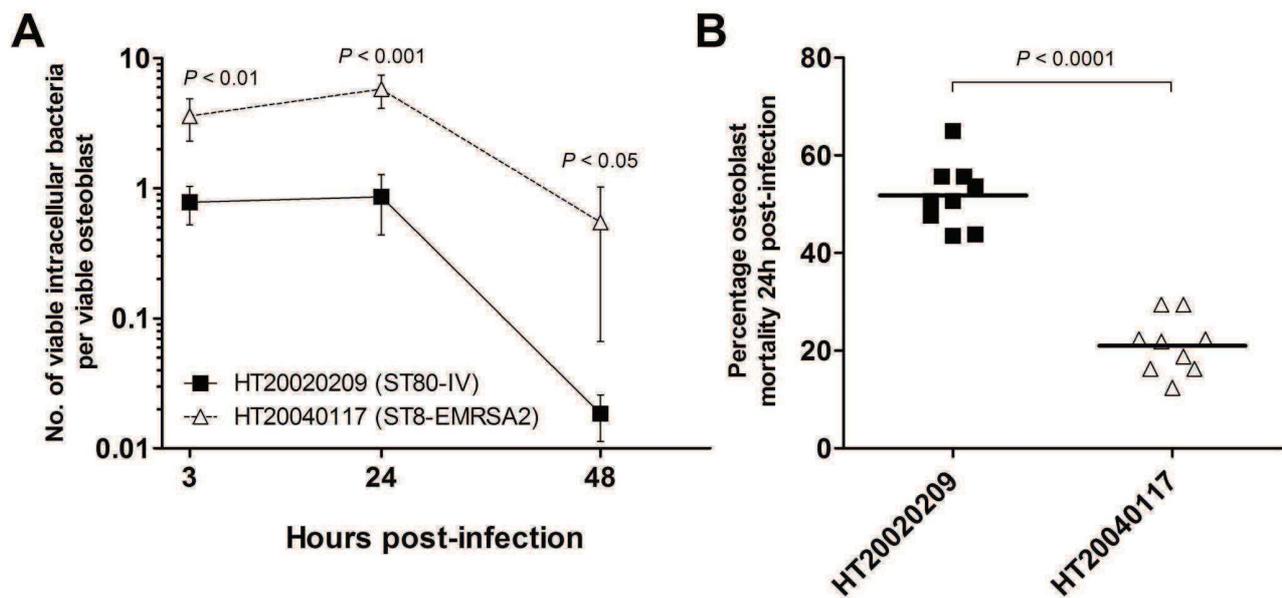


Figure 2. Kinetics of the intracellular passage and survival of representative CA-MRSA and HA-MRSA strains and the mortality of infected osteoblasts. The ST80-IV CA-MRSA strain HT20020209 (closed marks) and the ST8-EMRSA2-IV HA-MRSA strain HT20040117 (open marks) were used to inoculate MG-63 osteoblastic cells. The indicated *P*-values were calculated using Welch's *t*-test, and the results were derived from three independent experiments in triplicate. (A) Kinetics experiments of intracellular bacterial passage and survival. At each time point, the viable intracellular bacteria and osteoblasts were quantified to calculate the no. of viable bacteria per osteoblast. The results are shown as the means \pm 95% CI. (B) The percent mortality of infected osteoblasts 24 h post-infection confirms the strong cytotoxic effect of ST80-IV *S. aureus* compared to ST8-EMRSA2-IV. doi:10.1371/journal.pone.0063176.g002

that an average intracellular load of one bacterium per host cell resulted in the death of half of the host cell population by 24 h.

PVL is not Involved in the Intracellular Virulence of CA-MRSA

Although PVL specifically targets immune cells, this toxin has been shown to bind mitochondria and to cause Bax-independent apoptosis through the mitochondrial pathway [31]. Hence, direct delivery of PVL by intracellular CA-MRSA in the cytoplasm of infected osteoblasts may allow the toxin to gain access to the mitochondria without the need for immune cell type-specific binding to the plasma membrane. PVL is found in most CA-MRSA but not HA-MRSA strains and is expressed at toxic levels as long as the corresponding genes are present in the genome [32,33]. Therefore, we used a loss-of-function approach to examine the influence of PVL on cytotoxicity by using isogenic *pvl*^{-/-} strains belonging to the three CA-MRSA lineages investigated in the previous experiments. With respect to ST8-USA300-IV, strains LAC and SF8300, as well as their Δpvl derivatives LAC Δpvl and SF8300 Δpvl , have been described previously [34,35]. The following mutants were constructed by allelic replacement: the LUG1800 Δpvl mutant of the ST80-IV strain HT20020209, and the BD0448 Δpvl mutant of the ST30-USA1100-IV strain BD0428. The cytotoxicity toward osteoblasts was assessed after 24 h of infection using the same procedure as described above. The results of three experiments performed in triplicate are presented in Figure 3A. No significant differences in cytotoxicity were observed between the wild-type and Δpvl strains in the three lineages investigated ($P > 0.05$ for all comparisons, Welch's *t*-test), thus eliminating a potential role for PVL in the increased cytotoxicity of CA-MRSA toward osteoblasts.

Alpha-toxin Production Level is not Correlated with Osteoblast Damage

The *hla* gene encoding alpha-toxin belongs to the core genome of *S. aureus*, and the expression level of this toxin has been shown to affect strain-specific virulence [36]. We thus searched for an association between alpha-toxin production and cytotoxicity. The *in vitro* production of alpha-toxin by MRSA strains and by the *S. aureus* strain 8325-4 was quantified in duplicate using a sandwich ELISA and reported as ng/mL. Because the data were not normally distributed upon visual inspection, we used non-parametric tests for the statistical analysis and reported the medians and interquartile ranges (IQR) instead of means and the 95% CI. Alpha-toxin production tended to be higher in CA-MRSA than in HA-MRSA strains, but this difference did not reach statistical significance (median and IQR, 5153 ng/mL [1790-7683] vs. 2310 ng/mL [36-4326], respectively; $P = 0.074$, two-tailed Mann-Whitney *U*-test; Figure 4A and Table S1). Among the 35 MRSA strains investigated, 7 strains produced low amounts of alpha-toxin (<50 ng/mL), including the 5 ST228-I HA-MRSA strains (100%), 1 ST8-EMRSA2-IV HA-MRSA strain (20%), and unexpectedly, 1 ST8-USA300-IV CA-MRSA strain (20%). We plotted the relative cytotoxicity of the MRSA strains against the alpha-toxin activity (Figure 4B) and searched for an association between these factors using a non-parametric correlation analysis. A moderate rank correlation was found (Spearman's coefficient = 0.31) that did not reach statistical significance ($P = 0.069$). No association was found by multiple linear regression analysis controlling for the CA-MRSA or HA-MRSA status ($P = 0.75$, *F*-test). Notably, the 8325-4 control strain, which had the highest alpha-toxin production (28.8 μ g/mL) due to a previously described chromosomal defect [37], was less cytotoxic toward osteoblasts than any of the CA-MRSA strains, including

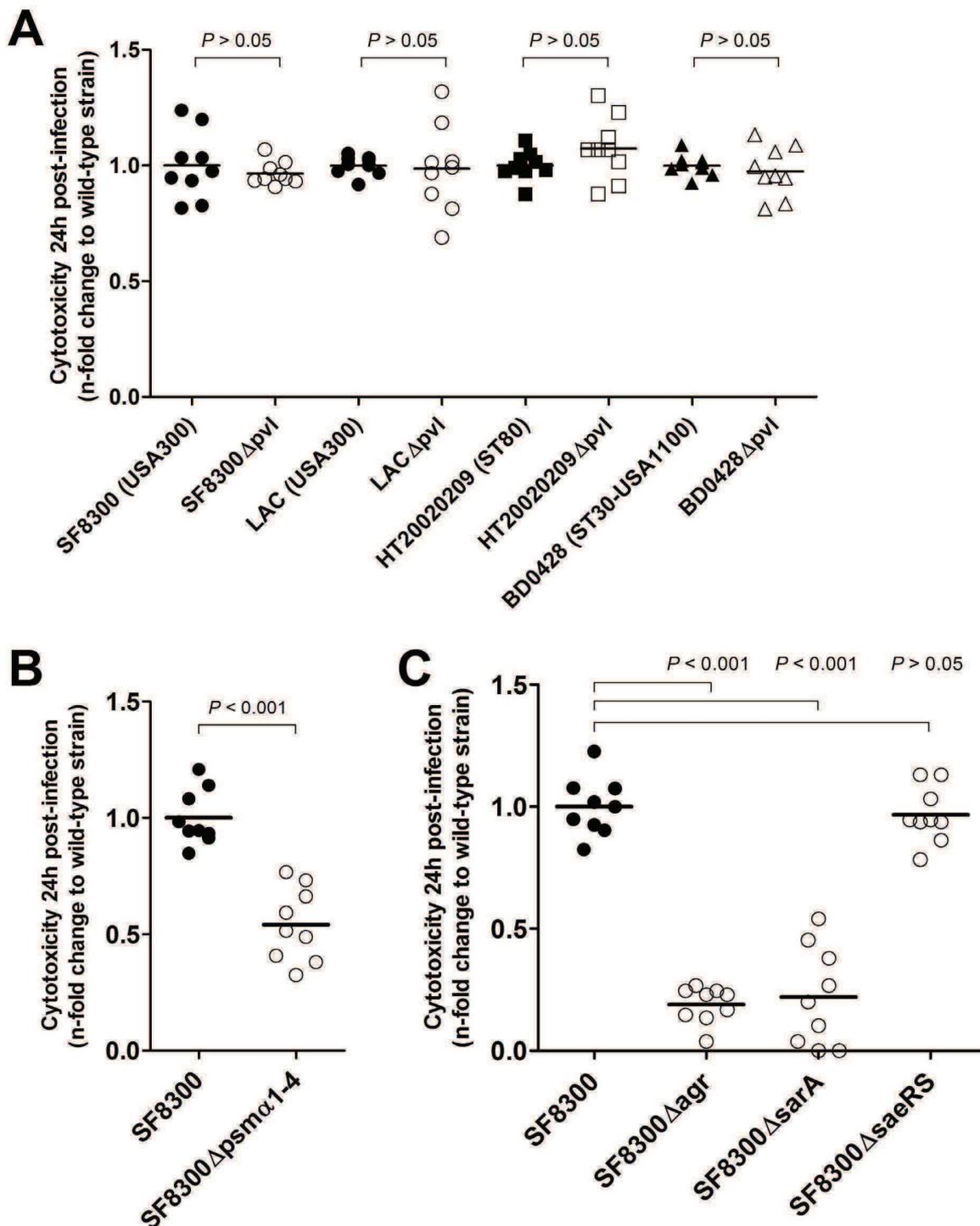


Figure 3. Impact of PVL, alpha-type PSMs and the major regulatory systems *agr*, *sarA*, and *saeRS* on the cytotoxicity of CA-MRSA toward osteoblasts. In all experiments, cytotoxicity was estimated by quantifying LDH release by CA-MRSA-infected MG-63 osteoblastic cells at 24 h post-infection. The results were derived from three independent experiments performed in triplicate and expressed as the n-fold change in LDH release of each isogenic deletion mutant (open marks) relative to the wild-type strain (closed marks). All *P*-values were calculated using Welch's *t*-test. (A) Effect of the inactivation of *pvl* genes on the cytotoxicity of genetically diverse CA-MRSA. No significant differences were observed between the cytotoxicity of the wild-type and Δ pvl strains, indicating that PVL is not involved in CA-MRSA-induced cytotoxicity toward osteoblasts. (B) Impact of the inactivation of the *psm* α 1-4 genes on the cytotoxicity of the USA300 CA-MRSA strain SF8300. The strain SF8300 Δ psm α 1-4 was significantly less cytotoxic than the wild-type strain, thus indicating that alpha-type PSMs are involved in the cytotoxic phenotype. (C) Impact of the inactivation of the *agr*, *sarA*, and *saeRS* genes on the cytotoxicity of strain SF8300. Strains SF8300 Δ agr and SF8300 Δ sarA, but not SF8300 Δ saeRS, were significantly less cytotoxic than the wild-type strain.
doi:10.1371/journal.pone.0063176.g003

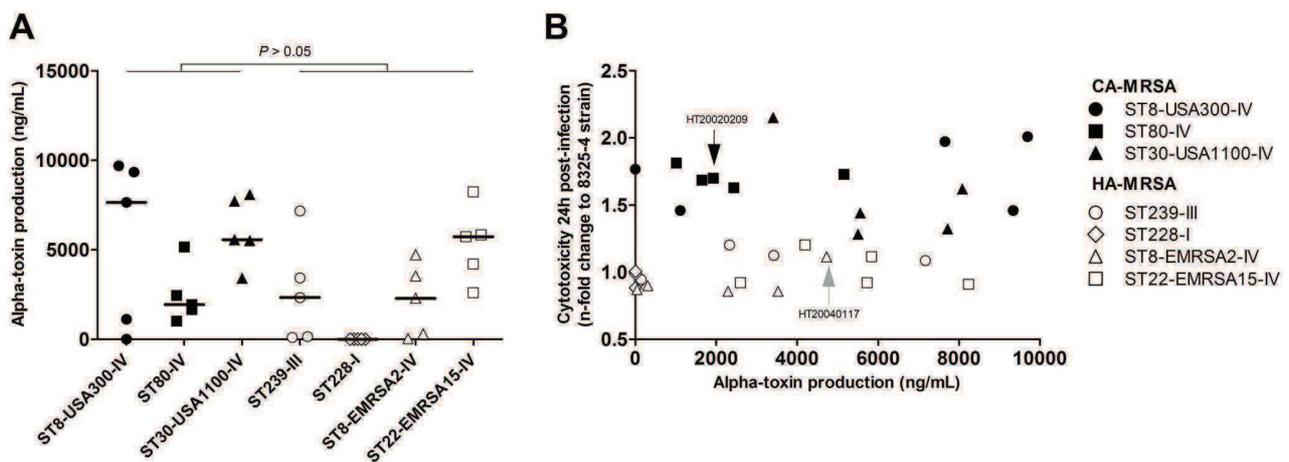


Figure 4. Comparison of alpha-toxin production in CA-MRSA and HA-MRSA strains. Alpha-toxin production in 24-h bacterial culture supernatants was quantified by sandwich ELISA. (A) Alpha-toxin production was not significantly different in the CA-MRSA and HA-MRSA strains, although strong variations were observed between different lineages and within the strains of a given lineage. Horizontal lines represent median values. The P -value was calculated using a non-parametric Mann-Whitney U -test. (B) Plot of MRSA cytotoxicity toward osteoblasts against alpha-toxin production. Note that one ST8-USA300-IV CA-MRSA strain had no measurable alpha-toxin production but was more cytotoxic than any of the HA-MRSA strains. Strains HT20020209 and HT20040117, which were included in the kinetics experiments of Figure 2, are indicated by arrows. doi:10.1371/journal.pone.0063176.g004

the alpha-toxin-deficient USA300 strain. Conversely, the alpha-toxin-deficient ST8-USA300-IV CA-MRSA strain was still more cytotoxic than any HA-MRSA strain. Collectively, these findings do not support a role of alpha-toxin in the increased cytotoxicity of CA-MRSA toward osteoblasts in our model.

Alpha-type PSMs are Required for Intracellular Virulence

PSMs are core genome-encoded amphipathic peptides that have been associated with CA-MRSA virulence in animal models [38–40] and are able to recruit, activate, and lyse neutrophils [38,41]. Several PSMs are present in *S. aureus* genome, mainly alpha- and beta-type PSMs and the delta-toxin. Among the PSM family members, alpha-type PSMs are the most strongly associated with neutrophil activation and virulence in animal model [38]. The cytotoxic phenotypes of the previously described CA-MRSA strain SF8300 and of its isogenic derivative SF8300 Δ *psm* α 1-4, which lacks alpha-type PSMs, were compared [42] (Figure 3B). The inactivation of the alpha-type PSMs induced a significant decrease in osteoblast damage after 24 h of incubation, indicating that the expression of alpha-type PSMs by CA-MRSA is associated with a cytotoxic phenotype.

PSM-controlling Regulators *agrA* and *sarA*, but not *saeRS*, are Required for Intracellular Virulence

Toxin expression in *S. aureus* is tightly controlled by a regulatory network involving several regulators, including *agr*, *sarA*, and *saeRS* [36]. All of these three regulators are required for alpha-toxin expression, while only *agrA* and *sarA* impact PSM expression [38,43]. The increased toxin expression and virulence of CA-MRSA strains has been attributed to the increased expression of these systems [36,44]. We thus investigated the respective contributions of each of these 3 regulators to cytotoxicity by constructing isogenic derivatives of strain SF8300 that lack *agrA*, *sarA*, or *saeRS*. Both the SF8300 Δ *agr* and SF8300 Δ *sarA* strains but not the SF8300 Δ *saeRS* strain induced significantly less damage in infected osteoblasts than the wild-type SF8300 strain (Figure 3C). These results indicate that the virulence determinants responsible for osteoblast death after invasion are under the control of *agrA*

and *sarA* but not *saeRS*, which is consistent with a major role of PSMs in intracellular virulence.

In vitro Transcript Levels of *psm* α , but not *hla* nor RNIII, are Associated with Cytotoxicity

To further investigate the correlation of PSMs and alpha-toxin expression with intracellular virulence, we quantified the transcript levels of *psm* α , *hla* and the *agr* effector RNIII using relative quantitative reverse-transcription PCR as described elsewhere with modifications [40]. Transcript levels were expressed as n-fold change to the *gyrB* internal standard and reported as the mean and 95% CI. The 35 clinical MRSA strains were included in these experiments, with the exception of 5 strains in which the RNA yield after extraction was consistently insufficient (ST239-III, $n=2$, and ST30-USA1100-IV, ST8-EMRSA2-IV and ST22-EMRA15-IV, $n=1$ each). Strains SF8300, SF8300 Δ *agr*, SF8300 Δ *sarA* and SF8300 Δ *saeRS* were also included. The relative levels of *psm* α and *hla* transcripts were both globally higher in CA-MRSA as compared to HA-MRSA (57.7 [31.3–84.0] vs. 13.9 [5.4–22.3], $P<0.01$, Welch's t -test, and 0.54 [0.23–0.85] vs. 0.11 [0.04–0.19], $P<0.05$, respectively; Figure 5A and 5C). The levels of RNIII transcripts were mostly strain- and lineage-dependent and showed no global difference between CA-MRSA and HA-MRSA (17.5 [8.84–26.2] vs. 18.7 [6.69–30.78], $P=0.87$; Figure 5E). Of note, the 5 ST228-I HA-MRSA strains were *agr*-defective. In univariate analysis, the relative cytotoxicity was strongly associated with the *psm* α transcript level ($P<0.001$) and, to a lesser extent, to the *hla* transcript level ($P<0.05$), but not to the RNIII transcript level. A strong rank correlation was found between the RNIII transcript levels and both *psm* α ($P<0.001$) and *hla* ($P<0.01$) transcript levels but these associations were not significant in linear regression. In multivariate analysis, the *psm* α transcript levels and the CA-MRSA or HA-MRSA group were independently associated with cytotoxicity ($P<0.05$ for both regression coefficients), but not the *hla* ($P=0.80$) nor the RNIII ($P=0.67$) transcript levels. As expected, transcripts of *hla* were undetectable in strains SF8300 Δ *agr*, SF8300 Δ *sarA* and SF8300 Δ *saeRS*. Transcripts of both *psm* α and RNIII were

undetectable in strain SF8300 Δ *agr* but were found at levels comparable to those of the wild-type strain in strains SF8300 Δ *sarA* and SF8300 Δ *saeRS*. These results are consistent with the recent report that the *saeRS* regulator has no significant impact on PSM expression, and that the *sarA* regulator does not regulate PSM transcription but mainly reduces the post-secretion degradation of PSMs by downregulating the expression of the aureolysin protease [43].

Discussion

The emergence of CA-MRSA as a cause of osteomyelitis has been associated with an increase in both the incidence and severity of this disease. A better understanding of the virulence mechanisms of CA-MRSA in osteomyelitis may help improve management strategies and establish targeted therapies. Our results indicate that the invasion of osteoblasts by CA-MRSA and the intracellular expression of *psm α* by such strains results in extensive cell damage. This potential virulence trait might contribute to the increased severity of osteomyelitis caused by CA-MRSA relative to that caused by canonical MRSA strains.

The invasion of osteoblasts by *S. aureus* has been extensively studied over the past decade, and interpretations of the clinical significance of this phenomenon have exclusively focused on chronic and indolent forms of osteomyelitis [22,23]. More specifically, the intracellular passage of bacteria has been considered a means by which *S. aureus* protects itself, escapes antibiotics and the immune response of the host, and establishes a latent bacterial reservoir that is potentially responsible for chronicity and recurrence [26,27]. In accordance with this interpretation, our investigations of the intracellular survival of HA-MRSA strains demonstrated the ability of these strains to persist within osteoblasts without causing extensive damage. Conversely, this interpretation of osteoblast invasion as an underlying mechanism for chronicity and indolence does not appear relevant to severe and acute CA-MRSA osteomyelitis. Indeed, our data indicate that an intracellular bacterial load of one CA-MRSA cell per osteoblast is sufficient to induce the death of half of the osteoblast population within 24 h (Figure 2). Hence, given the poor ability of the CA-MRSA strains to persist intracellularly and the extensive damage caused to infected host cells, it is more likely that osteoblast invasion by CA-MRSA is part of a pathogenesis strategy based on aggression and damage rather than self-protection, a view that is consistent with previous clinical observations [5,6,9,10,13].

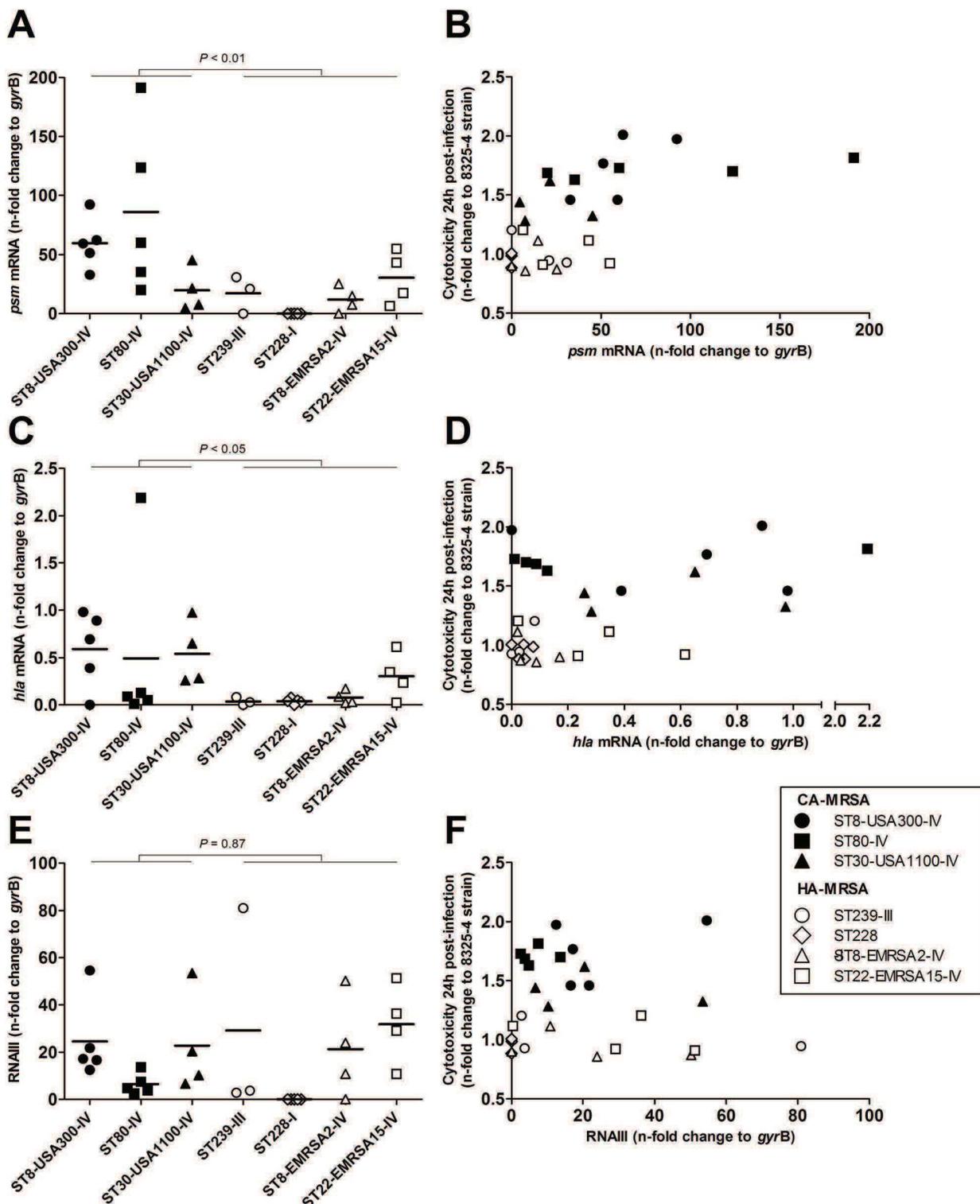
Alpha-toxin has previously been shown to induce apoptosis in endothelial cells infected with *S. aureus* [45] and to contribute to CA-MRSA pathogenesis in a murine model of pneumonia [46]. Alpha-toxin production and transcription tended to be higher in CA-MRSA than in HA-MRSA strains in our experiments, but several lines of evidence indicate that this toxin was not responsible for the death of the infected osteoblasts. First, we failed to demonstrate any association of alpha-toxin production with cytotoxicity; second, cytotoxicity was conserved in both the non-hemolytic USA300 strain and its hemolytic counterparts; and third, the 8325-4 reference strain, which had the highest alpha-toxin production among our strain collection, was less cytotoxic than any of the 15 CA-MRSA strains. Finally, the inactivation of *saeRS* in strain SF8300, which resulted in an alpha-toxin-deficient phenotype confirmed by undetectable *hla* transcript levels in quantitative reverse-transcription PCR assays, had no impact on cytotoxicity.

The contribution of PSMs to CA-MRSA virulence was first described in a murine model of skin and soft tissue infection [38].

The PSM family is comprised of several proteins: the δ -toxin, α -type PSMs 1-4, β -type PSMs 1-2, and the SCC*mec*-encoded PSM-*mec* (reviewed in [47]). Among these proteins, alpha-type PSMs were shown to be able to recruit, activate, and lyse neutrophils [38], thus exhibiting a role in pathogenesis that appeared similar to that of PVL. Whereas neutrophil chemotaxis and activation by PSMs occur at nanomolar concentrations and involve PSM detection by the neutrophil formyl peptide receptor 2 (FPR2) in vitro [48], neutrophil lysis requires micromolar concentrations of alpha-type PSMs, is receptor-independent [38,47,48], and is thought to involve lipid membrane disruption caused by the amphipathic alpha-helix structure of PSMs [38]. Interestingly, it has recently been shown that human serum components inhibit both the FPR2-activating and neutrophil lysis properties of PSMs, casting doubt on the relevance of PSMs as extracellular toxins [49]. Our findings that PSMs act as intracellular toxins are thus in line with the aforementioned observations. Indeed, *S. aureus* cells that invade non-professional phagocytes such as osteoblasts initially remain trapped in phagosomes [50]. It is thus likely that a sustained expression of PSMs in this confined environment allows these toxins to accumulate. However, the exact mechanism by which PSMs contribute to the death of the host cell are unknown. Of note, the overexpression of alpha-type PSMs by *S. aureus* is not associated with phagosomal escape [51]. Such escape, or at least the permeabilization of the phagosome membrane, has been shown to involve other factors such as delta-toxin. However, delta-toxin-mediated phagosome membrane disruption requires the presence of a functional beta-toxin [51], while it is well-known that most *S. aureus* clinical strains, including CA-MRSA, harbor a non-functional beta-toxin because of the insertion of various phages in the beta-toxin-encoding gene *hlyB* [28,52]. In this context, some authors have hypothesized that phagosomal escape in CA-MRSA might involve other delta-toxin co-factors that are still to be determined or, alternatively, that *S. aureus* exposure to reactive oxygen species in the phagosomal environment might induce the excision of the beta-toxin-converting phages, thus allowing a functional beta-toxin expression [53].

Using Δ *agr*, Δ *sarA*, and Δ *saeRS* mutants of the CA-MRSA strain SF8300, we demonstrated that only the first two regulators are related to the intracellular cytotoxic phenotype of CA-MRSA. These findings correlate with the major role of PSMs in this phenotype: (i) PSM secretion by *S. aureus* is under direct control of *agr* [38]; (ii) *sarA* reduces the post-secretion degradation of PSMs by downregulating the expression of the aureolysin (*aur*) protease and, to a lesser extent, regulates PSM secretion by upregulating *agr* [43]; and (iii) *saeRS* expression has no significant impact on PSM expression [43].

Previous research on the basis of CA-MRSA virulence in the specific context of osteomyelitis has understandably focused on the role of PVL. Cremieux et al. used a rabbit model of osteomyelitis to demonstrate that PVL contributes to the severity of infection in terms of bone deformation, extra-osseous involvement, and the systemic inflammatory response [18], in keeping with clinical observations in human [10,54]. These outcomes are most likely related to the potent pro-inflammatory properties of PVL, including the capacity of PVL to recruit, activate, and lyse immune cells at the site of infection. However, recent CA-MRSA research has emphasized the remarkably complex virulence mechanisms of these pathogens, as well as the risk of oversimplifying CA-MRSA virulence by considering only the individual action of a single bacterial factor [17]. The multiplicity and frequent functional redundancy of CA-MRSA virulence determinants are major obstacles to our understanding of CA-MRSA virulence [8], and a decade of intensive research has been



doi:10.1371/journal.pone.0063176.g005

necessary to outline an integrated view of the relative contributions of PVL and alpha-toxin to CA-MRSA pathogenesis [17]. In this context, our observation that CA-MRSA strains of several genetically distinct lineages share an enhanced ability to kill osteoblasts after intracellular passage through a PSM-dependent mechanism adds to our knowledge of the potential pathogenesis strategies of CA-MRSA. Put together, PSM-related killing of CA-MRSA-infected osteoblasts and PVL-related recruitment and lysis of immune cells sketch the outlines of a new model for CA-MRSA pathogenesis in osteomyelitis, in which concomitant intracellular and extracellular activity of this pathogen both contribute to local tissue damage. The relative contributions of indirect PVL-related tissue damage and of PSM-related post-invasion osteoblast killing in the clinical course of CA-MRSA osteomyelitis remain to be determined. To address this question, future studies should focus on animal models of osteomyelitis involving Δpvl , Δpsm and $\Delta pvl-psm$ CA-MRSA strains, and clinical investigations should examine potential correlations between the severity and acuteness of *S. aureus*-induced osteomyelitis and the strain-specific expression level of PSM.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

S. aureus strain 8325-4 was used as a reference in all experiments [55]. The strain collection of the French National Reference Center for Staphylococci (FNRCs) was searched for CA-MRSA and HA-MRSA isolates representative of prevalent CA-MRSA and HA-MRSA genotypes in Europe according to recent epidemiological data [4,28,30]. Five strains of each genotype were selected. The inclusion criteria were based on the molecular characteristics of each strain, as available in the FNRCs database, including the sequence type, SCCmec type, and the presence of the *pvl* and *entA* genes. Genotype-specific inclusion criteria were as follows: ST8, SCCmec IV, *pvl*⁺ for the ST8-USA300-IV clone; ST80, SCCmec IV, *pvl*⁺ for the ST80-IV European clone; ST30, SCCmec IV, *pvl*⁺ for the ST30-USA1100-IV Southwest Pacific clone; ST239, SCCmec III for the ST239-III Brazilian clone; ST228, SCCmec I for the ST228-I Southern German clone; ST8, SCCmec IV, *entA*⁺ for the ST8-EMRSA2-IV Lyon clone [29]; and ST22, SCCmec IV for the ST22-EMRSA15-IV Barnim clone. The lineage of each strain was subsequently confirmed using DNA microarray-based assignment (data not shown) [56]. Of note, DNA microarray results demonstrated that all strains but the 8325-4 strain harbored a non-functional, phage-converted beta-toxin-encoding gene. Clinical data were not considered in the strain selection process because the focus of the present study was the strain genotype; in addition, the number of MRSA strains in the FNRCs collection that had been isolated from documented osteomyelitis cases was too low to restrict the inclusion to such strains.

The strains were stored at -20°C in cryotubes. For each experiment, the strains were first cultivated on Columbia agar supplemented with sheep blood at 37°C for 24 h after thawing. One colony was then used to inoculate brain-heart infusion (BHI) broth. In cell culture infection experiments, the BHI broth was incubated overnight at 37°C , then diluted 5-fold in fresh BHI and further incubated with gyratory shaking for 3 h until mid-exponential phase was reached. Exponential phase cultures were preferred to stationary phase cultures because bacterial adhesins involved in host cell invasion are upregulated in the former [57].

Construction of Allelic Replacement CA-MRSA Mutants

The *pvl* genes (*lukS*-PV and *lukF*-PV) in the ST80-IV CA-MRSA strain HT20020209 were inactivated by allelic replacement. The $\Delta pvl::tetM$ mutant LUG1800 was obtained by using pMAD, a thermo-sensitive plasmid containing a constitutively expressed β -galactosidase gene, which allows the positive selection of double crossing over by detecting β -galactosidase activity on Xgal agar plates [58]. A 2.9-kb DNA fragment corresponding to the tetracycline resistance gene *tetM* [59] was cloned into pMAD between two DNA fragments generated by PCR (486 bp and 541 bp) that correspond respectively to the chromosomal DNA regions upstream of *lukS*-PV (up to the start codon) and downstream of *lukF*-PV (from codon 200 to the end). The resulting plasmid, pLUG934, conferred resistance to ampicillin and erythromycin and contained the *lacZ* gene. pLUG934 was electroporated into the *S. aureus* strain RN4220. As the plasmid from RN4220 could not be electroporated into HT20020209, transformation was achieved with phage Φ 11 by lysogenizing RN4220/pLUG934 and transfecting HT20020209. The transformants were grown at a non-permissive temperature (37°C) in the presence of $1.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ erythromycin to select cells in which the plasmid had been integrated into the chromosome by homologous recombination. To favor the second recombination event, a single colony was grown at 30°C for 10 generations and plated at 37°C overnight. Cells that had lost the plasmid vector through a double cross-over event were detected on Xgal agar plates. PCR amplification was used to confirm the loss of the *pvl* genes, which were replaced by the *tetM* gene in strain LUG1800.

The *pvl* genes in the ST30-USA1100-IV CA-MRSA strain BD0428 and the *hla*, *psm α 1-4*, *agrA*, *sarA*, and *saerS* genes in the ST8-USA300 CA-MRSA strain SF8300 were inactivated as described previously for the LAC $\Delta pvl::spc$ strain [34] by allelic replacement of the gene(s) of interest with a spectinomycin resistance cassette.

Cell Culture

All cell culture reagents were purchased from GIBCO (Paisley, UK). The human osteoblastic cell line MG-63 was purchased from LGC Standards (Teddington, UK) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL penicillin and streptomycin (culture medium) at 37°C and 5% CO_2 . The cells were subcultured twice a week and used up to passage 10 after thawing.

MG-63 Cell Invasion Assay

The intracellular infection of MG-63 cells was performed as described elsewhere with modifications [60]. MG-63 cells were seeded at 50,000 cells/well in 24-well plates and incubated at 37°C with 5% CO_2 for 48 h in culture medium. Suspensions of mid-exponential phase bacterial cultures were washed, sonicated to minimize clumping, and resuspended in antibiotic-free culture medium at a concentration corresponding to an MOI of 100. The bacterial concentration was normalized using clone-specific regression formulas correlating bacterial density (CFU/mL) with OD at 600 nm, which were established in preliminary experiments. The MOIs were subsequently confirmed by plating the suspensions on agar and counting the bacterial colonies. The MG-63 cells were washed twice in DMEM to remove antibiotics, and normalized bacterial suspensions were added to the wells. The infected cultures were incubated for 30 min at 4°C to allow the bacteria to sediment while blocking internalization, and all of the cultures were simultaneously transferred to 37°C to synchronize the beginning of the internalization step. After a 2 h incubation,

the infected cells were washed and further incubated for 1 h in culture medium containing 200 mg/L gentamicin and 10 mg/L lysostaphin to rapidly kill extracellular but not intracellular bacteria. Several strains exhibited decreased susceptibility to gentamicin or lysostaphin when used individually (data not shown), and thus the use of a gentamicin/lysostaphin combination ensured a constant bactericidal activity as verified in preliminary experiments by controlling the sterility of culture supernatants (data not shown). In experiments with time points of 24 and 48 h, the cultures were further incubated for the indicated time in medium containing 40 mg/L gentamicin and 10 mg/L lysostaphin. These lower concentrations resulted in the killing of bacteria cells released upon host cell lysis, thus preventing these bacteria from infecting new host cells. Infected cells that enter apoptosis or necrosis undergo membrane leakage, resulting in the release of the cytosolic enzyme LDH into the culture supernatant, where it can be quantified. At each indicated time point, the cell culture supernatant was removed, and the LDH activity was assessed using a colorimetric method with a Dimension Vista automated clinical chemistry analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY). Cell monolayers were washed to remove antibiotics, lysed by osmotic shock in pure sterile water, and extensively pipetted to achieve the full release of the internalized bacteria. Cell lysates were then sonicated to minimize clumping of the bacteria and spiral-plated in duplicate on agar using a WASP automated plater (AES Chemunex, Bruz, France). After 24 h of incubation, the colonies were enumerated using an EasyCount automated plate reader (AES Chemunex). Due to the large number of experiments required to compare the different MRSA lineages and isogenic MRSA strains, the LDH release and intracellular bacterial counts were expressed relative to the results of the 8325-4 reference strain in experiments involving clinical strains or relative to the respective wild-type strain of each isogenic mutant in experiments involving gene inactivation to control for inter-experiment variations. Conversely, experiments investigating intracellular bacterial survival kinetics, as well as those investigating osteoblast mortality using two representative isolates of ST80-IV (HT20020209) and ST8-EMRSA2-IV (HT20040117), were conducted using three consecutive passages of MG-63 cells. The inter-experiment variation was negligible in these experiments, and thus data normalization was not required. To estimate the number of viable bacteria per viable osteoblast at each time point, the number of viable osteoblasts was quantified microscopically using Trypan blue exclusion, and the numbers of viable intracellular bacteria were quantified as mentioned above. To estimate the percent mortality of osteoblasts 24 h post-infection, LDH release into the supernatant of infected cells was compared to that of uninfected cells that were either left intact (lower control) or fully lysed by osmotic shock (higher control). The percent mortality was calculated as follows: $(\text{LDH infected cells} - \text{LDH lower control}) / (\text{LDH higher control} - \text{LDH lower control})$.

Alpha-toxin Quantification

Alpha-toxin production by the CA-MRSA and HA-MRSA strains was assessed by means of a sandwich ELISA. In brief, the wells of microtiter plates were coated with an anti-alpha-toxin murine monoclonal antibody (kindly provided by GSK Biologicals) in PBS overnight at room temperature. The unbound monoclonal antibody was washed out twice with a blocking solution of PBS-Tween (0.05%) and milk (5 g/L), followed by incubation with the blocking solution for 1 h at room temperature. Standard dilutions of recombinant alpha-toxin and 24 h bacterial culture supernatant were added to duplicate wells, incubated for 1 h at 37°C, and washed three times, followed by the addition of a

rabbit polyclonal anti-alpha-toxin antibody (GSK Biologicals). The microplates were incubated for 1 h at 37°C and washed. Subsequently, a horseradish peroxidase-conjugated swine anti-rabbit polyclonal antibody (DAKO SAS, Trappes, France) was added. The microplates were incubated for 1 h at 37°C and washed before the addition of the tetramethylbenzidine substrate (Sigma Aldrich). The reaction was stopped with H₂SO₄ after 30 min, and the plates were read at 450 nm in a microplate reader (Model 680, Bio-Rad). The sandwich ELISA has a lower limit of detection of 2 ng/mL.

Relative Quantitative Reverse-transcription PCR

Overnight bacterial cultures were used to inoculate a BHI broth and incubated at 37°C with gyratory shaking at 200 rpm. Bacteria were harvested after 10 h to reach the post-exponential growth phase in which the *agr* regulator is activated, in order to approximate the *agr*-activated state of bacteria entrapped in phagosomes [61]. Culture aliquots of 1 mL were centrifuged at 13,000 g, and the pellets were washed with 1 mL of 10 mM Tris buffer and adjusted to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 1, corresponding to approximately 10⁹ *S. aureus* cells/mL. One mL of adjusted and washed bacterial suspension was centrifuged at 13,000 g, and the pellets were treated with lysostaphin (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 200 mg/L. The total RNA of the pellets was then purified using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The RNA yield was assessed by UV absorbance, and 1 µg of total RNA was reverse transcribed using the Reverse Transcription System (Promega) with random primers, as recommended by the provider. The resulting cDNA was used as the template for real-time amplification of *gvrB*, *psmα*, RNAIII and *hla* using previously published primers [40]. The relative amounts of the *psmα*, RNAIII and *hla* amplicons were determined by quantitative PCR and expressed as fold-change to the *gvrB* internal standard as described elsewhere [62].

Statistical Analysis

The normality of the data was assessed by visually inspecting the distributions. Two-group differences were analyzed using a two-tailed Welch's *t*-test for normal data with sufficient sample size ($n \geq 9$) or a two-tailed Mann-Whitney *U*-test for either non-normal data or data with small sample size ($n < 9$). Multiple pairwise comparisons of the means were performed using ANOVA with Tukey's HSD post-hoc test. Associations of numeric response variables with either numeric or categorical input variables were performed by linear regression. The significance of the regression coefficients was analyzed using Fisher's *F*-test. Simple linear regression was performed first. Multiple linear regression was then used to control for the CA-MRSA or HA-MRSA status of the strains using a one-step forward selection procedure in which the CA-MRSA or HA-MRSA status was included as the first input variable, followed by the inclusion of the test variable. The test variables were considered to be independently associated with the response variable when their regression coefficient was significant in multiple linear regression analysis. The significance threshold was set at 0.05 for all tests. The statistical analyses were performed by means of R software version 2.14 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Supporting Information

Table S1 A comparison of distinct lineages of CA-MRSA and HA-MRSA with respect to cytotoxicity toward

human osteoblasts, intracellular survival and alpha-toxin production.

(PDF)

Acknowledgments

The authors would like to thank the bacteriologists throughout the world who sent CA-MRSA and HA-MRSA strains to the FNRCSC; C. Hayraud,

C. Courtier, C. Gardon, and C. Bouveyron for expert technical help; P.J. Bondon for performing the LDH assays; and T. Henry for helpful advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPR FV FL. Performed the experiments: JPR STA AS YL JR FC CB YB MB. Analyzed the data: JPR. Contributed reagents/materials/analysis tools: TF BAD ST GL JE FV. Wrote the paper: JPR FV JE FL.

References

- Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. *Lancet* 364(9431): 369–379.
- Daver NG, Shelburne SA, Atmar RL, Giordano TP, Stager CE, et al. (2007) Oral step-down therapy is comparable to intravenous therapy for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *J Infect* 54(6): 539–544.
- Jevons MP, Coe AW, Parker MT (1963) Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* 1(7287): 904–907.
- Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375(9725): 1557–1568.
- Arnold SR, Elias D, Buckingham SC, Thomas ED, Novais E, et al. (2006) Changing patterns of acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis: emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pediatr. Orthop.* 26(6): 703–708.
- Vander Have KL, Karmazyn B, Verma M, Caird MS, Hensinger RN, et al. (2009) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute musculoskeletal infection in children: a game changer. *J Pediatr Orthop* 29(8): 927–931.
- Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, et al. (2005) Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis* 40(12): 1785–1791.
- David MZ, Daum RS (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 23(3): 616–687.
- Gonzalez BE, Martinez-Aguilar G, Hulten KG, Hammerman WA, Coss-Bu J, et al. (2005) Severe staphylococcal sepsis in adolescents in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics* 115(3): 642–648.
- Martinez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, Hammerman W, Mason EO Jr, et al. (2004) Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 23(8): 701–706.
- Gwynne-Jones DP, Stott NS (1999) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cause of musculoskeletal sepsis in children. *J Pediatr Orthop* 19(3): 413–416.
- Gerber JS, Coffin SE, Smathers SA, Zaoutis TE (2009) Trends in the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in children's hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* 49(1): 65–71.
- Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO Jr, Gonzalez BE, Hammerman WA, et al. (2006) Pantone-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics* 117(2): 433–440.
- Wilke GA, Bubeck Wardenburg J (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(30): 13473–13478.
- Gouaux E (1998) Alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J Struct Biol* 121(2): 110–122.
- Nygaard TK, Pallister KB, Dumont AL, Dewald M, Watkins RL, et al. (2012) Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS One* 7(5): e36532.
- Otto M (2010) Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 64: 143–162.
- Cremieux AC, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Cote JF, et al. (2009) Pantone-Valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS One* 4(9): e7204.
- Widada A, Claro T, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW (2011) *Staphylococcus aureus* protein A plays a critical role in mediating bone destruction and bone loss in osteomyelitis. *PLoS One* 7(7): e40586.
- Claro T, Widada A, O'Seaghdha M, Mijalovic H, Foster TJ, et al. (2012) *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS One* 6(4): e18748.
- Claro T, Widada A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien FJ, et al. (2013) *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiology* 159(Pt 1): 147–154.
- Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, et al. (2006) Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* 24(1): 87–93.
- Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, et al. (2003) Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* 85(6): 918–921.
- Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, et al. (1999) Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* 67(5): 2677–2681.
- Webb LX, Wagner W, Carroll D, Tyler H, Coldren F, et al. (2007) Osteomyelitis and intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *J Surg Orthop Adv* 16(2): 73–78.
- Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, et al. (2010) *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis* 202(7): 1031–1040.
- Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, et al. (2011) *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 3(3): 129–141.
- Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, et al. (2007) Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* 13(4): 594–600.
- Dauwalder O, Lina G, Durand G, Bes M, Meugnier H, et al. (2008) Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 46(10): 3454–3458.
- Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, et al. (2010) Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 7(1): e1000215.
- Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, et al. (2005) *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 115(11): 3117–3127.
- Said-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, et al. (2005) Differential distribution and expression of Pantone-Valentine leukocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 43(7): 3373–3379.
- Badiou C, Dumitrescu O, Croze M, Gillet Y, Dohin B, et al. (2008) Pantone-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clin Microbiol Infect* 14(12): 1180–1183.
- Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, et al. (2006) Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis* 194(12): 1761–1770.
- Diep BA, Chan L, Tattavin P, Kajikawa O, Martin TR, et al. (2010) Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(12): 5587–5592.
- Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Adem PV, Lee JC, Husain AN, et al. (2008) Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. *J Infect Dis* 198(4): 561–570.
- Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR (2011) Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* 111(1): 117–151.
- Wang R, Braughton KR, Kretscher D, Bach TH, Queck SY, et al. (2007) Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13(12): 1510–1514.
- Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, et al. (2011) Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* 204(6): 937–941.
- Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, et al. (2010) Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Infect Dis* 202(12): 1866–1876.
- Rautenberg M, Joo HS, Otto M, Peschel A (2011) Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *Faseb J* 25(4): 1254–1263.
- Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, et al. (2012) Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol* 14(7): 1019–1036.
- Zielinska AK, Beenken KE, Joo HS, Mrak LN, Griffin LM, et al. (2011) Defining the strain-dependent impact of the staphylococcal accessory regulator (*sarA*) on the alpha-toxin phenotype of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 193(12): 2948–2958.

44. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS (2010) Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PLoS One* 5(12): e15177.
45. Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, Strangfeld K, Wagner B, et al. (2005) Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol* 7(8): 1087–1097.
46. Bubeck-Wardenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O (2007) Poring over pores: alpha-hemolysin and Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* 13(12): 1405–1406.
47. Vandenesch F, Lina G, Henry T (2012) *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2: 12.
48. Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, Wang R, Koberle M, et al. (2010) Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 7(6): 463–473.
49. Surewaard BG, Nijland R, Spaan AN, Kruijzer JA, de Haas CJ, et al. (2012) Inactivation of staphylococcal phenol soluble modulins by serum lipoprotein particles. *PLoS Pathog* 8(3): e1002606.
50. Sinha B, Fraunholz M (2010) *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* 300(2–3): 170–175.
51. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, Dittmann S, Steiner T, et al. (2011) Expression of delta-toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of beta-toxin. *Cell Microbiol* 13(2): 316–329.
52. van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA (2006) The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 188(4): 1310–1315.
53. Fraunholz M, Sinha B (2012) Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 43.
54. Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, et al. (2007) Pediatric bone and joint infections caused by Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J* 26(11): 1042–1048.
55. Sjöström JE, Lindberg M, Philipson L (1973) Competence for transfection in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 113(2): 576–585.
56. Monecke S, Slickers P, Ehrlich R (2008) Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53(2): 237–251.
57. Saravia-Otten P, Müller HP, Arvidson S (1997) Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. *J Bacteriol* 179(17): 5259–5263.
58. Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70(11): 6887–6891.
59. Nesin M, Svec P, Lupski JR, Godson GN, Kreiswirth B, et al. (1990) Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, tetA(M), from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 34(11): 2273–2276.
60. Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Vandenesch F, et al. (2011) A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods* 86(2): 145–149.
61. Qazi SN, Council E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, et al. (2001) agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun* 69(11): 7074–7082.
62. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, et al. (2007) *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315(5815): 1130–1133.

QUATRIEME PUBLICATION :

Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus* : a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation

La chronicisation des IOA staphylococciques représente un écueil majeur au cours de la prise en charge des patients. Malgré une prise en charge chirurgicale et une antibiothérapie optimales, de nombreux échecs thérapeutiques caractérisés par la persistance de l'infection sous traitement ou la récurrence à distance de l'épisode initial, sont décrits (environ 10% des cas). Toutefois, la définition même de l'infection chronique reste peu précise. Les recommandations nationales et internationales actuelles proposent que la définition de la chronicité des IOA soit basée sur un délai d'évolution supérieur à 3 à 4 semaines entre le début des symptômes et la prise en charge. Cependant, cette définition reste très arbitraire, ne s'appuyant sur aucun substrat objectif biologique ou microbiologique. Pourtant l'intérêt d'avoir une définition solide et robuste apparaît capitale lorsque l'on sait que ces mêmes recommandations préconisent des prises en charge, notamment chirurgicales, diamétralement différentes des IOA aiguës ou chroniques. Par exemple, l'ablation totale du matériel orthopédique en cas d'IOA chronique est préconisée, alors qu'un traitement conservateur, avec simple lavage et débridement, est envisageable en cas d'IOA aiguë.

La recherche de marqueurs objectifs de chronicité pouvant guider les indications de prise en charge des IOA semble donc essentielle, et constitue un « graal » microbiologique et clinique dans le domaine des IOA.

Détaillés dans la partie bibliographique, les différents travaux menés pour comprendre les particularités physiopathologiques des IOA à *S. aureus*, et identifier les facteurs impliqués dans le passage à la chronicité, ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes souvent intriqués, i) l'existence de résistances acquises aux antibiotiques, ii) la capacité de *S. aureus* à développer du biofilm, iii) la sanctuarisation de la bactérie à l'intérieur des

ostéoblastes, iv) la modification du génome ou du transcriptome de la bactérie conduisant à des processus adaptatifs, notamment le passage au phénotype SCV. Toutefois, la grande majorité de ces études ont porté sur des souches de laboratoire, et visaient à décrire les mécanismes fondamentaux impliqués dans ces voies supposées de récurrence et de chronicité.

Comme nous l'avons montré précédemment, nous avons pu mettre en évidence, en utilisant différents clones circulants de MRSA, que ceux d'origine hospitalière, usuellement associés à des formes indolentes et chroniques d'IOA, étaient plus internalisés et moins cytotoxiques que les MRSA communautaires, classiquement responsables d'IOA aiguës et très symptomatiques. Ces résultats attestent clairement que la persistance des staphylocoques et leurs pouvoirs cytotoxiques sont des mécanismes physiopathologiques influençant la présentation clinique des infections. Toutefois, les associations établies entre les résultats obtenus *in vitro* de cytotoxicité induites par certains clones et la présentation clinique des IOA ont été réalisées à l'aide de données issues de la littérature et non pas sur des données cliniques relatives aux patients.

En utilisant une large collection de souches de staphylocoques sensibles à la méticilline (MSSA) de fond génétique très divers, les objectifs du travail présenté dans cette quatrième publication ont été de : i) corrélérer, pour chaque souche, les capacités de formation de biofilm, d'internalisation dans les ostéoblastes et de switch intra-cellulaire pour le phénotype SCV avec le tableau clinique des patients, et, ii) de rechercher un marqueur objectif de chronicité pouvant guider les options possibles de prise en charge des IOA. Pour cela, la capacité de formation de biofilm a été mesurée par la technique de cristal violet pour la formation de biofilm mature, et par la technique de biofilm ring testTM pour le biofilm précoce. Les capacités d'internalisation, de formation de SCV en intracellulaire et de cytotoxicité ont été réalisées dans un modèle *in vitro* d'infection cellulaire en utilisant une variante de la technique de « gentamicin protection assay ».

En utilisant comme seul critère de corrélation la durée d'évolution réellement observée chez les patients, les résultats obtenus suggèrent que la persistance dans les ostéoblastes est corrélée à la durée d'évolution de l'IOA. Ces résultats valident pour la première fois l'hypothèse du rôle de l'internalisation de *S. aureus* au sein des ostéoblastes dans le passage à la chronicité au cours IOA. L'interprétation du rôle du switch phénotypique intracellulaire vers les SCV est plus délicate. Alors que ce mécanisme est classiquement associé à la chronicité des IOA, nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence significative. Ceci peut s'expliquer sans doute par la grande variabilité des mesures observées. Cependant, il n'existe actuellement pas de définition phénotypique de ce morphotype. La plupart des études se basent en effet sur la taille des colonies [156]. En utilisant une méthode de comptage informatisée à partir de photos des géloses obtenues, nous avons tenté de standardiser cette mesure. Cependant, la variabilité des résultats obtenus suggère qu'une définition uniquement basée sur la taille des colonies est probablement insuffisante.

L'utilisation des critères métaboliques définissant les SCV, et notamment l'auxotrophie pour l'hémine ou la ménadione, pourrait en partie aider à résoudre ce problème. Nous pourrions ainsi imaginer une étude similaire en se basant sur ces critères biochimiques, toutefois lourds en termes de contraintes économiques et de temps.

Ces travaux nous ont également permis de montrer qu'il existait une corrélation entre la dysfonction d'un des principaux systèmes de régulation de la virulence chez *S. aureus*, le système *agr*, et le caractère chronique des IOA. Cette corrélation a été possible grâce à au développement de la nouvelle technologie MALDI-TOF-MS. En effet, la fonctionnalité du système *agr*, se traduit notamment par la sécrétion de la delta-hémolysine. Or, cette toxine est facilement détectable par spectrométrie de masse par la nouvelle technologie MALDI-TOF-MS, utilisée en routine au laboratoire pour l'identification bactérienne. Cette observation corrobore les données obtenues par d'autres auteurs sur les bactériémies, les infections respiratoires ou encore de matériel endovasculaire [208-210]. La corrélation entre la dysfonction du système *agr*, et le caractère chronique des IOA est appuyée par le fait que nous ayons également montré l'association de cette dysrégulation du système *agr* avec les mécanismes phénotypiques associés à la chronicité, et notamment l'internalisation dans les ostéoblastes et la formation de biofilm. Ce dernier point renforce également l'hypothèse de certains auteurs selon laquelle la relation déficience du système *agr* - chronicité des infections staphylococciques est en partie liée à une capacité augmentée de formation de biofilm [211, 212].

Ainsi, nos résultats suggèrent que la détection de la delta-hémolysine par la nouvelle technologie MALDI-TOF-MS pourrait représenter la première méthode objective d'évaluation du degré de chronicité d'une IOA directement au moment du diagnostic, permettant ainsi d'améliorer la prise en charge initiale des patients.

1
2
3 **1 Original article**

4
5 **2 Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone**
6
7 **3 and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation**
8
9
10 **4**

11
12 Florent Valour^{1,2,3,4}, Jean-Philippe Rasigade^{2,3,4}, Sophie Trouillet-Assant³, Julie Gagnaire²,
13
14 Anissa Bouaziz¹, Judith Karsenty¹, Céleste Lacour², Michèle Bes^{2,3}, Sébastien Lustig^{3,4,5},
15
16 Thomas Bénet⁶, Christian Chidiac^{1,3,4}, Jérôme Etienne^{2,3,4}, François Vandenesch^{2,3,4}, Tristan
17
18 Ferry^{1,3,4}, Frédéric Laurent^{2,3,4}, on behalf of the Lyon BJI study group
19
20
21 **9**

22
23 **10 1:** Department of Infectious Diseases, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

24
25 **11 2:** Department of Microbiology, French National Reference Center for Staphylococci,
26
27 Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

28
29 **12 3:** INSERM U1111, International Centre for Infectiology Research, Lyon, France

30
31 **13 4:** Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

32
33 **14 5:** Orthopedic Surgery department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

34
35 **15 6:** Department of Infection Control and Epidemiology, Hospices Civils de Lyon, Edouard
36
37 Herriot Hospital, Lyon, France
38
39
40
41 **18**

42
43 **19 RUNNING TITLE:** Delta-toxin detection for MSSA BJI chronicity diagnosis
44
45
46
47 **20**

48
49 **21 CORRESPONDING AUTHOR:** Florent Valour; Hospices Civils de Lyon, Groupement
50
51 Hospitalier Nord, Laboratoire de Bactériologie; 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004
52
53 Lyon – France; Phone: 00.33.4.72.07.18.37; Fax: 00.33.4.72.07.18.42; Email address:
54
55 florent.valour@chu-lyon.fr
56
57
58
59
60

26 **ABSTRACT**

27

28 Biofilm formation, intra-osteoblastic persistence, small colony variants (SCVs), and the
29 dysregulation of *agr*, the major virulence regulon, are possibly involved in staphylococcal
30 bone and joint infection (BJI) pathogenesis. We aimed to investigate the contributions of
31 these mechanisms among a collection of 95 *Staphylococcus aureus* clinical isolates from 64
32 acute (67.4%) and 31 chronic (32.6%) first episodes of BJI. The included strains were
33 compared for internalization rate, cell damage, and SCV intracellular emergence using an *ex*
34 *vivo* model of human osteoblast infection. Biofilm formation was assessed in a microbead
35 immobilization assay (BioFilm Ring test). Virulence gene profiles were assessed by DNA
36 microarray. Seventeen different clonal complexes were identified among the screened
37 collection. The staphylococcal internalization rate in osteoblasts was significantly higher for
38 chronic than acute BJI isolates, regardless of the strain genetic background. Conversely, no
39 differences regarding cytotoxicity, SCV emergence, biofilm formation, and virulence gene
40 distribution were observed. Additionally, *agr* dysfunction, detected by the lack of delta-toxin
41 production using whole cell matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight
42 (MALDI-TOF) analysis (n=15; 15.8%), was significantly associated with BJI chronicity,
43 osteoblast invasion, and biofilm formation. These findings provide new insights into MSSA
44 BJI pathogenesis, demonstrating the correlation between chronicity and staphylococcal
45 osteoblast invasion. This adaptive mechanism, along with biofilm formation, is associated
46 with *agr* dysfunction, which can be routinely assessed by delta-toxin detection using MALDI-
47 TOF spectrum analysis, providing clinicians with a diagnostic marker of BJI chronicity at the
48 time of diagnosis.

49 **KEYWORDS:** *Staphylococcus aureus*; Bone and joint infection; Osteoblast invasion, biofilm
50 formation; delta-toxin; MALDI-TOF-MS.

1
2
3 51 **INTRODUCTION**
4
5 52
6

7 53 *Staphylococcus aureus* bone and joint infections (BJI) are described as difficult-to-treat
8
9 54 clinical entities due to frequent bacterial persistence leading to chronicity and relapse [1, 2].
10
11 55 The management strongly differs between acute BJI, for which debridement with implant
12
13 56 retention is recommended, and chronic forms, which require the removal of any orthopedic
14
15 57 implants [3]. Consequently, the initial recognition of the chronic nature of the infection
16
17 58 represents a major therapeutic issue, which is currently arbitrarily based on an evolution delay
18
19 59 over 3 to 4 weeks, without any reliable biological substrate.
20
21

22 60 Staphylococcal BJI chronicity has been associated with three bacterial virulence mechanisms
23
24 61 providing protection against the host immune system and antimicrobials: i) biofilm formation
25
26 62 [4, 5]; ii) the invasion and persistence in non-professional phagocytic host cells, including
27
28 63 osteoblasts, which represents a bacterial reservoir responsible for recurrence [6-8]; and iii)
29
30 64 bacterial phenotype switching to small-colony variants (SCVs) [9-11]. Furthermore, the
31
32 65 dysregulation of accessory gene regulator (*agr*), a major regulon controlling the expression of
33
34 66 a plethora of *S. aureus* virulence factors, has been associated with persistent infections [12-
35
36 67 14].
37
38

39 68 In this context, we aimed to assess these different phenotypic and molecular bacterial markers
40
41 69 for clinical relevance toward early identification of BJI chronicity at the time of diagnosis.
42
43
44
45

46
47 71 **MATERIALS AND METHODS**
48
49 72

50
51 73 **Ethical statements.** This study received the approval of the French South-East ethics
52
53 74 committee (reference number 2013-018).
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 76 **BJI definitions.** All methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates responsible for a first
4
5 77 episode of BJI in our institution from 2001 to 2011 were considered for inclusion. Patients
6
7 78 with diabetic foot- and decubitus ulcer-related BJI were excluded because of the particular
8
9 79 pathophysiology and management of these infections. Corresponding clinical data were
10
11 80 retrospectively collected from medical records on a standardized case record form, and
12
13 81 included demographic characteristics and patient comorbidities (summarized in the modified
14
15 82 Charlson comorbidity index), BJI clinical presentation, presence of biological inflammatory
16
17 83 syndrome (i.e., C-reactive protein [CRP] plasma level ≥ 10 mg/L and/or white blood cell
18
19 84 [WBC] count $\geq 10,000/\text{mm}^3$), and outcome. BJI were defined as acute (infection lasting for ≤ 4
20
21 85 weeks) or chronic infections. Treatment failure included i) persistent infection under
22
23 86 appropriate antimicrobial therapy, including the need of new surgery >5 days after the first
24
25 87 one and/or ii) relapse after antimicrobial disruption.
26
27
28
29
30

31
32 89 **Evaluation of staphylococcal interaction with human osteoblasts.** Staphylococcal
33
34 90 interaction with osteoblasts was assessed in a gentamicin protection assay, as previously
35
36 91 described [15-17]. All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United
37
38 92 Kingdom).
39

40
41 93 *MG63 osteoblastic cell culture.* The human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427),
42
43 94 purchased from LGC standard (USA), was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium
44
45 95 (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100
46
47 96 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Prior to assays, the osteoblasts were seeded at
48
49 97 40,000 cells per well into 24-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in
50
51 98 1 mL of growth medium and were cultured for 2 days until 70-80% confluence.
52

53
54 99 *Bacterial suspension standardization and infection.* Overnight staphylococcal culture
55
56 100 suspensions were diluted 5-fold in fresh BHI and further incubated with gyratory shaking for
57
58
59
60

1
2
3 101 3 h at 37°C to obtain mid-exponential-phase cultures. These suspensions were washed,
4
5 102 sonicated to minimize clumping, and resuspended in antibiotic-free medium at a
6
7 103 concentration corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of 100, using the following
8
9 104 previously established regression formula correlating bacterial density (CFU/mL) with optical
10
11 105 density at 600 nm (OD₆₀₀): $CFU/mL = 7.10^8 \times OD_{600} - 3.10^7$ (data not shown). The
12
13 106 normalized bacterial suspensions were then added to osteoblast cultures. After 2h of co-
14
15 107 culture, the infected osteoblasts were incubated for 24h in the presence of gentamicin (PAA,
16
17 108 Pasching, Austria) to kill the remaining extracellular bacteria and the bacteria released upon
18
19 109 host cell lysis, thus preventing them from infecting new host cells.

20
21
22 110 *Evaluation of staphylococcal-induced cytotoxicity.* After 24h, lactate dehydrogenase (LDH)
23
24 111 release from damaged cells was quantified in the cell culture supernatant using a colorimetric
25
26 112 method with a Dimension Vista automated clinical chemistry analyzer (Siemens Healthcare
27
28 113 Diagnostics, Tarryton, NY). The percent mortality of osteoblasts was assessed by comparing
29
30 114 LDH release into the infected cell supernatant to that of uninfected cells that were either left
31
32 115 intact (lower control) or fully lysed by osmotic shock (higher control) and was calculated as
33
34 116 follows: $(LDH \text{ infected cells} - LDH \text{ lower control}) / (LDH \text{ higher control} - LDH \text{ lower}$
35
36 117 $\text{control})$.

37
38
39 118 *Quantification of internalized bacteria.* The osteoblasts were subsequently lysed by a 10-min
40
41 119 incubation period in sterile water. Suspension dilutions of these lysates were spiral-plated
42
43 120 using a WASP automated plater (AES Chemunex, Bruz, France). Colonies were enumerated
44
45 121 using an EasyCount automated plate reader (AES Chemunex).

46
47
48 122 *Evaluation of SCV phenotype switching.* Automated computer image analysis software
49
50 123 (ImageJ, Rasband, W.S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2012)
51
52 124 was used to number SCVs, arbitrary defined as colonies with areas smaller than one-fifth of
53
54 125 the median area measured for all colonies on each plate.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 126 Each strain was evaluated in duplicate in a single experiment. The *S. aureus* 8325-4
4
5 127 laboratory strain, which has been well characterized with regard to its capacity to invade
6
7 128 osteoblasts, was used as a control in each experiment [15, 16]. LDH release and intracellular
8
9 129 bacterial counts were expressed relative to the 8325-4 reference strain.
10

11
12 130

13
14 131 **Biofilm formation.** The biofilm formation capacities of 40 randomly selected strains were
15
16 132 explored using the BioFilm Ring test (BioFilm Control, Saint Beauzire, France), as described
17
18 133 by Chavant et al [18]. Briefly, this technique is based on the immobilization of magnetic
19
20 134 microbeads when embedded in bacterial biofilms. After adjusting the OD₆₀₀ of overnight
21
22 135 bacterial suspensions at 1+/-0.05, the suspensions were diluted 1:250 in fresh BHI, mixed
23
24 136 with 1% of tonner suspension (magnetic microbeads), and deposited in triplicate in a 96-well
25
26 137 microplate. Every 1h for 5h, the wells of one plate were covered with 100 µL of contrast
27
28 138 solution (white opaque oil). The plate was then placed on a dedicated magnet support for 1
29
30 139 min for contact magnetization and was then scanned with a plate reader to obtain an image of
31
32 140 the bottom of each well. During contact magnetization, free beads are attracted to the center
33
34 141 of the bottom of each well, forming a spot, whereas the beads captured within a biofilm
35
36 142 remain in suspension. The BioFilm Control software (BioFilm Elements) analyzes the images
37
38 143 of each well before and after magnetization and calculates the “BioFilm Index” (BFI). Each
39
40 144 observed BFI (BFI_o) was normalized as a proportion of the immobilized beads (so-called RBI
41
42 145 for “Relative Bead Immobilization”) and was compared with controls with (BFI_{reference}) and
43
44 146 without (BFI_{minimal}) beads using the following formula: $RBI = [(BFI_{reference} - BFI_o) /$
45
46 147 $(BFI_{reference} - BFI_{minimal})]^{0.5}$ [18].
47
48
49
50

51
52 148

53
54 149 **Accessory gene regulator functionality.** The multifunctional regulatory RNAIII, the main
55
56 150 effector of the *agr* system [19], is also a messenger RNA for the delta-toxin, whose
57
58
59
60

1
2
3 151 production is consequently a surrogate marker of *agr* functionality [20]. Recently, it was
4
5 152 shown that delta-toxin production and thus *agr* function can be assessed using whole cell
6
7 153 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry
8
9 154 (MS) during the routine MS-mediated microbiological identification process [21].
10
11 155 Consequently, *agr* functionality was assessed by the evaluation of delta-toxin production from
12
13 156 whole bacterial cells by MALDI-TOF-MS spectrum analysis using an Axima Assurance®
14
15 157 mass spectrometer (Shimadzu Biotech) piloted by LaunchPad® software (version
16
17 158 2.8.4.20081127, Shimadzu Biotech) with the conventional settings for bacterial identification
18
19 159 [21, 22]. Delta-toxin peak at 3005±5 Thomson (or its allelic variant at 3015±5 Th) was
20
21 160 searched manually in the MS spectrum, as previously described [21].
22
23
24
25
26
27

28 162 **Molecular characterization.** DNA was extracted using commercial extraction kits (Qiagen)
29
30 163 according to the manufacturer's protocol. The DNA microarray Identibac *S. aureus*
31
32 164 genotyping® (Alere Technologies) used in this study and the related procedures have been
33
34 165 previously described in detail [23]. This microarray allows the detection of 332 different
35
36 166 target sequences corresponding to 185 genes and their allelic variants. The isolate clonal
37
38 167 complexes (CCs) were determined by the comparison of the hybridization profiles to
39
40 168 previously typed multilocus sequence typing (MLST) reference strains [23].
41
42
43
44

45 170 **Statistical analysis.** Descriptive statistics were used to estimate the frequencies of the study
46
47 171 variables, expressed as the means and 95% confidence intervals (95% CIs). Non-parametric
48
49 172 statistical methods were used throughout to compare the study groups (the Chi-squared test
50
51 173 with Yates' correction, if needed, the Mann-Whitney *U*-test for two-group difference analysis,
52
53 174 and the Kruskal-Wallis test for multiple pairwise comparisons) and to investigate correlations
54
55 175 (Spearman coefficient), as appropriate. Phenotypic factors (internalization, LDH release, and
56
57
58
59
60

1
2
3 176 SCV phenotype switching rates), delta-toxin expression, and virulence genes were included in
4
5 177 a binary logistic regression model to disclose risk factors for chronicity, including variables
6
7 178 with p-values <0.15 in the univariate analysis in the final model. For all tests, a p-value <0.05
8
9 179 was taken as significant. All analyses were performed using SPSS software version 17.0
10
11 180 (SPSS, Chicago, IL).
12
13
14 181

15 182 **RESULTS**

16 183
17
18 184 **Population characteristics.** A total of 211 patients with MSSA BJI were identified; six were
19
20 185 excluded because of the lack of available clinical data and three due to chronic osteomyelitis
21
22 186 resulting from diabetic perforating ulcers. Among the 202 remaining patients, 116 strains
23
24 187 were available. Nineteen strains isolated at the time of relapse and two stable SCVs were
25
26 188 excluded. In total, 95 strains responsible for 64 (67.4%) acute and 31 (32.6%) chronic BJI
27
28 189 were included (Table 1).
29
30
31
32
33
34 190

35
36 191 **MSSA from chronic BJI shows a higher capacity to invade human osteoblasts.** The mean
37
38 192 relative internalization rate within osteoblasts was significantly higher for chronic BJI isolates
39
40 193 (240.7% of 8325-4 internalization rate; 95%CI, 171.3-310.2) than for acute BJI strains
41
42 194 (162.7%; 95%CI, 132.3-193.0; p=0.035) (Figure 1A). Moreover, the internalization rate was
43
44 195 correlated with the infection evolution delay, i.e., the time from symptom onset to
45
46 196 microbiological diagnosis (Spearman coefficient 0.29; p=0.005) (Figure 1B). No difference
47
48 197 was observed between the two groups regarding cytotoxicity at 24h, with 10.7% (95%CI, 8.3-
49
50 198 13.1) and 7.6% (95%CI, 4.8-10.4) of cell death (p=0.152), respectively (Figure 1C). LDH
51
52 199 release was not correlated with BJI evolution delay (Spearman coefficient -0.07; p=0.512).
53
54
55 200 Similarly, no difference in the capacities of the two groups to convert to the SCV phenotype
56
57
58
59
60

1
2
3 201 was observed, with SCV proportions of 3.3% (95%CI, 2.8-3.7) and 3.4% (95%CI, 2.5-4.2) for
4
5 202 the acute and chronic MSSA BJI isolates, respectively (p=1.000) (Figure 1D).
6
7 203

8
9 204 **Biofilm formation does not differ between acute and chronic MSSA BJI isolates.** The
10
11 205 total immobilization of magnetic beads, reflecting biofilm formation, was observed within 5
12
13 206 hours for all isolates. The kinetics of biofilm formation was similar for the acute and chronic
14
15 207 BJI isolates (Figure 2). Of note, microarray data indicated that all strains harbored the
16
17 208 biofilm-associated genes *icaA*, *icaC*, and *icaD* (see below).
18
19 209

20
21
22 210 **Genetic background analysis reveals a high diversity among BJI MSSA clinical isolates,**
23
24 211 **with no difference in virulence gene distribution in acute and chronic BJI isolates.**

25
26 212 Seventeen different clonal complexes were identified, of which 7 included more than 5 strains
27
28 213 (Table 2). No significant difference regarding the distribution of these clonal complexes
29
30 214 between acute and chronic BJI was observed (p=0.408). Using multiple pairwise comparisons
31
32 215 (Kruskal-Wallis test), no differences were identified between the different clusters with regard
33
34 216 to their capacity to invade bone cells (p=0.446), cause cell damage (p=0.368), switch SCV
35
36 217 phenotypes (p=0.054), or form biofilm (p=0.347) (Table 2, Figure 3).
37
38 218

39 219 The distribution of virulence genes of the 95 BJI MSSA isolates is presented in Table 3. No
40
41 220 difference regarding the prevalence of these virulence factors between the acute and chronic
42
43 221 BJI MSSA strains was noted. Logistic regression failed to identify one of these virulence
44
45 222 genes as a determinant for BJI chronicity (Table 3).
46
47 223

48
49 224 ***agr* dysfunction, detected through the absence of delta-toxin production, is associated**
50
51 225 **with MSSA BJI chronicity, osteoblast invasion, and biofilm formation.** Eighty strains
52
53 (84.2%) were considered to have a functional *agr* system, as a delta-toxin peak (n=76) or its
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 226 allelic variant (n=4) was detected using MALDI-TOF spectrum analysis. Interestingly, the
4
5 227 evolution delay of BJI was significantly higher in the delta-toxin negative isolates (17.4
6
7 228 weeks; 95%CI, 6.1-28.8) than in the strains with a functional *agr* system (6.4 weeks; 95%CI,
8
9 229 4.0-8.9; p=0.045). Compared to delta-toxin positive strains, the absence of delta-toxin
10
11 230 expression was associated with a higher internalization rate (337.1% of the 8325-4
12
13 231 internalization rate [95%CI, 219.5-454.7] versus 160.2% (95%CI, 133.9-186.5); p <0.001),
14
15 232 lower osteoblast cytotoxicity (64.5% of 8325-4 LDH release [95%CI, 57.1-71.8] versus
16
17 233 87.3% [95%CI, 82.0-93.7], corresponding to 2.8% [95%CI, 0.6-5.0] versus 11.0% [95%CI,
18
19 234 8.9-13.0] of cell death; p <0.001), and an accelerated biofilm formation at each measurement
20
21 235 point (Figure 4). No difference was detected regarding intracellular phenotype switching to
22
23 236 SCV (2.5%; 95%CI, 1.7-3.1) for the delta-toxin-negative strains versus 3.5% for the delta-
24
25 237 toxin-positive strains (95%CI 3.0-3.9; p=0.153). Of note, the delta-toxin-negative strains were
26
27 238 not significantly associated with one of the seven major staphylococcal clonal complexes
28
29 239 (p=0.181).
30
31
32
33
34
35

36 241 **DISCUSSION**

37
38 242
39
40
41 243 Staphylococcal osteoblast invasion is considered as a pathophysiological pathway of BJI on
42
43 244 the basis of *in vivo* observations and results obtained from *ex vivo* models of osteoblast
44
45 245 infection, though only using a few reference *S. aureus* isolates [6-8]. Intracellular persistence
46
47 246 may constitute a strategy to escape the action of the host immune system and antibiotics with
48
49 247 exclusive extracellular diffusion, constituting a bacterial reservoir that can lead to chronicity
50
51 248 or relapse [8]. This hypothesis has been previously investigated in our laboratory using the
52
53 249 main circulating MRSA clones, showing that community-acquired MRSA, usually
54
55 250 responsible for acute forms of BJI, were more cytotoxic and less internalized in osteoblasts
56
57
58
59
60

1
2
3 251 than hospital-acquired MRSA, known to more frequently induce indolent and recurrent BJI
4
5 252 [16]. The present results confirm the association between the staphylococcal invasion of
6
7 253 human osteoblasts and BJI chronicity for the first time among a large and highly diverse
8
9 254 collection of clinical MSSA isolates. Conversely, this important diversity in bacterial genetic
10
11 255 background may explain the difficulty in identifying any difference in cytotoxicity between
12
13 256 chronic and acute BJI strains. Similarly, we failed to disclose any association between
14
15 257 chronicity and the intracellular emergence of SCV. However, an accurate definition of SCV,
16
17 258 involving not only colony sizes but also metabolism markers, for example, is lacking and may
18
19 259 have helped to associate this phenotype with chronic BJI forms. Indeed, SCVs have been
20
21 260 associated with *S. aureus* implanted-material infection and BJI recurrence [9, 10], and cell
22
23 261 invasion has been described as a putative mechanism of interconversion from the wild type to
24
25 262 the SCV phenotype [11].
26
27
28

29 263 The high genetic diversity of our strain collection, the absence of a direct relationship
30
31 264 between BJI chronicity and bacterial genetic backgrounds or virulence factors, and the
32
33 265 association of osteoblast invasion with *agr* deficiency suggest that an intra-osteoblastic life-
34
35 266 style is an adaptive staphylococcal mechanism leading to BJI chronicity rather than merely an
36
37 267 intrinsic feature. Indeed, the comparison of *agr* expression at different time points during
38
39 268 various infections has shown that acute infections are usually associated with a functional *agr*
40
41 269 system [13]. *agr* dysfunction appears to occur during the infection course and in cases of
42
43 270 persistent bacteremia, diabetic foot infection, or pulmonary infection in cystic fibrosis patients
44
45 271 [12, 13, 21, 24]. Of note, chronicity of infection appeared to be in multivariate analysis the
46
47 272 major factor associated with *agr* dysfunction in a previous series of 168 unselected clinical
48
49 273 isolates [21].
50
51

52
53 274 In addition to the finding of a higher evolution delay of BJI in *agr*-deficient isolates, our
54
55 275 results revealed a strong association between *agr* dysfunction and the bacterial phenotypic
56
57
58
59
60

1
2
3 276 mechanisms associated with BJI chronicity, including: i) an enhanced biofilm formation,
4
5 277 which had been previously suggested using various laboratory strains and a few clinical
6
7 278 isolates from inhomogeneous pathologic conditions [14, 55, 26]; and ii) an increased
8
9 279 osteoblastic invasion, with reduced infection-induced cytotoxicity. To our knowledge, the
10
11 280 association of *agr* dysfunction and non-professional phagocytic cell invasion has only been
12
13 281 described in airway epithelial cells [26]. Interestingly, using isogenic mutants, we also linked
14
15 282 the intraosteoblastic cytotoxic phenotype of MRSA with the regulation of phenol-soluble
16
17 283 modulins (PSMs), which can be considered as major effectors of intracellular staphylococcal
18
19 284 virulence [16]. Indeed, once internalized, *S. aureus* is initially trapped in phagosomes [27].
20
21 285 PSM release may then results in phagosome membrane disruption, leading to translocation of
22
23 286 PSM in the cytosol, and ultimately to host cell death [16]. Of note, PSM expression is under
24
25 287 direct control of *agr* and delta-toxin is known itself as one of these PSM, called PSM γ . Put
26
27 288 together, these considerations may explain the reduced cell lysis observed in our study in
28
29 289 delta-toxin negative strains, consequently promoting the constitution of an intracellular
30
31 290 staphylococcal reservoir leading to chronicity.
32
33 291 Finally, it has been demonstrated that *agr* functionality can be easily assessed by delta-toxin
34
35 292 production using whole-cell MALDI-TOF spectrum analysis [20, 21]. As MALDI-TOF-MS
36
37 293 is increasingly being used in routine laboratory practice for bacterial identification [21, 28], it
38
39 294 may provide in the same run reliable information with respect to *S. aureus agr* functionality at
40
41 295 the time of BJI diagnosis, that is, when impaired, an predictive marker of chronic infection
42
43 296 [21]. It may provide pivotal information for clinicians who currently lack objective criteria to
44
45 297 characterize the chronicity state of BJI in patients, and directly impact their management.
46
47 298 Notably, in the case of prosthetic joint infection, the current guidelines arbitrarily tolerate
48
49 299 implant retention in cases of infection lasting for less than 3 to 4 weeks, considering that
50
51 300 surgical debridement associated with combination therapy including anti-biofilm molecules,
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 301 such as rifampin, will avoid chronicization and increase the cure rate [3]. However, this
4
5 302 decision is often very difficult in clinical practice because: i) the delay of 3-4 weeks is only
6
7 303 theoretical, as bacterial adhesion and biofilm formation are highly likely to occur in the first
8
9 304 hours of infection; and ii) the clinical onset of infection is often difficult to determine due to
10
11 305 the frequent occult evolution of BJI. In practice, these factors contribute to a failure rate of
12
13 306 implant retention strategies that generally approaches 20% but can reach 50% in some poorly
14
15 307 explained cases [2, 29, 30]. Thus, prospective evaluations of strategies using *agr*-deficiency
16
17 308 detection at the time of diagnosis to help in the management of BJI as acute or chronic
18
19 309 infections should be a priority according to their potential clinical impact.
20
21
22
23
24

25 311 CONCLUSION

26
27 312
28
29 313 Using a large and non-clonal clinical collection of BJI MSSA isolates, our findings confirmed
30
31 314 that bacterial invasion and intracellular life switching within bone cells constitute a pivotal
32
33 315 pathophysiological mechanism of staphylococcal BJI chronicity, regardless of the genetic
34
35 316 background of the isolate. Moreover, the loss of *agr* function that occurs during the infection
36
37 317 course appears to be linked with BJI chronicity through i) the promotion of an intra-
38
39 318 osteoblastic *S. aureus* reservoir by limiting intracellular staphylococcal cell damage and ii)
40
41 319 the enhancement of biofilm formation. As a consequence, the detection of delta-toxin by
42
43 320 MALDI-TOF-MS, which is used in routine microbiology practice for bacterial identification,
44
45 321 may provide a simple tool for the detection of strains associated with chronic forms of BJI
46
47 322 and may offer crucial help for clinical decisions in BJI management.
48
49
50
51
52

53 324 FUNDING

54
55
56 325
57
58
59
60

1
2
3 326 This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education,
4
5 327 the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Groupement
6
7 328 Inter-Regional à la Recherche Clinique et à l'Innovation (GIRCI-D50829 to J.P.R), and
8
9 329 bioMérieux (to F. Vandenesch). The funders had no role in study design, data collection and
10
11 330 analysis, the decision to publish, or manuscript preparation.
12
13

14 331

15
16 332 **CONFLICTS OF INTEREST**

17
18 333

19
20 334 No conflict, for all authors.
21
22

23 335

24
25 336 **ACKNOWLEDGMENTS**

26
27 337

28
29 338 **Lyon Bone and Joint Infection Study Group: Physicians** – *Florence Ader, François Biron,*
30
31 339 *André Boibieux, Anissa Bouaziz, Evelyne Braun, Christian Chidiac, Fatiha Daoud, Tristan*
32
33 340 *Ferry, Judith Karsenty, Johanna Lippman, Patrick Miailhaes, Thomas Perpoint, Dominique*
34
35 341 *Peyramond, Marie-Paule Vallat, and Florent Valour; Surgeons* – *Cédric Barrey, Pierre*
36
37 342 *Breton, Fabien Boucher, Romain Desmarchelier, Michel-Henry Fessy, Olivier Guyen,*
38
39 343 *Christophe Lienhart, Sébastien Lustig, Alain-Ali Mojallal, Philippe Neyret, Franck Trouillet,*
40
41 344 *and Gualter Vaz; Microbiologists* – *Frédéric Laurent, Céline Dupieux, Jean-Philippe*
42
43 345 *Rasigade, and François Vandenesch; Nuclear Medicine* – *Emmanuel Deshayes, Francesco*
44
45 346 *Giammarile, Marc Janier, and Isabelle Morelec; PK/PD specialists* – *Marie-Claude*
46
47 347 *Gagnieu, Sylvain Goutelle, and Michel Tod; and Clinical Research Assistant* – *Marion*
48
49 348 *Martinez*
50
51
52
53
54

55
56 350 **REFERENCES**
57
58
59
60

- 1
2
3 351
4
5 352 1. Lew DP and Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*, **2004**; 364: 369-379.
6
7 353 2. Zimmerli W, Trampuz A and Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*, **2004**;
8
9 354 351: 1645-1654.
10
11 355 3. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, *et al.* Diagnosis and management of prosthetic joint
12
13 356 infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin*
14
15 357 *Infect Dis*, **2013**; 56: e1-e25.
16
17 358 4. Sanchez CJ, Jr., Mende K, Beckius ML, *et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the
18
19 359 implications in chronic infections. *BMC Infect Dis*, **2013**; 13: 47.
20
21 360 5. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW and Shirtliff ME. Osteomyelitis and the
22
23 361 role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2008**; 52: 13-22.
24
25 362 6. Bosse MJ, Gruber HE and Ramp WK. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient
26
27 363 with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg Am*, **2005**; 87: 1343-
28
29 364 1347.
30
31 365 7. Jevon M, Guo C, Ma B, *et al.* Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by
32
33 366 cultured human osteoblasts. *Infect Immun*, **1999**; 67: 2677-2681.
34
35 367 8. Ellington JK, Harris M, Webb L, *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism
36
37 368 for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br*, **2003**; 85: 918-921.
38
39 369 9. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, *et al.* Small colony variants: a pathogenic form of
40
41 370 bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*, **2006**; 4: 295-
42
43 371 305.
44
45 372 10. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE and Zimmerli W. *Staphylococcus*
46
47 373 *aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis*, **2006**; 43: 961-967.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 374 11. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, *et al.* Staphylococcus aureus phenotype switching:
4
5 375 an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic
6
7 376 infection. EMBO Mol Med, **2011**; 3: 129-141.
8
9
10 377 12. Fowler VG, Jr., Sakoulas G, McIntyre LM, *et al.* Persistent bacteremia due to methicillin-
11
12 378 resistant Staphylococcus aureus infection is associated with agr dysfunction and low-level in
13
14 379 vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. J Infect Dis, **2004**; 190:
15
16 380 1140-1149.
17
18 381 13. Traber KE, Lee E, Benson S, *et al.* agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates.
19
20 382 Microbiology, **2008**; 154: 2265-2274.
21
22
23 383 14. Vuong C, Saenz HL, Gotz F and Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on
24
25 384 adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus. J Infect Dis, **2000**; 182: 1688-1693.
26
27 385 15. Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, *et al.* A novel flow cytometry-based assay for the
28
29 386 quantification of Staphylococcus aureus adhesion to and invasion of eukaryotic cells. J
30
31 387 Microbiol Methods, **2011**; 86: 145-149.
32
33
34 388 16. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, *et al.* PSMs of Hypervirulent Staphylococcus
35
36 389 aureus Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts. PLoS One, **2013**; 8: e63176.
37
38
39 390 17. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, *et al.* Staphylococcus epidermidis in
40
41 391 orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and
42
43 392 biofilm formation. PLoS One, **2013**; 8: e67240.
44
45 393 18. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hebraud M and Bernardi T. A new device for
46
47 394 rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods, **2007**; 68:
48
49 395 605-612.
50
51
52 396 19. Novick RP and Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet, **2008**;
53
54 397 42: 541-564.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 398 20. Janzon L, Lofdahl S and Arvidson S. Identification and nucleotide sequence of the delta-
4
5 399 lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*. Mol
6
7 400 Gen Genet, **1989**; 219: 480-485.
8
9 401 21. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin
10
11 402 production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One, **2012**; 7: e40660.
12
13 403 22. Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, *et al.* Species identification of staphylococci by
14
15 404 amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted
16
17 405 laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,
18
19 406 **2011**; 30: 343-354.
20
21 407 23. Monecke S, Slickers P and Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to
22
23 408 clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. FEMS Immunol Med
24
25 409 Microbiol, **2008**; 53: 237-251.
26
27 410 24. Park SY, Chong YP, Park HJ, *et al.* agr Dysfunction and persistent methicillin-resistant
28
29 411 *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with removed eradicable foci. Infection, **2013**;
30
31 412 41: 111-119.
32
33 413 25. Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimaraes MA, Ferreira-Carvalho BT and
34
35 414 Figueiredo AM. agr RNAlII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in
36
37 415 clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Microbiology, **2008**; 154: 3480-3490.
38
39 416 26. Ferreira FA, Souza RR, de Sousa Moraes B, *et al.* Impact of agr dysfunction on virulence
40
41 417 profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
42
43 418 (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV. BMC Microbiol, **2013**; 13: 93.
44
45 419 27. Sinha B and Fraunholz M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion
46
47 420 events. Int J Med Microbiol, **2010**; 300:170-175.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

421 28. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine
422 identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass
423 spectrometry. *Clin Infect Dis*, **2009**; 49: 543-551.

424 29. Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, *et al.* Outcome of prosthetic joint infections
425 treated with debridement and retention of components. *Clin Infect Dis*, **2006**; 42: 471-478.

426 30. Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, *et al.* A large multicenter study of methicillin-
427 susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections
428 managed with implant retention. *Clin Infect Dis*, **2013**; 56: 182-194.

For Peer Review

429 TABLES

430 Table 1. Characteristics of the 95 included patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bone and joint infection.

	Total (n=95)	Acute BJI ^a (n=64)	Chronic BJI ^a (n=31)	p
Demographic characteristics				
Sex (male)	60 (63.2%)	38 (59.4%)	22 (71.0%)	0.272
Age (year)	53.6 (49.6-57.6)	56.1 (51.3-60.8)	48.5 (49.6-57.6)	0.105
Modified CCI ^b	2.6 (2.1-3.2)	2.9 (2.2-3.6)	2.0 (1.1-2.9)	0.148
BJI type				
Native septic arthritis	12 (12.6%)	10 (15.6%)	2 (6.5%)	0.351
Native osteomyelitis	12 (12.6%)	2 (3.1%)	10 (32.3%)	< 0.001
Vertebral osteomyelitis	7 (7.4%)	5 (7.8%)	2 (6.5%)	0.856
Orthopedic device infection	64 (67.4%)	47 (73.4%)	17 (54.8%)	0.070
Osteosynthesis	32 (50%)	23 (48.9%)	9 (52.9%)	0.777
Prosthetic joint	29 (45.3%)	22 (48.8%)	7 (41.2%)	0.689
Others	3 (4.7%)	2 (4.3%)	1 (5.9%)	0.691
Biological inflammatory syndrome				
CRP ^c level (mg/L)	170.5 (141.7-199.3)	209.8 (174.4-245.3)	86.23 (52.7-119.8)	< 0.0001
WBC ^d (/mm ³)	10,790 (9,985-11,600)	11,060 (10,140-11,970)	10,220 (8,538-11,910)	0.098
Neutrophil count (/mm ³)	8,129 (7,338-8,921)	8,577 (7,706-9,448)	7,169 (5,492-8,846)	0,009
Management				
Surgical treatment	83 (87.4%)	57 (89.1%)	26 (83.9%)	0.700
Antimicrobial treatment duration (weeks)	27.8 (23.5-32.0)	26.4 (21.2-31.7)	30.6 (22.8-38.4)	0.244
Outcome				
Treatment failure linked with the same strain	21 (22.1%)	14 (21.9%)	7 (22.6%)	0.938

431 ^a Bone and joint infection; ^b Charlson comorbidity index; ^c C-reactive protein; ^d White blood cell

432 Results are presented as effective (%) and mean (95%CI) values. Comparisons between acute and chronic BJI were performed using a two-tailed

433 Fisher's exact test or a Mann-Whitney U-test, as appropriate.

434 **Table 2. Distribution of the major MSSA clonal complexes regarding infection evolution delay and comparison of their capacities to**
 435 **invade bone cells, induce cytotoxicity, and convert to an SCV phenotype.**

CC ^a	Total	BJI ^b chronicity		Internalization rate	LDH ^c release	SCV ^d proportion	Delta-toxin -
		Acute BJI ^b	Chronic BJI ^b				
CC5	18 (18.9%)	13 (20.3%)	5 (16.1%)	214.9% (135.6-294.2)	77.2% (68.9-85.5)	3.0% (2.3-3.6)	6 (33.3%)
CC30	17 (17.9%)	10 (15.6%)	7 (22.6%)	169.6% (105.5-233.7)	84.5% (77.1-91.8)	4.5% (3.1-5.9)	1 (5.9%)
CC45	12 (12.6%)	10 (15.6%)	2 (6.5%)	279.6% (80.62-478.6)	97.2% (73.1-121.3)	3.0% (1.8-4.2)	1 (8.3%)
CC15	10 (10.5%)	8 (12.5%)	2 (6.5%)	185.8% (89.7-281.9)	94.2% (71.1-117.4)	2.0% (1.1-2.9)	3 (30%)
CC398	9 (9.5%)	6 (9.4%)	3 (9.7%)	103.0% (71.0-135.0)	72.2% (57.6-86.9)	2.9% (1.7-4.0)	1 (11.1%)
CC8	8 (8.4%)	3 (4.7%)	5 (16.1%)	248.3% (110.7-385.8)	79.1% (58.4-99.7)	4.9% (2.2-7.6)	0 (0%)
CC25	6 (6.3)	4 (6.3%)	2 (6.5%)	170.6% (-16.8-358.0)	88.7% (48.5-129.0)	3.3% (1.2-5.4)	1 (16.7%)
Others	10 different CC with less than 5 strains each						

436 ^a Clonal complex; ^b Bone and joint infection; ^c Lactate dehydrogenase; ^d Small colony variant

437 Results are presented as effective (%) and mean (95%CI) values and are expressed relative to the results obtained with the 8325-4 reference
 438 strain.

439

440 **Table 3. Distribution of virulence genes among acute and chronic bone and joint infection MSSA isolates and determinants of infection**
 441 **chronicity.**

	Descriptive data				Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Total	Acute BJI ^a	Chronic BJI ^a	p	OR (95%CI) ^b	p	OR (95%CI) ^b	p
Sex (male)	60 (63.2%)	38 (59.4%)	22 (71.0%)	0.503	1.436 (0.582-3.546)	0.432		
Age (year)	53.6 (49.6-57.6)	56.1 (51.3-60.8)	48.5 (49.6-57.6)	0.105	0.984 (0.962-1.007)	0.175		
Modified Charlson score	2.6 (2.1-3.2)	2.9 (2.2-3.6)	2.0 (1.1-2.9)	0.148	0.881 (0.737-1.053)	0.164		
Internalization rate					1.000 (1.000-1.000)	0.101	1.000 (1.000-1.000)	0.244
LDH^c release					1.000 (1.000-1.000)	0.235		
SCV^d					1.000 (1.000-1.000)	0.875		
Delta-toxin negative					2.832 (0.920-8.715)	0.069	0.397 (0.708-8.112)	0.160
agr alleles				0.561	0.896 (0.525-1.532)	0.689		
<i>agr</i> I	42 (44.2%)	26 (40.6%)	16 (51.6%)		1.559 (0.658-3.696)	0.313		
<i>agr</i> II	29 (30.5%)	22 (34.4%)	7 (22.6%)		0.557 (0.207-1.495)	0.245		
<i>agr</i> III	23 (24.2%)	15 (23.4%)	8 (25.8%)		1.136 (0.422-3.060)	0.801		
<i>agr</i> IV	1 (1.1%)	1 (1.6%)	0 (0%)		NC	NC		
Toxins								
<i>tst</i>	16 (16.8%)	11 (17.2%)	5 (16.1%)	1.000	0.927 (0.291-2.946)	0.897		
enterotoxins								
<i>sea</i>	17 (17.9%)	12 (18.8%)	5 (16.1%)	1.000	0.833 (0.265-2.618)	0.755		
<i>seb</i>	6 (6.3%)	4 (6.3%)	2 (6.5%)	1.000	1.034 (0.179-5.979)	0.970		
<i>sec</i>	7 (7.4%)	7 (10.9%)	0 (0%)	0.092	NC	NC		
<i>sed</i>	8 (8.5%)	6 (9.4%)	2 (6.7%)	1.000	0.690 (0.131-3.641)	0.662		
<i>see</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC		
<i>seg</i>	58 (61.7%)	41 (65.1%)	17 (54.8%)	0.373	0.652 (0.271-1.566)	0.338		
<i>she</i>	10 (10.5%)	7 (10.9%)	3 (9.7%)	1.000	0.872 (0.210-3.632)	0.851		
<i>sei</i>	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311		
<i>sej</i>	7 (7.4%)	5 (7.8%)	2 (6.5%)	1.000	0.814 (0.149-4.450)	0.812		
<i>sek</i>	5 (5.3%)	5 (7.8%)	0 (0%)	0.169	NC	NC		
<i>seL</i>	7 (7.4%)	7 (10.9%)	0 (0%)	0.092	NC	NC		
<i>sem</i>	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311		
<i>sen</i>	58 (61.1%)	41 (64.1%)	17 (54.8%)	0.501	0.681 (0.285-1.630)	0.388		
<i>seo</i>	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311		
<i>seq</i>	5 (5.3%)	5 (7.8%)	0 (0%)	0.169	NC	NC		
<i>ser</i>	7 (7.4%)	5 (7.8%)	2 (6.5%)	1.000	0.814 (0.146-4.450)	0.812		
<i>seu</i>	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311		

1							
2							
3							
4							
5	<i>lukS-PV-lukF-PV (PVL)</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
6	<i>lukD-lukE</i>	52 (54.7%)	34 (53.1%)	18 (58.1%)	0.668	1.222 (0.514-2.904)	0.650
7	<i>lukM-lukF-PV</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
8	<i>lukX</i>	62 (89.9%)	41 (93.2%)	21 (84.0%)	0.245	0.384 (0.079-1.877)	0.237
9	<i>lukY</i>	65 (68.4%)	43 (67.2%)	22 (71.0%)	0.816	1.194 (0.469-3.040)	0.710
10	Exfoliative toxins						
11	<i>eta</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
12	<i>etb</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
13	<i>etd</i>	6 (6.3%)	4 (6.3%)	2 (6.5%)	1.000	1.034 (0.179-5.979)	0.970
14	HLB conv phages						
15	<i>sak</i>	72 (75.8%)	48 (75.0%)	24 (77.4%)	1.000	1.143 (0.414-3.152)	0.796
16	<i>chp</i>	68 (71.6%)	48 (75.0%)	20 (64.5%)	0.336	0.606 (0.240-1.533)	0.290
17	<i>scn</i>	90 (94.7%)	61 (95.3%)	29 (93.5%)	0.660	0.713 (0.113-4.504)	0.719
18	Proteases						
19	<i>splA</i>	52 (54.7%)	34 (53.1%)	18 (58.1%)	0.668	1.222 (0.514-2.904)	0.650
20	<i>splB</i>	52 (54.7%)	34 (53.1%)	18 (58.1%)	0.668	1.222 (0.514-2.904)	0.650
21	<i>splE</i>	48 (50.5%)	30 (46.9%)	18 (58.1%)	0.383	1.569 (0.660-3.731)	0.308
22	Superantigens						
23	<i>setC</i>	65 (68.4%)	43 (67.2%)	22 (71.0%)	0.816	1.194 (0.469-3.040)	0.710
24	<i>set6</i>	94 (98.9%)	64 (100%)	30 (96.8%)	0.326	NC	NC
25	<i>ssl1</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
26	<i>ssl2</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
27	<i>ssl3</i>	69 (72.6%)	45 (70.3%)	24 (77.4%)	0.624	1.448 (0.534-3.928)	0.468
28	<i>ssl4</i>	82 (94.3%)	55 (94.8%)	27 (93.1%)	1.000	0.736 (0.116-4.672)	0.745
29	<i>ssl5</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
30	<i>ssl6</i>	23 (24.2%)	14 (21.9%)	9 (29.0%)	0.455	1.461 (0.551-3.877)	0.446
31	<i>ssl7</i>	94 (98.9%)	63 (98.4%)	31 (100%)	1.000	NC	NC
32	<i>ssl8</i>	54 (56.8%)	36 (56.3%)	18 (58.1%)	1.000	1.077 (0.452-2.564)	0.867
33	<i>ssl9</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
34	<i>ssl10</i>	90 (100%)	61 (100%)	29 (100%)	NC	NC	NC
35	<i>ssl11</i>	64 (69.6%)	43 (68.3%)	21 (72.4%)	0.809	1.221 (0.462-3.227)	0.687
36	Capsule and biofilm associated genes						
37	<i>cap1</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
38	<i>cap5</i>	45 (47.4%)	28 (43.8%)	17 (54.8%)	0.382	1.561 (0.659-3.699)	0.312
39	<i>cap8</i>	50 (52.6%)	36 (56.3%)	14 (45.2%)	0.382	0.641 (0.270-1.518)	0.312
40	<i>icaA</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
41	<i>icaC</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
42	<i>icaD</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							

bap	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (3.2%)	0.326	NC	NC		
Adhesins (MSCRAMMs)								
<i>bbp</i>	87 (91.6%)	59 (92.2%)	28 (90.3%)	0.713	0.791 (0.176-3.546)	0.791		
<i>clfA</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC		
<i>clfB</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC		
<i>cna</i>	41 (43.2%)	30 (46.9%)	11 (35.5%)	0.378	0.623 (0.257-1.510)	0.295		
<i>ebh</i>	93 (97.9%)	63 (98.4%)	30 (96.8%)	0.548	0.476 (0.029-7.876)	0.604		
<i>ebpS</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC		
<i>eno</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC		
<i>fib</i>	54 (56.8%)	36 (56.3%)	18 (58.1%)	1.000	1.077 (0.452-2.564)	0.867		
<i>fnbA</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC		
<i>fnbB</i>	84 (88.4%)	56 (87.5%)	28 (90.3%)	1.000	1.333 (0.328-5.419)	0.688		
<i>map</i>	92 (96.8%)	61 (95.3%)	31 (100%)	0.548	NC	NC		
<i>sasG</i>	45 (47.4%)	30 (46.9%)	15 (48.4%)	1.000	1.062 (0.450-2.507)	0.890		
<i>sdrC</i>	94 (98.9%)	64 (100%)	30 (96.8%)	0.326	NC	NC		
<i>sdrD</i>	75 (78.9%)	54 (84.4%)	21 (67.7%)	0.105	0.389 (0.141-1.069)	0.067	0.365 (0.128-1.038)	0.059
<i>vwB</i>	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC		
<i>isaB</i>	50 (56.2%)	33 (55.0%)	17 (58.6%)	0.822	1.159 (0.473-2.843)	0.747		
<i>hsdS1</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC		
<i>hsdS2</i>	73 (76.8%)	50 (78.1%)	23 (74.2%)	0.796	0.805 (0.296-2.186)	0.670		
<i>hsdS3</i>	60 (63.2%)	39 (60.9%)	21 (67.7%)	0.651	1.346 (0.545-3.328)	0.520		
<i>hysA1</i>	94 (98.9%)	64 (100%)	30 (96.8%)	0.326	NC	NC		
<i>hysA2</i>	86 (90.5%)	56 (87.5%)	30 (96.8%)	0.263	4.286 (0.512-35.906)	0.180		

442 ^a Bone and joint infection; ^b Odds ratio (95% confidence interval); ^c Lactate dehydrogenase; ^d Small colony variant; NC: Not calculable

443 Results are expressed as effective values (%). For each virulence factor, strains with ambiguous detection were excluded from the denominator.

444 For comparison between acute and chronic BJI, p-values were calculated for each gene or allele using a two-tailed Fisher exact test.

445 Association with chronicity was assessed using a binary logistic regression analysis, including variables with p-values < 0.15 in the final

446 regression model.

447 **FIGURE LEGENDS**

448

449 **Figure 1. Difference in interactions between human osteoblasts and methicillin-**
450 **susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains isolated from acute and chronic bone**
451 **and joint infections (BJI)**

452 A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

453 B: Correlation between the internalization rate of MSSA clinical isolates and BJI evolution
454 delay

455 C: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection by MSSA isolates

456 D: Proportion of phenotype switching to small colony variants (SCVs)

457 Human osteoblastic MG-63 cells were infected for 2 h with 95 MSSA clinical isolates
458 isolated from acute (i.e., time from symptom onset to microbiological diagnosis \leq 4 weeks;
459 n=64) and chronic (n=31) BJI. After 24 h, the internalized bacteria were quantified by plating
460 cell lysates, and infection-induced cytotoxicity was assessed by lactate dehydrogenase (LDH)
461 release into the cell culture supernatant; phenotype switching to SCVs was assessed by
462 counting colonies with areas smaller than 5-fold less of the median area measured for all
463 colonies. Each strain was evaluated in duplicate in a single experiment. LDH release and
464 intracellular bacterial counts are expressed relative to the results obtained with the 8325-4
465 reference strain. Comparisons between the acute and chronic BJI isolates were assessed using
466 the Mann-Whitney U-test.

467

468 **Figure 2. Difference in biofilm formation by methicillin-susceptible *Staphylococcus***
469 ***aureus* (MSSA) strains isolated from acute and chronic bone and joint infections (BJI).**

470 Each strain was co-cultured with microscopic magnetic beads. Every hour, a culture plate was
471 placed on a dedicated magnet support, which attracted the free beads to the center of the

1
2
3 472 bottom of each well, forming a spot that was progressively attenuated while the beads were
4
5 473 embedded in the biofilm. The numeric analysis of the spot intensity allowed an estimation of
6
7 474 the proportion of biofilm formed by the proportion of immobilized beads. Each strain was
8
9 475 evaluated in triplicate in three independent experiments. Comparisons between acute and
10
11 476 chronic BJI isolates were assessed using the Mann-Whitney U-test.
12
13
14 477

15
16 478 **Figure 3. Comparison of the major methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) bone and**
17
18 479 **joint infection (BJI) clones regarding their capacities to invade bone cells, induce**
19
20 480 **cytotoxicity, convert to a small colony variant (SCV) phenotype, and form biofilm.**

21
22
23 481 A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

24
25 482 B: Correlation between the internalization rate of MSSA clinical isolates and BJI evolution
26
27 483 delay

28
29 484 C: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection by MSSA isolates

30
31 485 D: Proportion of phenotype switching to SCVs

32
33
34 486 Clonal complex assignment was based on a DNA microarray analysis (Identibac *S. aureus*
35
36 487 genotyping®, Alere Technologies). Each strain was evaluated in duplicate in a single
37
38 488 experiment in the gentamicin protection assay and in triplicate in three independent
39
40 489 experiments in the biofilm formation assay. LDH release and intracellular bacterial counts are
41
42 490 expressed relative to the results obtained with the 8325-4 reference strain.
43
44

45 491

46
47 492 **Figure 4. Osteoblast invasion, cytotoxicity, and small colony variant (SCV) intracellular**
48
49 493 **emergence of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) bone and joint infection (BJI)**
50
51 494 **isolates regarding the bacterial production of delta-toxin**

52
53 495 A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

54
55 496 B: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection with MSSA isolates
56
57
58
59
60

1
2
3 497 C: Proportion of phenotype switching to SCVs
4

5 498 D: Biofilm formation
6

7 499 Delta-toxin deficiency (delta-toxin -), as evaluated by MALDI-TOF spectrum analysis, was
8
9 500 considered to reflect accessory gene regulator (*agr*) dysfunction. Comparisons between the
10
11 501 delta-toxin + and - isolates were assessed using the Mann-Whitney U-test.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

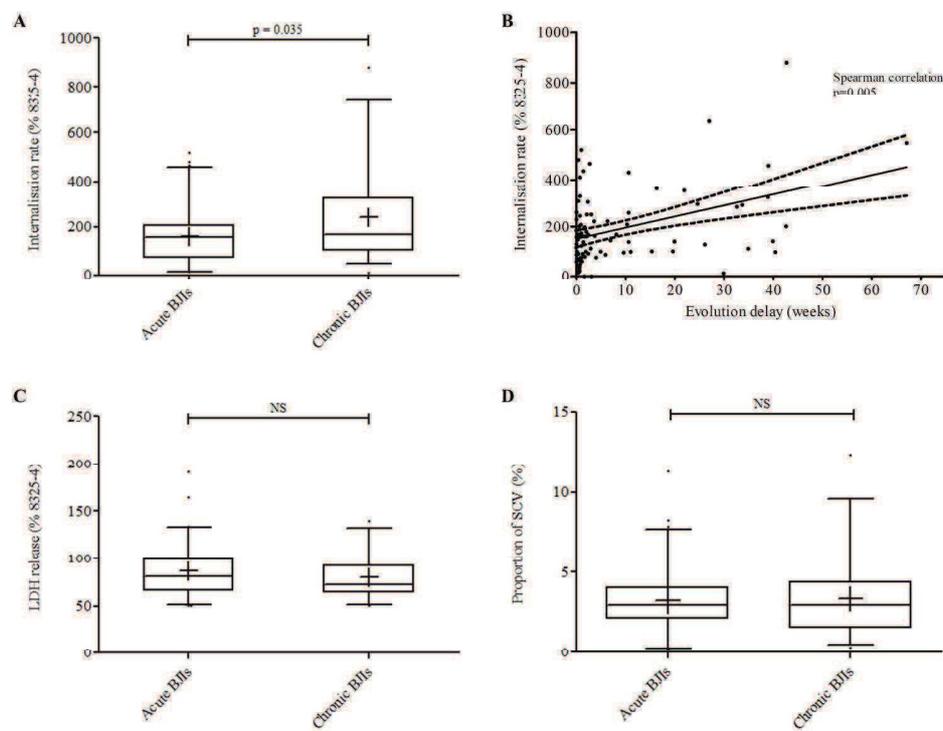


Figure 1. Difference in interactions between human osteoblasts and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains isolated from acute and chronic bone and joint infections (BJI)

A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

B: Correlation between the internalization rate of MSSA clinical isolates and BJI evolution delay

C: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection by MSSA isolates

D: Proportion of phenotype switching to small colony variants (SCVs)

Human osteoblastic MG-63 cells were infected for 2 h with 95 MSSA clinical isolates isolated from acute (i.e., time from symptom onset to microbiological diagnosis \leq 4 weeks; $n=64$) and chronic ($n=31$) BJI. After 24 h, the internalized bacteria were quantified by plating cell lysates, and infection-induced cytotoxicity was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) release into the cell culture supernatant; phenotype switching to SCVs was assessed by counting colonies with areas smaller than 5-fold less of the median area measured for all colonies. Each strain was evaluated in duplicate in a single experiment. LDH release and intracellular bacterial counts are expressed relative to the results obtained with the 8325-4 reference strain.

Comparisons between the acute and chronic BJI isolates were assessed using the Mann-Whitney U-test.

300x229mm (260 x 260 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

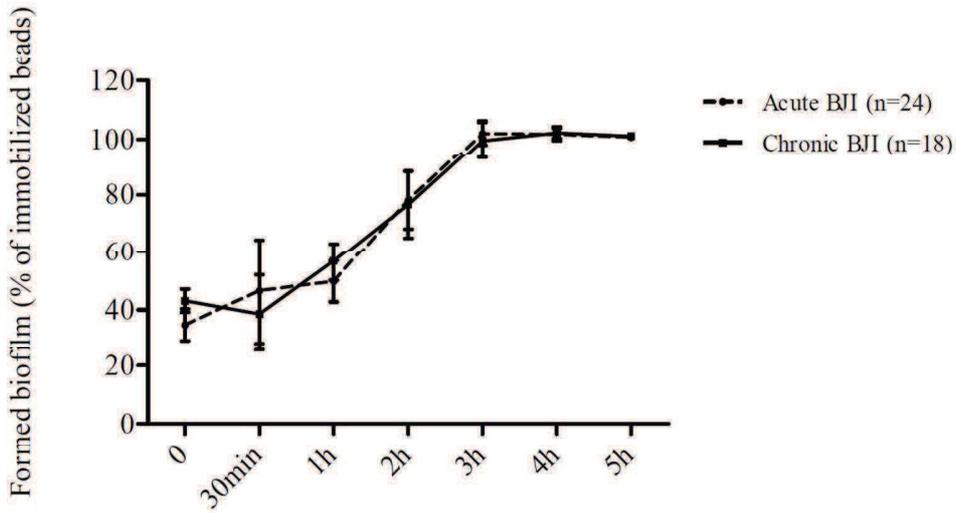


Figure 2. Difference in biofilm formation by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains isolated from acute and chronic bone and joint infections (BJI). Each strain was co-cultured with microscopic magnetic beads. Every hour, a culture plate was placed on a dedicated magnet support, which attracted the free beads to the center of the bottom of each well, forming a spot that was progressively attenuated while the beads were embedded in the biofilm. The numeric analysis of the spot intensity allowed an estimation of the proportion of biofilm formed by the proportion of immobilized beads. Each strain was evaluated in triplicate in three independent experiments. Comparisons between acute and chronic BJI isolates were assessed using the Mann-Whitney U-test.

149x90mm (300 x 300 DPI)

view

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

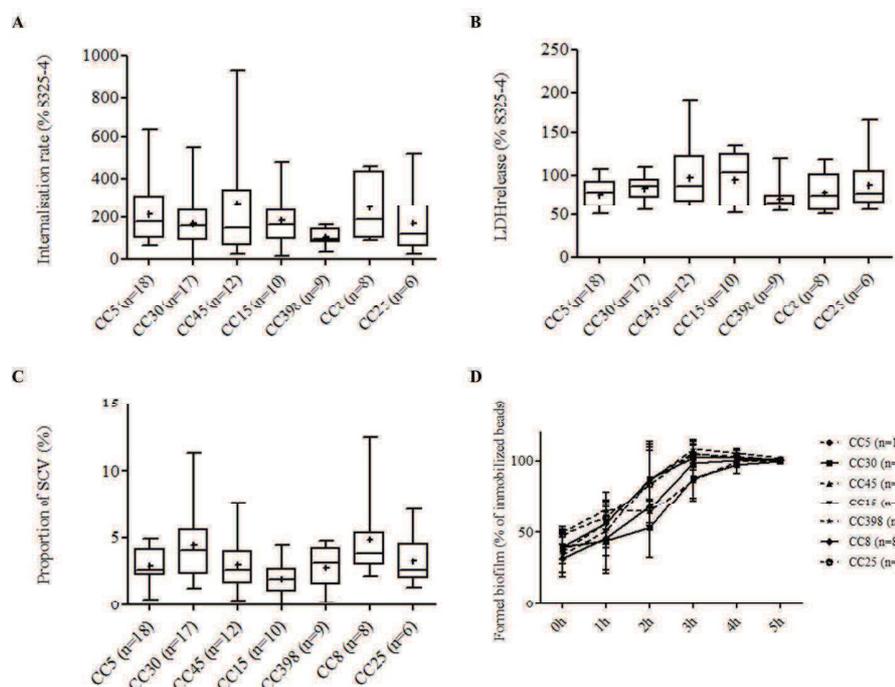


Figure 3. Comparison of the major methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) bone and joint infection (BJI) clones regarding their capacities to invade bone cells, induce cytotoxicity, convert to a small colony variant (SCV) phenotype, and form biofilm.

A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

B: Correlation between the internalization rate of MSSA clinical isolates and BJI evolution delay

C: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection by MSSA isolates

D: Proportion of phenotype switching to SCVs

Clonal complex assignment was based on a DNA microarray analysis (Identibac *S. aureus* genotyping®, Alere Technologies). Each strain was evaluated in duplicate in a single experiment in the gentamicin protection assay and in triplicate in three independent experiments in the biofilm formation assay. LDH release and intracellular bacterial counts are expressed relative to the results obtained with the 8325-4 reference strain.

319x229mm (244 x 244 DPI)

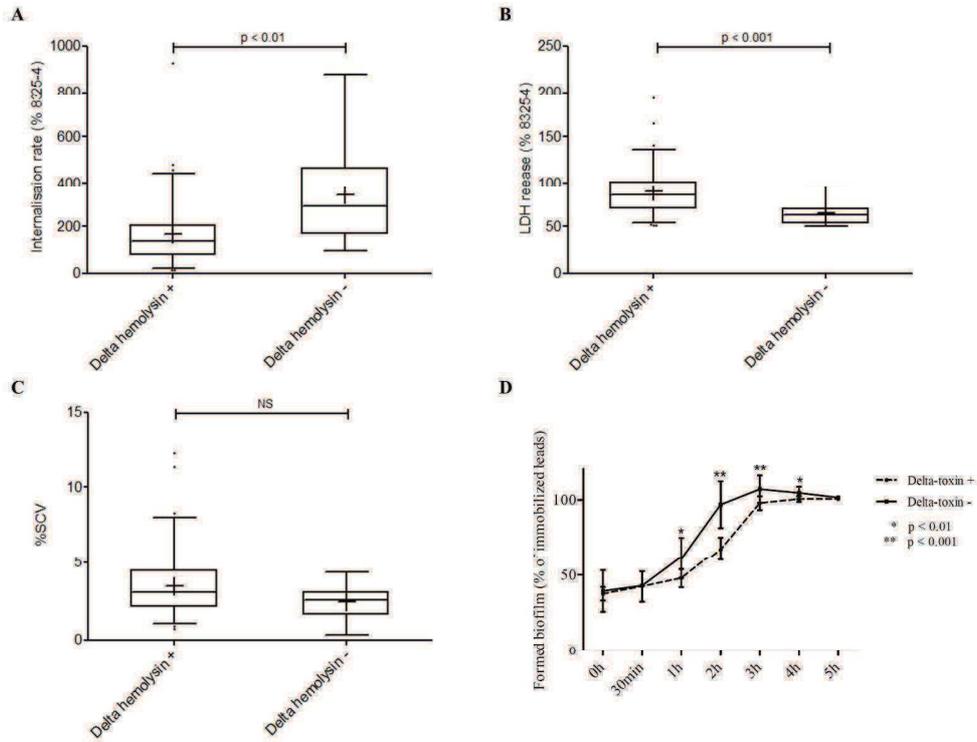


Figure 4. Osteoblast invasion, cytotoxicity, and small colony variant (SCV) intracellular emergence of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) bone and joint infection (BJI) isolates regarding the bacterial production of delta-toxin

A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

B: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection with MSSA isolates

C: Proportion of phenotype switching to SCVs

D: Biofilm formation

Delta-toxin deficiency (delta-toxin -), as evaluated by MALDI-TOF spectrum analysis, was considered to reflect accessory gene regulator (*agr*) dysfunction. Comparisons between the delta-toxin + and - isolates were assessed using the Mann-Whitney U-test.

300x229mm (260 x 260 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CINQUIEME PUBLICATION : Dual impact of live *Staphylococcus aureus* on osteoclast lineage, leading to increased bone resorption

Les IOA sont responsables de très lourdes séquelles fonctionnelles à l'origine d'une morbi-mortalité importante, d'un surcoût médical et d'un impact sociétal majeur (50% des patients atteints d'IOA ne reprennent pas leur activité professionnelle). Ces séquelles sont notamment imputables à la destruction osseuse progressive observée au site de l'infection. Dans le cas d'une infection sur prothèse, cette dégradation osseuse peut ainsi conduire à son descellement. Dans ce contexte, il est apparu essentiel de mieux comprendre la physiopathologie des IOA à *S. aureus* et les mécanismes menant aux lésions osseuses observées lors de ces infections.

L'os est un tissu en constant remodelage, assuré par l'action coordonnée des ostéoblastes (minéralisation osseuse) issus de la lignée mésenchymateuse, et des ostéoclastes (résorption osseuse) issus de la lignée monocytes/macrophages. Si de nombreuses études se sont penchées sur les interactions entre les bactéries et les ostéoblastes, l'impact direct de *S. aureus* vivants sur les ostéoclastes, les seules cellules connues à ce jour étant capables de résorber la matrice osseuse, n'a étonnement jamais été étudié. Outre leurs capacités de résorption, les ostéoclastes jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'infection et de l'inflammation. En effet, ces cellules d'origine hématopoïétique proviennent de la fusion de précurseurs appartenant à la lignée mono-macrophagique. Plusieurs équipes travaillant dans le domaine de l'ostéo-immunologie ont démontré l'existence d'un lien entre le système immunitaire et les ostéoclastes. Non seulement parce que ces cellules spécialisées conservent des marqueurs présents chez les monocytes/macrophages, mais surtout du fait de l'existence d'une plasticité non suspectée entre le système immunitaire et les ostéoclastes. En effet, les cellules dendritiques sont capables de se redifférencier en précurseurs pouvant fusionner pour donner naissance à des ostéoclastes matures. Enfin, ces derniers ont des capacités phagocytaires et de présentation d'antigène. Toutes ces propriétés font des ostéoclastes une cellule prépondérante dans le contrôle de l'infection et le maintien de la masse osseuse dans les infections ostéo-articulaires.

Sachant que *S. aureus* est le principal agent étiologique responsable d'IOA, qu'il est associé à une dégradation osseuse locale particulièrement importante, et que les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse, l'objectif de ce projet a été d'explorer l'induction de l'ostéolyse et la stimulation des ostéoclastes directement par *S. aureus*.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons développé un modèle *in vitro* d'infection de cellules ostéoclastiques murines primaires à différentes phases de leur différenciation. Les précurseurs ont été obtenus à partir de moëlle osseuse de souris C57/Bl6, puis cultivés en présence de cytokines ayant des propriétés ostéoclastogéniques (RANKL et M-CSF) afin d'induire leur différenciation en ostéoclastes matures. Deux souches de staphylocoques ont été utilisées, une souche de laboratoire 8325-4 et son mutant isogénique DU5883 délété pour le gène *fnb* codant la protéine FnBP (indispensable pour l'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes) dans le but d'identifier les mécanismes d'adhésion et d'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoclastes.

Après infection des précurseurs, les résultats ont montré une inhibition de l'ostéoclastogénèse par *S. aureus*. Pour comprendre les mécanismes d'inhibition, les mêmes expériences ont été réalisées avec des billes de latex d'une taille identique à celle des staphylocoques (0.5 et 2µm) ou avec des staphylocoques tués par la chaleur. Les billes n'inhibaient pas l'ostéoclastogénèse ce qui suggère que l'inhibition de la différenciation ostéoclastogénique n'est pas due à un effet particulière. La culture des précurseurs avec du surnageants de staphylocoques et l'infection des précurseurs avec les bactéries mortes induisaient une inhibition partiellement l'ostéoclastogénèse. La combinaison de ces données indique que l'inhibition de l'ostéoclastogénèse par *S. aureus* est principalement due à l'action des bactéries vivantes. La quantification des bactéries internalisées par étalement des lysats cellulaires sur gélose a montré que les staphylocoques sont capables d'être internalisés par les progéniteurs d'une manière indépendante de la présence de la protéine FnBP, suggérant un mécanisme d'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoclastes différent de celui des ostéoblastes. L'identification de la nature des cellules issues du blocage de l'ostéoclastogénèse des précurseurs par *S. aureus*, a été réalisée par immunophénotypage (identification des marqueurs membranaires par cytométrie en flux) et par caractérisation du profil de sécrétion cytokinique (Luminex). Ces cellules expriment à leur surface les marqueurs F4/80 et CD11b, caractéristiques de la population macrophagique et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que MIP-1 et MCP-1.

Comme détaillé dans la revue bibliographique, la naissance de l'ostéo-immunologie a prouvé la relation très étroite entre les cellules osseuses et le système immunitaire. Plusieurs équipes ont démontré le caractère pro-ostéoclastogénique de certaines cytokines. Nous avons ainsi voulu testé l'impact de la sécrétion cytokinique mis en évidence dans notre modèle. Nos résultats laissent penser qu'en s'orientant vers une différenciation macrophagique et en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, ces précurseurs infectés recrutent des précurseurs non-infectés capables de se différencier en ostéoclastes matures. Ces données suggèrent que, par un mécanisme indirect, le staphylocoque pourrait être

responsable de l'inflammation locale et de l'augmentation de la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes matures non infectés.

A l'inverse, les résultats que nous avons obtenus après infection par *S. aureus* des ostéoclastes différenciés, indiquent que l'infection des ostéoclastes matures conduit à un phénotype cellulaire inhabituel de type "gigantocellulaire". La mesure des aires cellulaires et du nombre de noyaux par ostéoclaste après marquage fluorescent de l'actine et des noyaux a permis de montrer que les ostéoclastes infectés possédait une taille plus importante et un nombre de noyaux plus important que les mêmes cellules non infectées. Ceci suggère que l'infection module les capacités de fusion des ostéoclastes. Par ailleurs, l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes matures infectés a été mesurée en évaluant la surface de résorption dans un modèle *ex vivo* dans lequel les ostéoclastes matures infectés et non infectés ont été cultivés sur une matrice minérale composée d'hydroxyapatite (principal composant de la matrice osseuse). Cette activité était 2.5 fois plus importante 72h après infection des ostéoclastes matures par rapport aux cellules non infectées. Comme précédemment, les mêmes résultats sont observés avec les deux souches de *S. aureus* (+/- *fnb*) démontrant ainsi que la protéine FnBP n'est pas impliquée dans les interactions entre staphylocoques et ostéoclastes.

Nos résultats suggèrent que les staphylocoques par un mécanisme direct sur les ostéoclastes matures et indirect via le blocage de l'ostéoclastogénèse et la différenciation des précurseurs en macrophages activés, sont capables d'augmenter la capacité de résorption osseuse.

Dual Impact of Live *Staphylococcus aureus* on the Osteoclast Lineage, Leading to Increased Bone Resorption

Sophie Trouillet-Assant,^{1,2,3,4,5,6} Marlène Gallet,^{4,5,6,7} Pauline Nauroy,^{4,5,6,7} Jean-Philippe Rasigade,^{1,2,3,4,5,6} Sacha Flammier,^{1,2,3,4,5,6} Peggy Parroche,^{2,3,4,5,6} Jacqueline Marvel,^{2,3,4,5,6} Tristan Ferry,^{1,2,3,4,5,6} Francois Vandenesch,^{1,2,3,4,5,6} Pierre Jurdic,^{4,5,6,7} and Frederic Laurent^{1,2,3,4,5,6}

¹Hospices Civils de Lyon, ²CIRI, International Center for Infectiology Research, University of Lyon, ³Inserm U1111, ⁴Ecole Normale Supérieure de Lyon, ⁵University of Lyon 1, ⁶CNRS, UMR5308 and ⁷Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Lyon, France

Background. Bone and joint infection, mainly caused by *Staphylococcus aureus*, is associated with significant morbidity and mortality, characterized by severe inflammation and progressive bone destruction. Studies mostly focused on the interaction between *S. aureus* and osteoblasts, the bone matrix-forming cells, while interactions between *S. aureus* and osteoclasts, the only cells known to be able to degrade bone, have been poorly explored.

Methods. We developed an in vitro infection model of primary murine osteoclasts to study the direct impact of live *S. aureus* on osteoclastogenesis and osteoclast resorption activity.

Results. Staphylococcal infection of bone marrow-derived osteoclast precursors induced their differentiation into activated macrophages that actively secreted proinflammatory cytokines. These cytokines enhanced the bone resorption capacity of uninfected mature osteoclasts and promoted osteoclastogenesis of the uninfected precursors at the site of infection. Moreover, infection of mature osteoclasts by live *S. aureus* directly enhanced their ability to resorb bone by promoting cellular fusion.

Conclusions. Our results highlighted two complementary mechanisms involved in bone loss during bone and joint infection, suggesting that osteoclasts could be a pivotal target for limiting bone destruction.

Keywords. Osteoclastogenesis; bone and joint infections; *Staphylococcus aureus*; resorption.

Bone is a mineralized tissue that is constantly remodeled under the simultaneous, coordinated action of 3 cell types: the bone matrix-resorbing osteoclasts, the bone matrix-forming osteoblasts, and osteocytes embedded in the mineralized bone matrix [1]. This physiological process is tightly regulated and crucial to maintaining a constant bone mass in adults. This balance, however, can be impaired to favor resorption in pathological conditions, such as osteoporosis or bone

and joint infection (BJI). *Staphylococcus aureus* is the leading cause of BJIs, such as osteomyelitis or prosthetic joint infections [2–4]. Clinical observations pinpoint that such staphylococcal infection leads to the local recruitment of immune cells and is marked by progressive bone loss [5].

Numerous studies have investigated the direct impact of *S. aureus* on osteoblasts [6]. It is now clear that this microorganism is able to adhere to, become internalized by, and intracellularly survive in and/or induce cell death of osteoblasts, depending on its virulence factor equipment [7, 8]. The role of microbial surface components that recognize adhesive matrix molecules has been explored. For instance, the bacterial fibronectin-binding proteins (FnBPs) are necessary and sufficient for the internalization of *S. aureus* in osteoblasts through their interaction with integrin $\alpha_V\beta_1$ [9, 10]. Claro et al have also recently demonstrated that *S. aureus* protein A can bind directly to preosteoblastic cells via

Received 21 February 2014; accepted 27 June 2014.

*S. T.-A. and M. G. contributed equally to this report.

Correspondence: Sophie Trouillet-Assant, PhD, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Université Lyon1, Laboratoire de Bactériologie, Groupement Hospitalier Nord, 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France (sophie.assant@chu-lyon.fr).

The Journal of Infectious Diseases

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiu386

tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR-1), resulting in osteoblast apoptosis, which prevents new bone formation [11–13]. Moreover, the interaction between *S. aureus* and osteoblasts promotes the secretion of osteoclastic cytokines such as receptor activator of NF- κ -B ligand (RANK-L), which enhances osteoclastogenesis. Similarly, Sanchez et al have shown that soluble factors that are present in the *S. aureus* biofilm formed on prosthetic materials are able to increase RANK-L expression and affect bone formation and bone resorption related to the inhibition of osteoblastic differentiation [14]. Furthermore, using a murine model of *S. aureus* osteomyelitis, Cassat et al recently showed that infected femurs lost approximately 10%–20% of their total cortical volume near the infectious focus, and they allocated the responsibility of this bone loss exclusively to the impact of the bacteria on osteoblastic cells [15].

Surprisingly, the direct impact of *S. aureus* on osteoclasts, which are the only cells known to be able to degrade bone, has not been extensively explored. Mature osteoclasts are large, multinucleated cells that are generated from the fusion of precursors belonging to the monocyte/macrophage lineage. These cells form an actin-rich sealing zone that delimits the resorption lacuna and into which H⁺ protons and multiple proteases are secreted. The fast-growing field of osteoimmunology [16, 17] has demonstrated an unsuspected link between the immune system and osteoclasts. For instance, osteoclasts share conserved signaling pathways with monocytes/macrophages; they are antigen-presenting cells [18]. We and others have shown that dendritic cells are able to transdifferentiate and fuse to give rise to mature resorbing osteoclasts [19, 20]. These cellular properties suggest that osteoclasts might play a major role in staphylococcal BJI in the local bone resorption, as well as in the control of inflammation. Nevertheless, the very few studies that have explored the direct interaction between *S. aureus* and osteoclasts have only tested staphylococcal extracts (so-called surface-associated material) or specific, purified staphylococcal components, such as lipoteichoic acid [21]. The results from these studies are divergent and depend upon the protocols used [22, 23]. For instance, Kim et al demonstrated that bacterial lipopeptides enhanced osteoclast differentiation, whereas Yang et al showed that staphylococcal lipoteichoic acid inhibited osteoclastogenesis [24]. These conflicting data suggest that the impact of staphylococci on osteoclastogenesis cannot be evaluated only through one bacterial protein or inactivated staphylococci. Indeed, damages induced by *S. aureus* on eukaryotic cells are caused by a combination of virulence factors. This led us to investigate the direct and global impact of live *S. aureus* on osteoclastogenesis and resorption activity, using an in vitro infection model of precursors and mature osteoclasts. Our results describe 2 complementary mechanisms suggesting that live *S. aureus* indirectly and directly enhances bone resorption mediated by osteoclasts.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

The methicillin- and gentamicin-susceptible *S. aureus* reference strain 8325-4 and its mutant DU5883 deleted for *fnbA/B* genes, were generous gifts from Tim Foster [25]. *S. aureus* strain 6850 (53 657; ATCC, Manassas, VA) was also used. For specific experiments, heat-killed bacteria were prepared by exposing bacteria to a temperature of 95°C for 20 minutes.

Infection of Osteoclasts by *S. aureus*

Mice were maintained in our animal facility and cared for in accordance with French laws. All animal work was approved by the Direction Départementale des Services Vétérinaires (French national agreement B691230303).

Murine primary bone marrow precursors were differentiated into osteoclasts using macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and RANK-L as described elsewhere [26]. Osteoclast precursors and mature osteoclasts were infected (for 2 hours at 37°C) at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 to allow the adhesion and internalization of bacteria. Then, as previously described, we used the gentamicin protection assay for selection of intracellular *S. aureus* [27].

Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP)-Negative Cells

The characterization of TRAP-negative mononuclear cells obtained after infection of precursors was based on (1) membrane marker identification and (2) cytokine release profiling. Briefly, the cells were labeled with a combination of antibodies to CD11b (N418, ebiosciences, Paris, France), LY6C (AL21, BD Biosciences, San Jose, CA), LY6G (1AB, BD Biosciences), and F4/80 (BM8, ebiosciences) immediately after bone marrow extraction, 4 or 10 days after infection in presence of M-CSF with or without RANK-L. Controls were also realized with uninfected cells. Flow cytometry acquisition was performed using a LSRII flow cytometer (BD Biosciences), and analysis was performed using FlowJo Software (Tree Star, Stanford, CA). In addition, secretion of cytokines/chemokines was measured in cell-culture supernatants, using a Luminex analyzer (Luminex, Austin, TX) and Mouse Cytokine 23-plex Panel Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's recommendations.

Cell Staining, Microscopy, and Quantification

To investigate the impact of *S. aureus* infection on osteoclast fusion, the cell surface area and number of nuclei per mature osteoclast were analyzed using immunofluorescence labeling ([Supplementary Materials](#)).

Bone Resorption Assays

Murine bone marrow precursors were differentiated into osteoclasts for 5 days on a mineralized matrix (OsteoCorning, Corning, MA) with M-CSF and RANK-L. Then, mature osteoclasts

were infected by *S. aureus* as described above. Seventy-two hours after infection, the cells were lysed by osmotic shock, and OsteoCorning Assay plates were stained with phosphate-buffered saline/5% silver nitrate (Sigma-Aldrich) to quantify resorption, using a Leica DMI6000 microscope (Nanterre, France) and Fiji software [26].

Statistical Analysis

Comparisons of the medians of the quantitative data were performed using nonparametric Mann–Whitney tests (XLStat software v7.5.2; Addinsoft, Paris, France). The significance threshold was set at 0.05.

RESULTS

S. aureus Is Internalized Into Precursors and Mature Osteoclasts Independently of the Presence of FnBP

Bone marrow–derived osteoclast precursors and mature osteoclasts were infected with 2 strains of live *S. aureus*, 8325-4 and

DU5883 (Δfnb), to evaluate whether the infection mechanisms were similar to those involving osteoblasts, in which endocytosis of the bacteria occurred after the FnBP– $\alpha_V\beta_1$ integrin interaction. Then, intracellular bacteria were counted 3, 24, 48, or 72 hours after infection. The results were expressed as percentages of inoculum. Three hours after infection, the mean internalization rates (\pm SD) of the 8325-4 and DU5883 strains in the precursor cells were $0.53\% \pm 0.16\%$ and $0.78\% \pm 0.43\%$, respectively, and decreased gradually over time (Figure 1A). In comparison, the rate of internalization was 18-fold higher in mature osteoclasts than in precursor cells (mean \pm SD, $13.33\% \pm 9.12\%$ and $16.54\% \pm 8.57\%$ for 8325-4 and DU5883, respectively) (Figure 1B). However, the bacteria were cleared as efficiently as in the precursors in <72 hours. These results were confirmed by microscopic evaluation showing that *S. aureus* organisms were adherent on and internalized into mature osteoclasts (Figure 1C and 1D, respectively). Taken together, these data showed that live *S. aureus* could be efficiently internalized into osteoclast precursors or mature osteoclasts, but not at the same

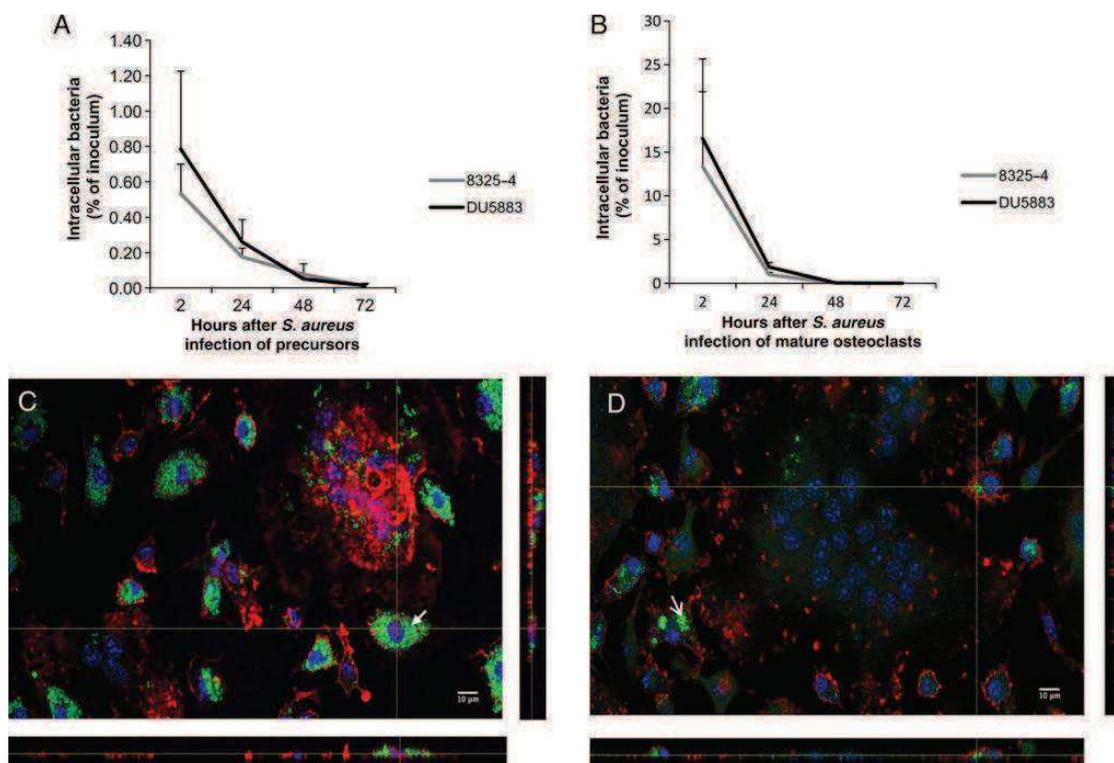


Figure 1. Live *Staphylococcus aureus* binds to and is internalized by bone marrow–derived cells and mature osteoclasts. Murine bone marrow precursors (A) or mature osteoclasts (B) were infected with *S. aureus* reference strain 8325-4 for 2 hours at a multiplicity of infection of 10:1. Cell invasion was quantified using a gentamicin protection assay at 3, 24, 48 and 72 hours after infection of the osteoclast precursors (A) or mature osteoclasts (B). The mean number (\pm SD) of colony-forming units per well was expressed as a percentage of the inoculum and was derived from 3 independent experiments in duplicate. After infection, microscopic evaluation showed that *S. aureus* was able to adhere to (C) and be internalized by (D) mature osteoclasts. For the adhesion assay, extracellular bacteria (closed arrow), 2 hours post-infection, were labeled using the membrane-impermeable fluorochrome vancomycin-Bodipy FL (green; C). For the invasion assay, performed 2 hours after infection, extracellular bacteria were disrupted by lysostaphin treatment (for 1 hour at 37°C), the cells were permeabilized, and intracellular bacteria (open arrow) were labeled with VBFL (D). The actin cytoskeleton of the cells was counterstained with phalloidin (red), and nuclei were stained with Hoechst (blue). Bars represent 10 μ m.

rate. In contrast to osteoblast, the *S. aureus*–uptake mechanism in osteoclasts is independent of FnBP.

Live *S. aureus* Infection Inhibits Osteoclastogenesis

We then evaluated whether bacterial infection of the precursors could impact osteoclastogenesis. Freshly isolated murine bone marrow cells were cultured in control conditions or in the presence of live 8325-4 or DU5883 *S. aureus* for 2 hours. The cells were then grown with M-CSF and RANK-L to induce osteoclast differentiation. Four days later, multinucleated, TRAP-positive osteoclasts were formed in the control, uninfected conditions (Figure 2A). In contrast, after internalization of live 8325-4 or DU5883 *S. aureus* into the precursors, only a mean (\pm SD) of $4.42\% \pm 3.64\%$ and $3.25\% \pm 2.88\%$ of the cells, respectively, were multinucleated and TRAP positive, compared with

uninfected cells (control, 100% [$P < .0001$]; Figure 2B and 2C). Again, this dramatic osteoclastogenesis inhibition was independent of FnBP expression. Because strain 8325-4 is an *rsbU* mutant that expresses high levels of hemolysins and proteases, we also tested whether osteoclastogenesis inhibition was also observed with *S. aureus* harboring wild-type *rsbU*. Use of live 6850 *S. aureus* again revealed that only a mean (\pm SD) of $3.35\% \pm 1.91\%$ of the cells were multinucleated and TRAP positive. Of note, cell viability, as measured by an MTT-based cytotoxicity assay (Supplementary Materials), was not significantly changed in any of the subgroups (data not shown), which demonstrated that the *S. aureus* inhibition of osteoclastogenesis was not associated with a cytotoxic effect of the infection.

Because culturing of bone marrow–derived osteoclast precursors with nonbiological particles has been reported to inhibit

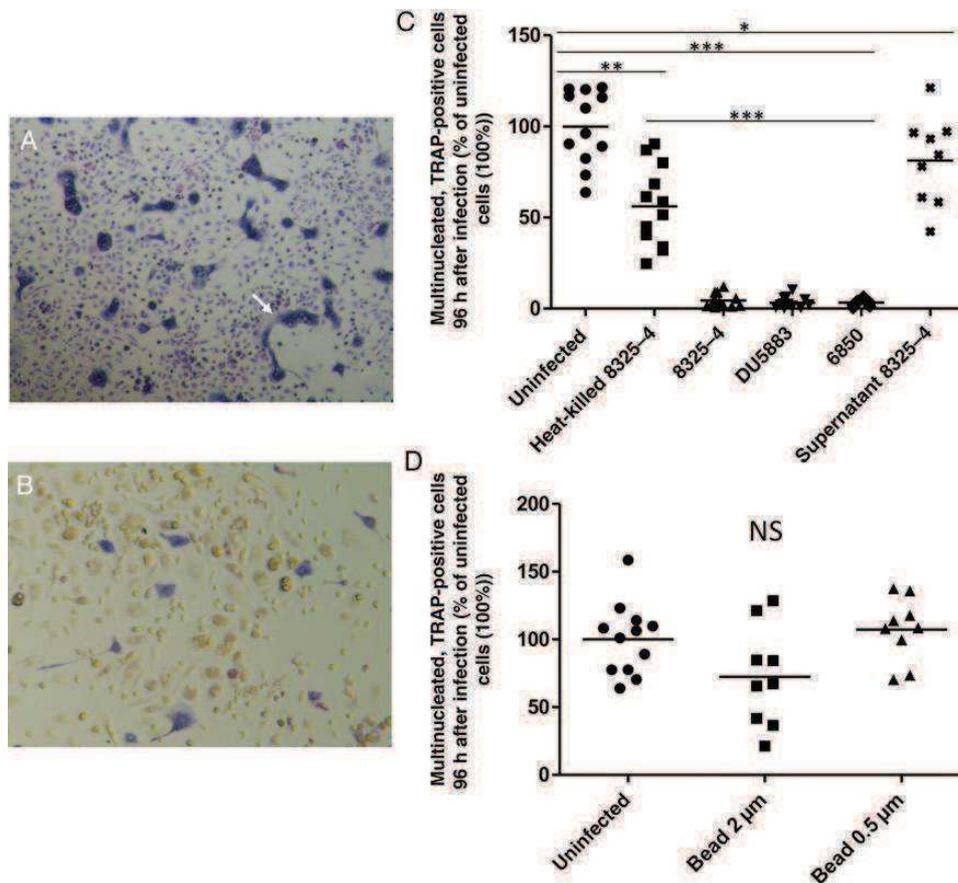


Figure 2. Infection of bone marrow cells by live *Staphylococcus aureus* inhibits osteoclastogenesis. Murine bone marrow–derived osteoclast precursors were infected by different *S. aureus* strains (multiplicity of infection [MOI], 10:1) and grown in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of NF κ -B ligand. After 4 days in culture, the cells were fixed and stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity. *A*, In the absence of infection, all cells were multinucleated giant and TRAP-positive cells (arrow). *B*, After infection with the 8325-4 strain, few cells appeared to be TRAP positive, and no multinucleated giant cells were formed. *C*, Osteoclast precursors were either uninfected, either put in contact for two hours with live 6850 strain, or 8325-4 strain, or its isogenic mutant *fmb*-negative, DU5883, or heat-killed 8325-4 strain or supernatant of 8325-4 strain. Multinucleated TRAP-positive cells were then quantified 96 post-infection. *D*, Multinucleated, TRAP-positive cells were quantified 96 hours after osteoclast precursors were incubated for 2 hours with latex beads of 2 or 0.75 μ m in diameter (MOI, 10:1). Horizontal bars denote means of multinucleated, TRAP-positive cells obtained 96 hours after infection (*C* and *D*). Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test. *** $P < .001$ and ** $P < .01$. Abbreviation: NS, not significant.

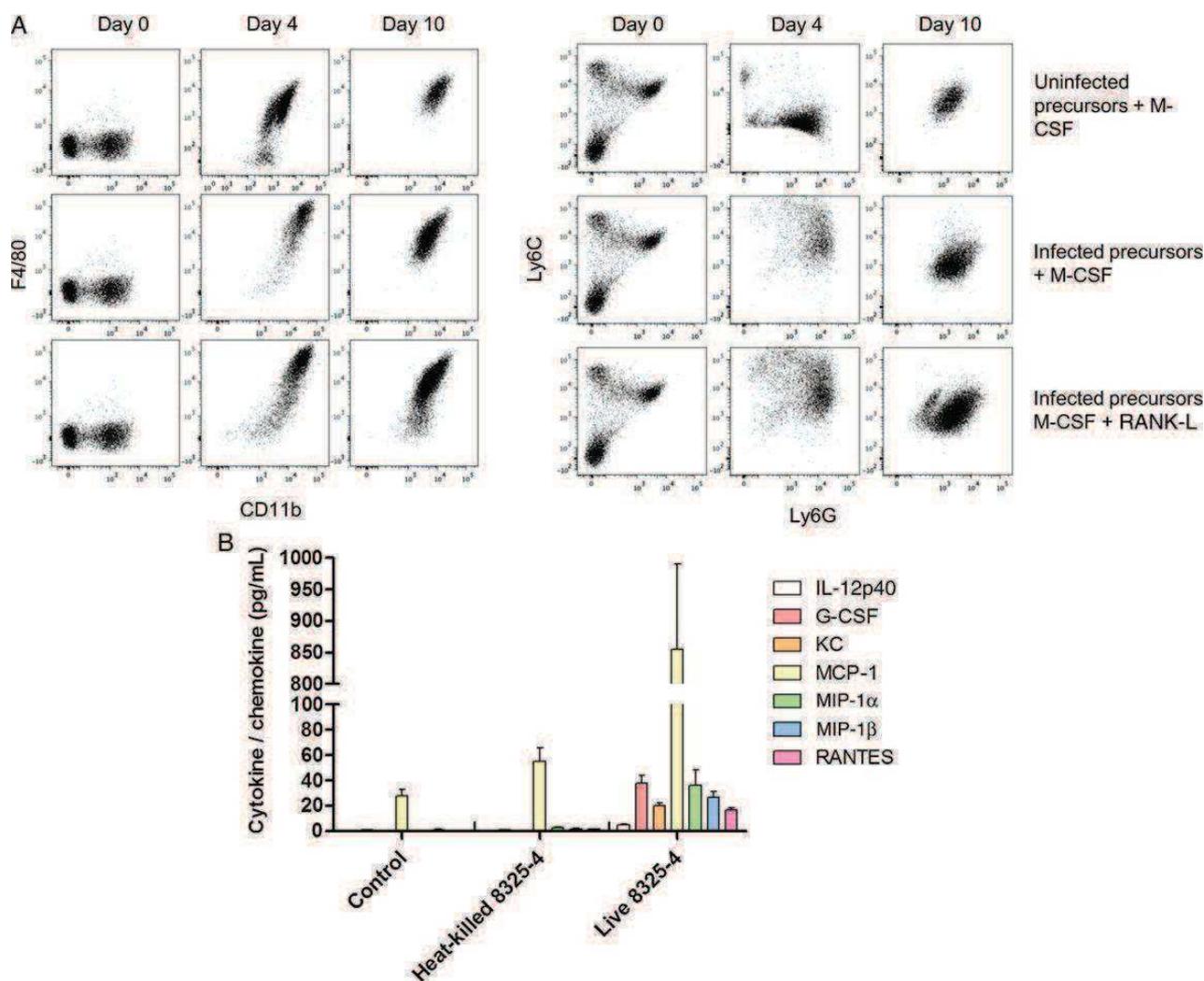


Figure 3. Mononuclear, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-negative cells obtained after *Staphylococcus aureus* infection of precursor cells are inflammatory macrophages. *A*, Bone marrow–derived osteoclast precursors of C57/B1/6J mice were either uninfected or infected for 2 hours with the *S. aureus* 8325-4 strain. The precursors were then grown in presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) alone to differentiate into macrophages or in the presence of M-CSF and receptor activator of NF κ -B ligand (RANK-L) to induce osteoclast differentiation. The cells were fixed after bone marrow extraction (day 0) or after 4 or 10 days of differentiation to analyze the expression levels of membrane markers (F4/80, CD11b, Ly6C, and Ly6G) by flow cytometry. *B*, To identify the cytokine-release profiles, osteoclast precursors were infected with live or heat-killed *S. aureus* 8325-4 (multiplicity of infection, 10:1) 24 hours after extraction and cultivated in the presence of M-CSF and RANK-L. The supernatants were collected 4 days later, and the cytokine levels in the cell culture supernatants were quantified using the Luminex assay. The data represent 1 experiment that was performed in triplicate and is representative of the 2 other experiments. Cytokine release in cells infected with live *S. aureus* 8325-4 was significantly higher than in cells infected with heat-killed *S. aureus* 8325-4; cytokine release in *S. aureus*-infected cells (live or heat killed) was also higher than in noninfected cells ($P < .05$ for all pairwise differences with respect to each tested cytokine). Abbreviations: G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; IL-12p40, interleukin 12p40; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein 1 α ; MIP-1 β , macrophage inflammatory protein 1 β ; KC, keratinocyte chemoattractant; RANTES, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted.

osteoclastogenesis [28,29], we tested whether, in our model, the live *S. aureus* impact was due to an effect of particulates or was due to the activity of the live bacteria. For that purpose, using the same protocol used with live *S. aureus*, osteoclast precursors were grown for 2 hours in the presence of either latex beads within the size range of staphylococci (0.5 and 2 μ m; Life Technologies, Carlsbad, CA) or heat-inactivated *S. aureus* or

supernatant of *S. aureus* 8325-4. The results in Figure 2C show that supernatant or heat-killed staphylococci only partially inhibited osteoclastogenesis (mean \pm SD, 81% \pm 24.22 and 61% \pm 23.33 of TRAP-positive cells respectively) compared with uninfected cells (100%). Conversely, in similar conditions, latex beads did not significantly affect osteoclastogenesis (Figure 2D). Altogether, these data demonstrated that infection of

bone marrow precursors by live *S. aureus* dramatically inhibited osteoclastogenesis.

***S. aureus* Infection of Osteoclast Precursors Promotes Their Differentiation Into Macrophages That Secrete Proinflammatory Cytokines**

Because osteoclasts are derived from the monocyte/macrophage pathway, we hypothesized that the infected, adherent, mononucleated, TRAP-negative cells obtained after infection of osteoclast precursors were macrophages. To test this hypothesis, we analyzed the cell surface markers (CD11b, Ly6C, Ly6G, and F4/80) of (1) uninfected bone marrow cells that were differentiated into macrophages with M-CSF alone, (2) *S. aureus*-infected bone marrow cells that were differentiated into macrophages with M-CSF alone, and (3) *S. aureus*-infected bone marrow cells that were cultured in the presence of RANK-L and M-CSF, which classically allows for differentiation of bone marrow cells into osteoclasts. TRAP-negative cells, which were present 4 and 10 days after infection and RANK-L/M-CSF induction, displayed a marker profile that included high-level expression of Ly6C, CD11b, and F4/80 similar to those of uninfected precursors or *S. aureus*-infected precursors that were differentiated in macrophages by using M-CSF alone (Figure 3A). These findings suggested that after *S. aureus*

infection, bone marrow-derived osteoclast precursors were no longer able to differentiate into osteoclasts, even in the presence of pro-osteoclastic cytokines (M-CSF/RANK-L), but differentiated into macrophages (Figure 3A).

We then determined whether these *S. aureus*-infected macrophages were activated macrophages and exhibited a modified cytokine profile. Measurement of the cytokines/chemokines secretions by use of Luminex revealed that among the tested cytokines (interleukin (IL) 1 α [IL-1 α], IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL12-p70, IL-13, IL-17, eotax in, granulocyte macrophage colony-stimulating factor [G-CSF], interferon γ , keratinocyte chemoattractant [KC], macrophage inflammatory protein 1 α [MIP-1 α], MIP-1 β , regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, [RANTES] and tumor necrosis factor α), steady-state uninfected osteoclasts secreted mostly monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). Their profiles matched those that were obtained with osteoclasts whose precursors had been exposed to heat-killed *S. aureus* for 2 hours (Figure 3B). In contrast, macrophages obtained from precursors that had been cocultured with live *S. aureus* for 2 hours secreted quantitatively more proinflammatory cytokines, especially RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , G-CSF, KC, IL12p40, and MCP-1 (Figure 3B). Such a cytokine profile is classically found in activated macrophages.

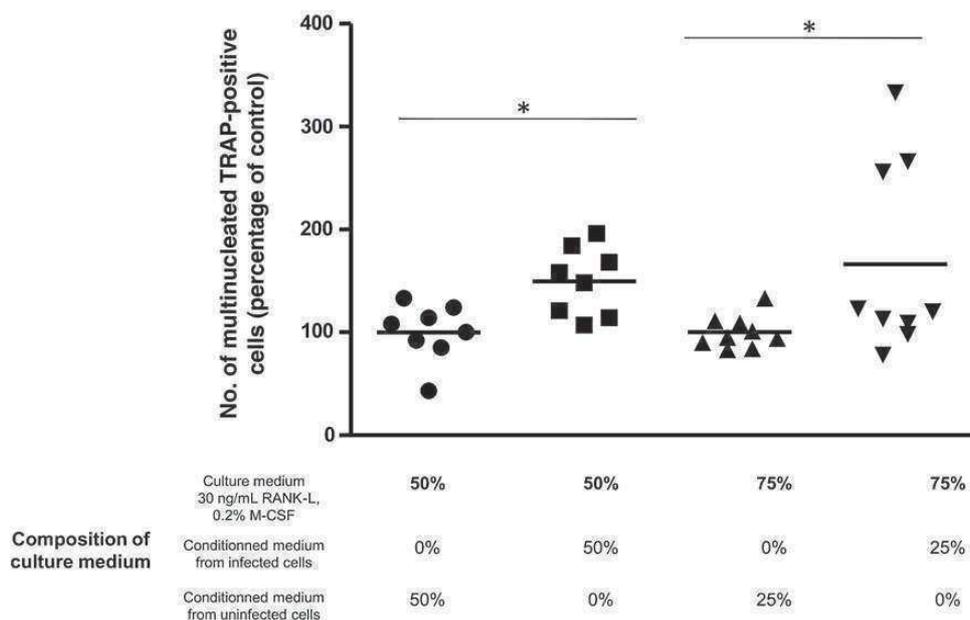


Figure 4. Infected precursors release pro-osteoclastogenic factors. Bone marrow precursors, either infected or uninfected, were grown with receptor activator of NF κ -B ligand (RANK-L) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Supernatant was collected 4 days after infection and used as conditioned medium. New, bone marrow-derived osteoclast precursors were then grown in regular culture medium in the presence of M-CSF plus RANK-L, and conditioned medium was added at either a 25% or 50% concentration. After 4 days in the presence of conditioned medium, the number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive, multinucleated osteoclasts was determined for each condition. The results are expressed as the percentage of TRAP-positive osteoclasts that were obtained in the presence of infected-conditioned medium versus the percentage of TRAP-positive osteoclasts obtained in the presence of uninfected-conditioned medium (100%). Horizontal bars denote means derived from 3 experiments realized in triplicate. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. * $P < .05$.

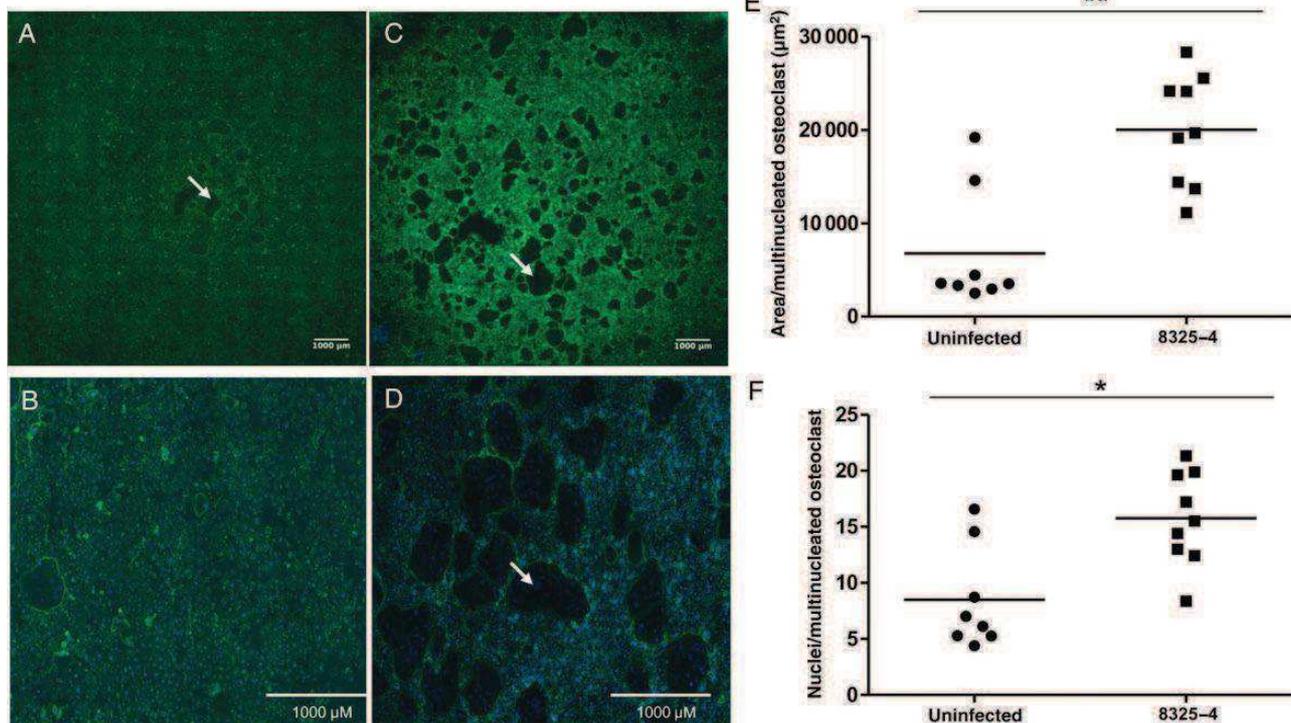


Figure 5. Live *Staphylococcus aureus* infection of osteoclasts enhances fusion. Bone marrow–derived mature osteoclasts, which were obtained after 5 days of differentiation with receptor activator of NF κ -B ligand and macrophage colony-stimulating factor, were infected by the *S. aureus* 8325-4 strain. After 72 hours of culture, uninfected (A and B) and *S. aureus*–infected osteoclasts (C and D) were stained with Hoechst (blue) and phalloidin that was coupled with Alexa 488 (green). Panels B and D are magnifications of the images in panels A and C, respectively. Bars represent 1000 μm . Area (E) and nuclei (F) measurements in multinucleated osteoclasts (arrow) were performed using Fiji software. Horizontal bars denote means derived from 3 independent experiments in triplicate. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test. ** $P < .01$ and * $P < .05$.

Results indicated that *S. aureus* infection of bone marrow precursors blocks osteoclastogenesis but promotes their differentiation into macrophages, which secrete a panel of proinflammatory cytokines.

Proinflammatory Cytokines Secreted by Macrophages Promote Osteoclastogenesis

Because it is known that proinflammatory cytokines facilitate osteoclastogenesis, we determined whether the cytokine panel secreted by live *S. aureus*–infected macrophages could enhance osteoclastogenesis. Bone marrow precursors, either infected or uninfected, were grown with RANK-L and M-CSF. Supernatant was collected 4 days after infection and used as conditioned medium (at 25% or 50% concentration with complete culture medium) for osteoclast precursor culturing. After 4 days in the presence of conditioned medium, the number of mature osteoclasts recovered from the infected cells was 1.49- and 1.66-fold higher in the presence of 50% and 25% of supernatant, respectively, than in the presence of the same proportions of supernatant recovered from uninfected cells ($P = .05$ for both; Figure 4). These data demonstrated the pro-osteoclastogenic properties of

the proinflammatory cytokines secreted by TRAP-negative, live *S. aureus*–infected macrophages.

Together, these results showed that infection of bone marrow–derived osteoclast precursors by live *S. aureus* directly blocks osteoclastogenesis but has an indirect effect on osteoclastogenesis through the release of proinflammatory cytokines.

Infection of Mature Osteoclasts by Live *S. aureus* Induces Fusion and Enhances Bone Resorption Capacities

We then decided to evaluate the impact of staphylococcal infection on mature osteoclasts.

Imaging analyses, after labeling of nuclei and actin, showed that in the infected wells, the mature osteoclasts contained twice more nuclei (mean \pm SD, 15.75 ± 4.19 vs 8.48 ± 4.59 /multinucleated osteoclast; $P = .012$) and had a cellular area 4-fold greater, compared with findings in uninfected wells (mean \pm SD, $20\,010 \pm 5966$ vs 6766 ± 6390 μm^2 /multinucleated osteoclast [$P = .005$]; Figure 5). The number of multinucleated osteoclasts was 4.2-fold higher in the infected wells than in the uninfected wells (mean (\pm SD), 225 ± 128 vs 53 ± 23 multinucleated osteoclasts/well, respectively; $P < .001$). These data

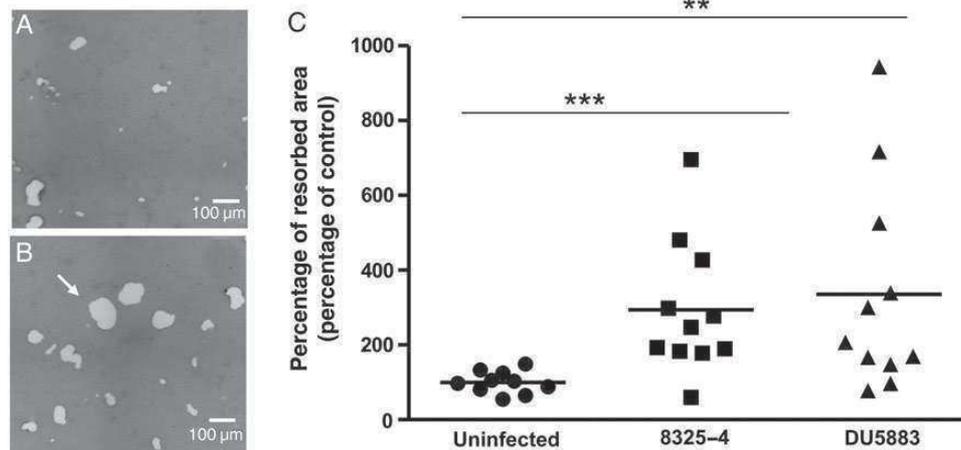


Figure 6. *Staphylococcus aureus* enhances bone resorption mediated by mature osteoclasts. Bone marrow–derived precursors were differentiated into osteoclasts for 6 days on a mineralized OsteoCorning matrix in the presence of receptor activator of NFκ-B ligand and macrophage colony-stimulating factor. Then, the differentiated osteoclasts were infected for 2 hours by live *S. aureus* 8325-4 or its isogenic mutant DU5883 ($\Delta fnbA/B$). After 72 hours of culture, the osteocorning matrices were stained with 5% silver nitrate to measure the resorbed area (arrow). The percentages of matrix that were resorbed by uninfected (A) or *S. aureus*-infected (B) osteoclasts were measured using the Fiji software. Bars represent 100 μm (A and B). Horizontal bars denote means of the percentages of the resorbed area per well derived from 3 independent experiments in triplicate (C). Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test. *** $P < .001$ and ** $P < .01$.

suggested that *S. aureus* infection increased fusion events and led us to determine whether these cellular modifications had any impact on bone resorption capacities.

To evaluate the effect of infection on bone resorption, *S. aureus*-infected mature osteoclasts were cultured on a hydroxyapatite matrix. The mean resorbed area (\pm SD) by cells infected with 8325-4 or DU5883 was 2.93 ± 1.78 -fold and 3.35 ± 2.8 -fold higher, respectively, than the resorbed area in uninfected wells ($P < .01$ for both; Figure 6). These results highlighted that independent of the presence of FnBP, *S. aureus* infection increased the capacity of resorption of osteoclasts.

DISCUSSION

Using an in vitro model to study the interaction between live *S. aureus* and osteoclasts, we described 2 complementary mechanisms that could contribute to bone loss during BJI (Figure 7). First, infection of osteoclast precursors hijacked their differentiation toward activated macrophages, which actively secrete proinflammatory cytokines. These cytokines are able to subsequently enhance the bone resorption capacity of uninfected mature osteoclasts and may promote the migration and osteoclastogenesis of new, uninfected precursors to the site of infection. Second, infection of mature osteoclasts by *S. aureus* directly enhances their ability for bone resorption.

In the literature, all published studies used synthetic bacterial proteins, inactivated *S. aureus*, or Toll-like receptor ligands to investigate the impact of *S. aureus* on osteoclasts and obtained divergent results [21–24]. These conflicting results revealed that

the interaction of *S. aureus* and host cells is more complex than the simple extracellular interactions of isolated staphylococcal proteins with the host cell membrane. Here, we used short-term infections of osteoclasts (precursors and mature) by live *S. aureus* to take into account the global impact of this bacterium, including the influence of staphylococcal surface-expressed components and secretome. The 2 strains, 8325-4 and its isogenic mutant DU5883 (Δfnb), were internalized at the same rate, suggesting that the infection mechanisms were different from that for osteoblasts, which involves the endocytosis of the bacteria after the FnBP- $\alpha_v\beta_1$ integrin interaction. We hypothesized that the internalization mechanisms could be phagocytosis due to the phagocytic properties of osteoclasts [30]. Future studies are needed to identify the mechanisms involved. This infection of bone marrow–derived osteoclast precursors has a direct inhibitory effect on osteoclastogenesis. Contrary to live *S. aureus*, our results showed that short exposure to latex beads did not affect osteoclastogenesis and that heat-killed *S. aureus* or supernatant of *S. aureus* coculture only partially inhibited osteoclastic differentiation. Collectively, these results demonstrate that live *S. aureus* plays a major role in the inhibition of osteoclastogenesis of bone marrow–derived osteoclast precursors. Nevertheless, other osteoclast progenitors are found, notably in hematopoietic tissues, as well as in the bloodstream [31]. Others experiments, such as those involving spleen cells, are needed to confirm that *S. aureus* can also inhibit osteoclastogenesis from other progenitors.

Additionally, we have shown that infection of osteoclast precursors with staphylococci redirected their differentiation from

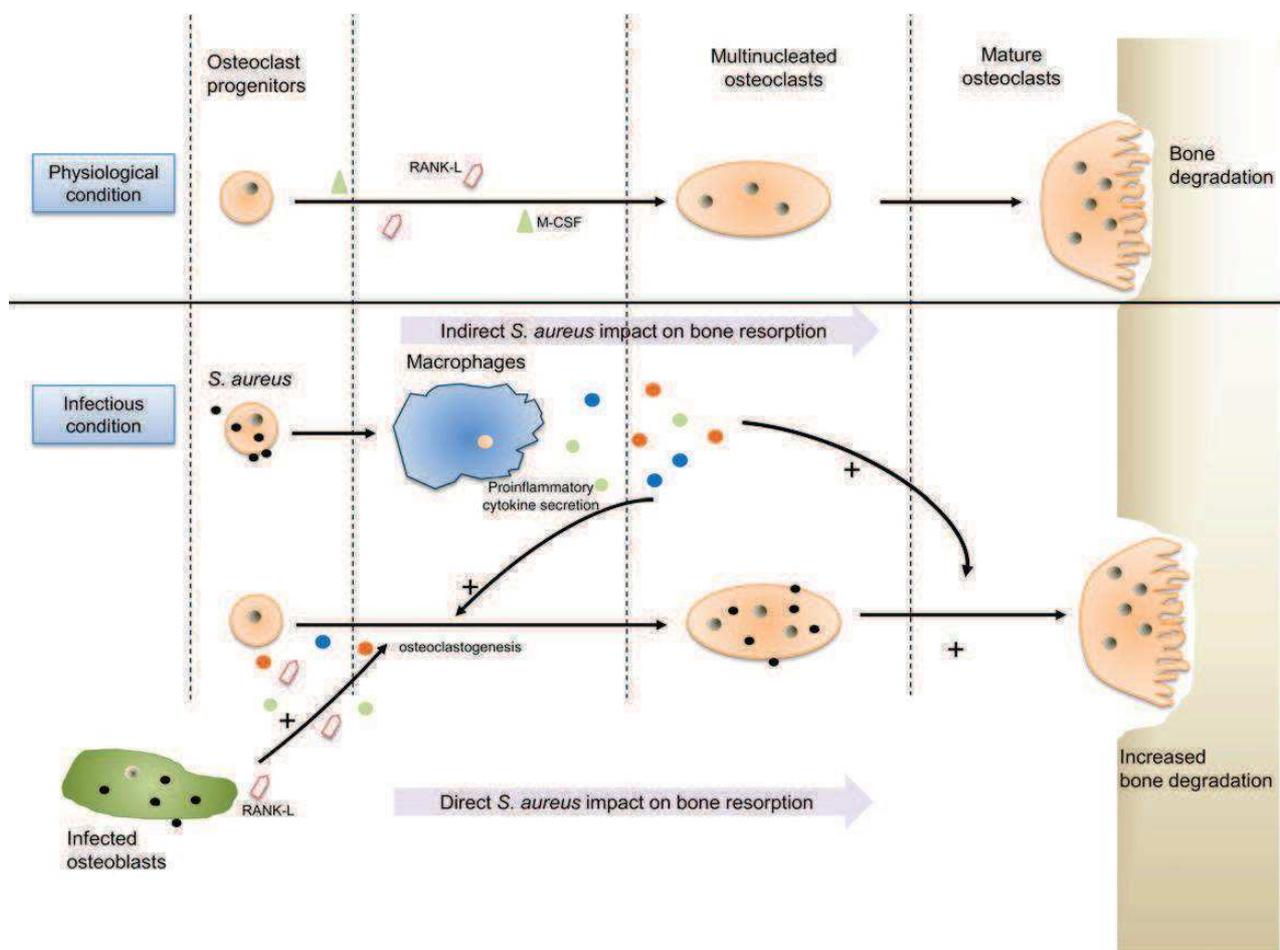


Figure 7. Schematic representation of the impact of *Staphylococcus aureus* on bone degradation. In physiological conditions, mature osteoclasts are large, multinucleated cells that are generated from the fusion of precursors belonging to the monocyte/macrophage lineage. In *S. aureus* bone and joint infection, using an in vitro infection model, we described 2 complementary mechanisms that could contribute to bone loss during bone and joint infection. In the first mechanism, infection of osteoclast precursors hijacked their differentiation toward activated macrophages, which actively secrete proinflammatory cytokines. These cytokines are able to subsequently enhance the bone resorption capacity of uninfected mature osteoclasts and may promote the migration and osteoclastogenesis of new, uninfected precursors to the site of infection. In the second, infection of mature osteoclasts by *S. aureus* directly enhances their ability for bone resorption. Abbreviations: M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; RANK-L, receptor activator of NF κ -B ligand.

mature osteoclasts to macrophages. Moreover, these results are in accordance with previous studies indicating the existence of plasticity between the immune system and osteoclasts. We have also showed that these newly differentiated macrophages secrete high levels of proinflammatory chemokines that act as pro-osteoclastogenic factors. These cytokines, especially MIP-1 α and MCP-1, are known to enhance the capacity of uninfected mature osteoclasts for bone resorption [32–37]. Thus, our results combined with those of previous studies, suggest that *S. aureus* infection of osteoclast precursors has an indirect effect on bone resorption via the hijacking of differentiation and the secretion of proinflammatory cytokines.

We also showed that direct *S. aureus* infection of mature osteoclasts increases the fusion of osteoclasts and bone resorption capacity. It is well documented that in pathological situations

of bone loss, such as inflammatory arthritis or Paget disease, large, highly nucleated osteoclasts predominate in areas of excessive resorption. This phenomenon has led several teams to investigate the relationship between osteoclast size and resorptive activity [38–41]. They demonstrated that large osteoclasts resorbed significantly more efficiently than smaller cells, which suggested that large osteoclasts that were recovered after *S. aureus* infection were likely responsible for the enhanced bone resorption observed in vitro.

The direct and indirect effects of live *S. aureus* on osteoclasts add to the well-documented mechanisms responsible for bone loss after staphylococcal invasion of osteoblasts. Indeed, several studies have demonstrated that *S. aureus* not only decreases the viability of osteoblasts, but also inhibits osteogenic differentiation and reduces the capacity of osteoblasts for bone

mineralization. Interestingly, it has also been shown that infection of osteoblasts with inactivated *S. aureus* leads to an increase of pro-osteoclastic factors, such as RANK-L and prostaglandin E2 [11, 42]. This “ménage à trois” - between osteoblast, osteoclast, and *S. aureus* - during in vivo bone loss is not taken into account in our in vitro model, which could be considered a limitation of our data. In fact, no in vivo model is able to specifically determine the exclusive contribution of osteoblasts or osteoclasts to bone destruction. This is why we have chosen an in vitro model to explore the specific interaction of *S. aureus* on osteoclasts. Our original data revealed that *S. aureus* is capable of a direct specific enhancement of bone destruction mediated by osteoclasts independently of the osteoblast contribution. Nevertheless, other models deserve to be developed to determine the role of each bone cell type during bone remodeling in BJI. Different potential strategies could be proposed to clarify this question, such as a 3-dimensional tissue culture model that uses primary osteoblasts and osteoclasts [43], a laser capture microdissection of ex vivo tissue [44], and an in vivo BJI model that involves intravital microscopy [45].

In conclusion, our data help to refine the model of *S. aureus* bone loss, in which direct interaction between bacteria and osteoclasts must be taken into account. *S. aureus* infection induces (1) an indirect increase in the number of osteoclasts at the site of infection, owing to proinflammatory and pro-osteoclastogenic factors that are secreted by immune cells, and (2) the direct up-regulation of the bone resorbing capacity of infected mature osteoclasts. This study suggests that osteoclasts could be a main target to limit bone destruction during BJI.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris platform and AniRA platform, the PLATIM platform of SFR Biosciences, and particularly Claire Lionnet and Christophe Chamot, for their technical assistance; and Pierre Jurdic's team, especially I. Machuca-Gayet, D. Georgess, R. Dacquin, and C. Domenget, for helpful advice.

Financial support. This work was supported by the Fondation Innovation en Infectiologie, Lyon, France (grant AO6).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Lerner U. Osteoblasts, osteoclasts and osteocytes : unveiling their intimate-associated responses to applied orthodontic forces. *Sem Orthod* **2012**; 18:237–48.
- Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, et al. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect* **2008**; 82:40–8.
- Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *N Engl J Med* **1997**; 336:999–1007.
- Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clin Orthop Relat Res* **2008**; 466:1710–5.
- Yoshii T, Magara S, Miyai D, et al. Local levels of interleukin-1beta, -4, -6 and tumor necrosis factor alpha in an experimental model of murine osteomyelitis due to *staphylococcus aureus*. *Cytokine* **2002**; 19:59–65.
- Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol* **2010**; 300:193–204.
- Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, et al. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS One* **2013**; 8:e63176.
- Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis* **2010**; 202:1031–40.
- Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun* **2001**; 69:2872–7.
- Sinha B, Francois PP, Nusse O, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* **1999**; 1:101–17.
- Claro T, Widaa A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW. *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiology* **2013**; 159:147–54.
- Claro T, Widaa A, O'Seaghdha M, et al. *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS One* **2011**; 6:e18748.
- Tucker KA, Reilly SS, Leslie CS, Hudson MC. Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol Lett* **2000**; 186:151–6.
- Sanchez CJ Jr, Ward CL, Romano DR, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro. *BMC Musculoskelet Disord* **2013**; 14:187.
- Cassat JE, Hammer ND, Campbell JP, et al. A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe* **2013**; 13:759–72.
- Takayanagi H. New immune connections in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* **2010**; 1192:117–23.
- Takayanagi H. The unexpected link between osteoclasts and the immune system. *Adv Exp Med Biol* **2010**; 658:61–8.
- Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells. *Blood* **2010**; 116:210–7.
- Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, et al. Immature dendritic cell trans-differentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* **2004**; 104:4029–37.
- Wakkach A, Mansour A, Dacquin R, et al. Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* **2008**; 112:5074–83.
- Kim J, Yang J, Park OJ, et al. Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation. *J Bone Miner Res* **2013**; 28:2381–91.
- Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs* **2011**; 34:799–810.

23. Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y. Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J Immunol* **2002**; 169:1516–23.
24. Yang J, Ryu YH, Yun CH, Han SH. Impaired osteoclastogenesis by staphylococcal lipoteichoic acid through Toll-like receptor 2 with partial involvement of MyD88. *J Leukoc Biol* **2009**; 86:823–31.
25. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol* **1995**; 17:1143–52.
26. Dacquin R, Domenget C, Kumanogoh A, Kikutani H, Jurdic P, Machuca-Gayet I. Control of bone resorption by semaphorin 4D is dependent on ovarian function. *PLoS One* **2011**; 6:e26627.
27. Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, et al. A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods* **2011**; 86:145–9.
28. James DE, Nestor BJ, Sculco TP, et al. The relative timing of exposure to phagocytosable particulates and to osteoclastogenic cytokines is critically important in the determination of myeloid cell fate. *J Immunol* **2010**; 185:1265–73.
29. Nomura M, Yoshimura Y, Kikui T, et al. Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging of reactive oxygen species produced in RAW264.7 cells. *J Pharmacol Sci* **2011**; 117:243–52.
30. Heymann D, Guicheux J, Rousselle AV. Ultrastructural evidence in vitro of osteoclast-induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms. *Histol Histopathol* **2001**; 16:37–44.
31. Kikuta J, Ishii M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* **2013**; 52:226–34.
32. Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem* **2005**; 280:16163–9.
33. Kim MS, Magno CL, Day CJ, Morrison NA. Induction of chemokines and chemokine receptors CCR2b and CCR4 in authentic human osteoclasts differentiated with RANKL and osteoclast like cells differentiated by MCP-1 and RANTES. *J Cell Biochem* **2006**; 97:512–8.
34. Lu Y, Cai Z, Xiao G, et al. Monocyte chemotactic protein-1 mediates prostate cancer-induced bone resorption. *Cancer Res* **2007**; 67:3646–53.
35. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**; 383:373–7.
36. Scheven BA, Milne JS, Hunter I, Robins SP. Macrophage-inflammatory protein-1 α regulates preosteoclast differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**; 254:773–8.
37. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* **2004**; 19:2065–77.
38. Boissy P, Saltel F, Bouniol C, Jurdic P, Machuca-Gayet I. Transcriptional activity of nuclei in multinucleated osteoclasts and its modulation by calcitonin. *Endocrinology* **2002**; 143:1913–21.
39. Lees RL, Sabharwal VK, Heersche JN. Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. *Bone* **2001**; 28:187–94.
40. Piper K, Boyde A, Jones SJ. The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. *Anat Embryol (Berl)* **1992**; 186:291–9.
41. Trebec DP, Chandra D, Gramoun A, Li K, Heersche JN, Manolson MF. Increased expression of activating factors in large osteoclasts could explain their excessive activity in osteolytic diseases. *J Cell Biochem* **2007**; 101:205–20.
42. Somayaji SN, Ritchie S, Sahraei M, Marriott I, Hudson MC. *Staphylococcus aureus* induces expression of receptor activator of NF- κ B ligand and prostaglandin E2 in infected murine osteoblasts. *Infect Immun* **2008**; 76:5120–6.
43. Clarke MS, Sundaresan A, Vanderburg CR, Banigan MG, Pellis NR. A three-dimensional tissue culture model of bone formation utilizing rotational co-culture of human adult osteoblasts and osteoclasts. *Acta Biomater* **2013**; 9:7908–16.
44. Kasahara T, Imai S, Kojima H, et al. Malfunction of bone marrow-derived osteoclasts and the delay of bone fracture healing in diabetic mice. *Bone* **2010**; 47:617–25.
45. Kikuta J, Ishii M. Intravital multiphoton microscopy for dissecting cellular dynamics in arthritic inflammation and bone destruction. *Methods Mol Biol* **2014**; 1142:1–10.

Supplementary material and methods:

Reagents and chemicals

Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) and Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand (RANK-L) were provided by PAP (Protein Analysis and Production), which is an SFR Biosciences facility (Lyon, France). All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). Latex beads (2 and 0.5 μm) were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA).

TRAP staining

To enumerate the mature osteoclasts, cell cultures were fixed in PBS-10% formaldehyde for 10 min and then stained using a Leukocyte Acid Phosphatase-staining (TRAP) kit (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, USA) as recommended by the manufacturer. Only TRAP-positive, multinucleated (≥ 3 nuclei) cells were considered mature osteoclasts.

*Infection of osteoclasts by *S. aureus**

Before cell infection, the bacteria were grown overnight in brain heart infusion broth. Suspensions were standardized on the basis of optical density at 600 nm (OD₆₀₀) using a photometric regression formula established in preliminary experiments (data not shown): $\text{CFU/mL} = 5.25 * 10^6 \text{OD}_{600} - 3.107$ for *S. aureus*. Then, bacteria (stationary phase) were washed with α -MEM to remove exotoxins and soluble factors. Cells were washed twice with 1 ml of α -MEM before the addition of bacteria at a multiplicity of infection of approximately

10:1. Cell cultures were then incubated at 37°C to allow for the adhesion and internalization of bacteria. After 2h, cells were washed twice with 1 ml of α -MEM, and unbound bacteria were discarded. Cells were then incubated with 200 μ g/ml gentamicin for 1h to kill extracellular bacteria. One hundred microliters of each culture supernatant were plated onto tryptic soy agar plates (TSA, Oxoid, Dardilly, France) to confirm the absence of living extracellular bacteria. The cultures were further incubated for the indicated time in medium containing 40 mg/L gentamicin. These lower concentrations resulted in the killing of bacteria cells released upon host cell lysis, thus preventing these bacteria from infecting new host cells. To quantify internalized bacteria, suspension dilutions of cell lysates obtained after osmotic shock were plated in duplicate on TSA plates followed by an overnight incubation at 37°C.

Moreover, to test the impact of bacterial soluble factors on osteoclastogenesis, standardized suspensions were grown during 2 hours at 37°C in MCC to allow the multiplication of the bacteria and the secretion of soluble factors. Then, suspensions were filtered with 0.22 μ m pore-size membrane and one hundred microliters of each suspension were plated onto tryptic soy agar plates (TSA, Oxoid, Dardilly, France) to confirm the absence of living bacteria. Then, osteoclast precursors were cultured with this sterile suspension containing bacterial soluble factors during 2h as described above.

Impact of cytokines release on osteoclastogenesis

Bone marrow precursors, either infected or uninfected were grown with RANK-L and M-CSF. Supernatant was collected 4 days after infection and used as conditioned medium (at 25 or 50% concentration with complete culture medium (CCM)) for osteoclast precursor culturing.

After four days in the presence of conditioned medium, mature osteoclasts were enumerated. Three independent experiments were realized in triplicate. For each independent experiment, supernatants were collected from different infected wells or different uninfected wells, pooled, and filtered with 0.22 µm pore-size membrane. Per experiment, a single batch of supernatant was used as conditioned medium for osteoclast precursors culturing.

Measurement of cell viability

The effect of staphylococcal infection on cell viability was determined using the MTT-based cytotoxicity assay. Briefly, the cells were incubated with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Chemical Co) solution that was diluted (1/10) in αMEM medium for 1 h at 37°C. After removing the MTT-containing medium, the cells were dissolved in 100 µl isopropanol acid, and the absorbance at 450 nm was measured.

Cell staining, microscopy and quantification

For the adhesion assay, two hours after the infection of mature osteoclasts, extracellular *S. aureus* were stained using vancomycin-bodipy (0,4 µg/mL, 8 min, RT; Lifetechnologies, CA, USA). This fluorochrome binds to the cell wall peptidoglycan of Gram-positive bacteria and is not able to penetrate intact cells. Then, the cells were permeabilized and stained with

phalloidin that was coupled to Alexa 647 and Hoechst, as described above. For the internalization assay, after infection, the cells were incubated with lysostaphin (10 µg/mL, 20 min, RT) to kill and disrupt only the remaining extracellular bacteria. Then, the cells were permeabilized and stained using phalloidin and Hoescht, while intracellular *S. aureus* were labeled using vancomycin-Bodipy. For confocal microscopy, all images were acquired using a Leica TCS SP5 microscope (Nanterre, France).

To investigate the impact of *S. aureus* infection on osteoclast fusion, the cell surface area and nuclei per mature osteoclast were analyzed using immunofluorescence labeling. Briefly, the cells were fixed using 4% formaldehyde, permeabilized (0.1%Triton/10min-room temperature (RT)) and stained with phalloidin-Alexa 488 to visualize the actin filaments (1%-45min-RT) and Hoechst to label the nuclei (0.01%-10min-RT). The labeled cells were observed using a Leica DMI6000 microscope, and 442 pictures/well were taken. Using the MetaMorph® Software, the merged pictures were associated with 10% overlap between pictures to form a mosaic that represented 90% of each well. Then, the open source Fiji software was used to quantify nuclei per cell and determine the cell area measurements.

In addition to agar counting, adherent and internalized *S. aureus* were observed using confocal microscopy, as described elsewhere [213].

DISCUSSION – PERSPECTIVES

Nos travaux de recherche ont abordé l'étude des mécanismes bactériens impliqués dans la physiopathologie des IOA staphylococciques, en se focalisant sur les interactions hôtes-pathogènes. La revue bibliographique de cette thèse a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes - incluant la formation de biofilm, l'internalisation par les ostéoblastes, et l'évolution vers le phénotype SCV – qui semblent être des processus essentiels à comprendre pour améliorer la compréhension de ces pathologies. Sur cette base, après avoir abordé nos travaux sous un angle méthodologique, nous avons orienté nos recherches vers les principales problématiques rencontrées dans la prise en charge des IOA : i) la physiopathologie de la **genèse de l'IOA**, via le lien complexe entre portage et survenue d'infections invasives, abordée par l'étude des souches de *S. epidermidis* impliquées dans les IOA ; ii) **l'hétérogénéité des tableaux cliniques** observés chez les patients atteints d'IOA, étudiée sous l'angle des interactions entre HA-MRSA ou CA-MRSA et ostéoblastes et leurs corrélations avec les présentations cliniques habituellement rencontrées chez les patients infectés par ces souches, iii) le problème du **diagnostic**, et notamment de la reconnaissance initiale du caractère chronique de l'infection, avec la place potentielle de la détection de la delta-hémolysine comme marqueur de chronicité lié au réservoir intra-cellulaire et à la formation de biofilm, iv) la morbi-mortalité engendrée par la **destruction osseuse** sur le site de l'infection, abordée sous l'angle de l'interaction entre les ostéoclastes et *S. aureus*.

Les interactions entre l'équipe « Pathogénèse des infections à staphylocoques » (CIRI-INSERM U1111), l'équipe du Pr Pierre Jurdic (IGFL, ENS, Lyon), les services de maladies infectieuses, de chirurgie orthopédique, de microbiologie dans le cadre du CRIOAC des Hospices Civils de Lyon nous ont donné l'opportunité rare de corréler résultats bactériologiques fondamentaux et aspects cliniques.

1. Développement d'un nouveau modèle d'étude

Nous avons tout d'abord développé *de novo* dans notre laboratoire les techniques d'infection *in vitro* des ostéoblastes et des ostéoclastes par *S. aureus*. Puis, la mise au point d'une méthode d'étude par cytométrie en flux de l'adhésion et de l'invasion bactérienne a permis de combler un manque dans l'arsenal méthodologique disponible pour l'étude des interactions hôtes-pathogènes. Cette méthode a pu être utilisée avec succès au cours de différents projets de notre équipe. Comme le prouvent nos travaux réalisés sur les ostéoclastes, les ostéoblastes, *S. epidermidis* et *S. aureus*, cette méthode est applicable à l'étude de la capacité d'adhésion et d'invasion de diverses espèces (sous réserve qu'elles soient Gram-positives) dans divers types cellulaires.

Or, certaines limites de cette approche l'ont rendue incompatible avec une partie de nos travaux personnels. La première limite a trait au choix de la lysostaphine comme composé bactéricide utilisée pour la destruction des bactéries extracellulaires. L'utilisation de la cytométrie en flux pour comparer les pouvoirs invasifs de différents MRSA a été limitée par la sensibilité diminuée de certaines souches à ce composé. En conséquence, la destruction des bactéries adhérentes pouvait être incomplète, aboutissant à une fluorescence résiduelle à l'origine d'erreurs de mesure. Nous avons été amenés à conclure que l'emploi de la cytométrie en flux avec sélection à la lysostaphine devait être réservé à l'étude de souches non-MRSA.

La seconde limite de cette approche réside dans l'utilisation du fluorochrome qui n'est autre que de la vancomycine marquée venant s'intercaler dans la paroi des bactéries à Gram-positifs. Or, l'utilisation de certains composés comme les antibiotiques peut avoir un impact sur la paroi bactérienne. Ainsi, l'application d'antibiotiques à doses sub-inhibitrices, particulièrement les bêta-lactamines, induit des modifications morphologiques majeures chez *S. aureus* [214] qui introduit des distorsions entre le niveau de marquage fluorescent et la charge bactérienne réelle. Ces biais rendent impossibles l'utilisation de la technique développée dans ce cas précis.

2. Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus epidermidis*

Le premier résultat apporté par notre étude est l'impossibilité de différencier les deux groupes de souches de *S. epidermidis* « commensales » ou « invasives » sur la base des capacités d'internalisation des ostéoblastes et de formation de biofilm entre. Ces données renforcent l'hypothèse retenues par certains auteurs selon laquelle l'infection à *S. epidermidis* constituerait un événement purement « accidentel » survenant à partir de la flore commensale, les souches de portage et invasives constituant une seule et même entité microbiologique [3].

Nos travaux ont aussi mis en évidence que l'internalisation bactérienne dans les cellules osseuses, mécanisme physiopathologique majeur mis en jeu par *S. aureus*, avait probablement un rôle beaucoup plus restreint dans la physiopathologie des infections à *S. epidermidis*. Bien que ce dernier possède plusieurs adhésines de surface, très peu de données disponibles permettent de comprendre les mécanismes impliqués chez *S. epidermidis* dans l'internalisation au sein des cellules eucaryotes. La plupart des adhésines (MSCRAMMs) chez *S. epidermidis* se lient aux protéines de la matrice extracellulaire par leur motif C-terminal présentant un motif LPXTG. Toutefois, certaines adhésines ne présentant pas de motif LPXTG, comme l'Ebp (elastin-binding protein) et l'Embp (extracellular matrix binding protein) sont impliquées dans des liaisons avec des molécules présentes dans la

matrice extracellulaire comme la vitronectine, le fibrinogène et la fibronectine. Ces données rapportant une liaison entre une adhésine staphylococcique et la fibronectine suggèrent que le mécanisme permettant l'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes, impliquant la liaison d'une MSCRAMM à la fibronectine, serait mis en jeu dans l'internalisation de *S. epidermidis* dans ces cellules [7]. Néanmoins, cette hypothèse ne semble pas être retenue sur la base des travaux menés par Khalil *et al*, démontrant que le mécanisme d'internalisation de *S. epidermidis* dans les ostéoblastes n'impliquerait ni la fibronectine, ni l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ [125]. Bien que nos résultats montrent que la proportion de staphylocoques internalisés reste faible, d'autres modèles ont apporté une conclusion inverse en utilisant divers types de cellules hôtes non phagocytaires telles que les cellules épithéliales mammaires bovines, les cellules urothéliales, ou encore les cellules endothéliales [112, 116, 215, 216]. L'ensemble de ces données suggèrent l'implication de mécanismes spécifiques à chaque type de souches et à chaque cellule cible testée. Il serait ainsi intéressant d'évaluer les capacités d'interaction de notre collection de souches issues d'IOA dans un autre modèle d'infection cellulaire, comme celui de la mastite bovine par exemple, et inversement de tester les souches invasives isolées de mastites bovines dans notre modèle d'infection d'ostéoblastes. Ce type d'expériences permettrait i) de déterminer si ces spécificités d'interaction proviennent du versant bactérien ou cellulaire, et ii) d'explorer les mécanismes impliqués dans l'invasion cellulaire par *S. epidermidis*, qui restent jusque-là inconnus. Une piste a très récemment été apportée par Hirschhausen *et al* : l'invasion cellulaire de *S. epidermidis* pourrait être médiée par l'interaction d'une adhésine de la famille des autolysines, AtlE avec une protéine cellulaire HsC70 [116]. Le rôle de cette interaction pourrait être confirmé par l'approche proposée (croisement type de bactérie – type de cellules) complétée par l'utilisation de bactéries isogéniques pour AtlE.

Il n'est toutefois pas surprenant que les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les IOA à *S. epidermidis* et à *S. aureus* ne soient pas identiques et superposables, et/ou ne soient pas de la même importance. Les tableaux cliniques présentés par les patients sont généralement bien différents selon qu'ils soient infectés par *S. epidermidis* ou par *S. aureus*. Lankinen *et al* viennent de rapporter les résultats d'une étude utilisant un modèle d'infections osseuses *in vivo* chez le lapin, qui montrent que les infections osseuses dues à *S. epidermidis* sont moins sévères et bruyantes que celles provoquées par *S. aureus* [217].

3. Le caractère hypervirulent des MRSA associé à l'action intracellulaire des PSM

Les souches de CA-MRSA sont qualifiées de souches hypervirulentes en raison de la gravité et la sévérité des infections qu'elles provoquent. L'ensemble des souches de CA-MRSA possède la toxine PVL. Comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique, cette

toxine induit la mort très rapide de plusieurs types de cellules immunitaires en formant des pores à la surface de la membrane plasmique des cellules. Cette action est récepteur-dépendant ; ce dernier, le C5aR, a récemment été identifié. Après fixation membranaire de la PVL sur le récepteur du C5a créant un pore à la surface des cellules cibles, ces dernières libèrent massivement des molécules réactives de l'oxygène et des composés chimiotactiques qui provoquent une exacerbation de la réponse inflammatoire locale. Le phénomène est auto-entretenu notamment par l'effet chimiotactique induit qui augmente le recrutement de polynucléaires neutrophiles et de macrophages périphériques, cellules cibles de la PVL, sur le site de l'infection. La PVL, n'ayant aucun effet sur les cellules non-immunitaires, il n'est pas envisageable que cette toxine soit responsable de la nécrose tissulaire observée lors d'infections invasives à CA-MRSA. L'hypothèse qui a été proposée est celle d'une action indirecte de la PVL via le recrutement puis la lyse des polynucléaires neutrophiles et des monocytes-macrophages au site de l'infection libérant le contenu intracellulaire et causant la destruction des tissus environnants.

Dans ce schéma, le caractère hypervirulent des CA-MRSA résiderait dans la seule action extracellulaire de ces facteurs de virulence, notamment la PVL. Or, au cours des IOA, le passage intracellulaire des staphylocoques est un paramètre important de la physiopathologie de ces infections. Nos résultats sur l'invasion des ostéoblastes par les MRSA ont mis en lumière un nouveau trait de virulence des CA-MRSA dans le compartiment intracellulaire, au sein duquel la PVL n'a aucun rôle. Nos résultats obtenus sur la cytotoxicité des cellules osseuses avec les différentes populations des souches CA- et HA-MRSA ainsi qu'avec les couples de souches isogéniques permettent d'ébaucher un nouveau modèle physiopathologique de l'IOA à CA-MRSA : dans ce modèle candidat, la destruction osseuse résulte non seulement de l'action tissulaire indirecte de la PVL, via le recrutement et la lyse des polynucléaires neutrophiles et des macrophages au site de l'infection, mais également de l'action directe cytolytique intracellulaire des PSM sur les ostéoblastes infectés.

Bien que le rôle clé des PSM α ne soit plus à démontrer dans la pathogénicité de *S. aureus* [147, 218], les mécanismes de cytolyse de ces petits peptides restaient peu clairs. Quelques études ont démontré que les PSM avaient une action cytolytique dans certains compartiments extracellulaires comme les abcès. Toutefois, parallèlement, il a été démontré que l'action des PSM est inhibée par les lipoprotéines contenues dans le sérum. Ceci conduit à rejeter une action extracellulaire cytolytique [149]. Les chercheurs se sont donc mis sur la piste d'un mécanisme de cytotoxicité dans le compartiment intracellulaire. Nos résultats démontrent clairement le rôle cytotoxique intracellulaire de cette nouvelle famille de toxines. Nos conclusions ont été confirmées par une autre équipe très récemment démontrant, dans d'autres modèles, la cytolyse des neutrophiles par des PSM α après phagocytose de *S. aureus* [150].

La régulation de l'expression des PSM a fait l'objet d'études intensives ces dernières années. Il est bien documenté que l'expression des PSM est sous le contrôle d'*agr* [182]. Ce système

de régulation fonctionne comme un système de quorum-sensing, l'activation d'*agr* est dépendante de la concentration en peptide auto-inducteur témoin direct de la concentration et de la prolifération bactérienne. Dans le cas d'une internalisation de *S. aureus* par une cellule eucaryote, ce n'est pas l'augmentation de la concentration bactérienne qui aboutit à l'accumulation de peptide auto-inducteur nécessaire à l'activation d'*agr*, mais le caractère confiné de la vacuole d'endocytose. Ces données suggèrent qu'*agr*, dans un contexte d'infection intracellulaire, se comporterait donc comme un senseur capable de détecter le confinement et, de déclencher la production d'exotoxines [219], parmi lesquelles les PSM nécessaires à l'échappement phagosomal. Néanmoins, Geiger *et al* ont récemment démontré que l'origine de l'activation de la synthèse des PSM dans le compartiment intracellulaire serait « la réponse stringente » [151], mécanisme commun à de nombreuses espèces bactériennes induit par la carence nutritionnelle. Cette réponse stringente est initiée par la synthèse rapide d'alarmones (p)ppGpp à l'origine de changements physiologiques et métaboliques radicaux parmi lesquels : i) une inhibition de la synthèse des ARN stables (rRNA, tRNA) et des ribosomes, un arrêt de la réplication et de la division bactérienne, un arrêt de la synthèse des lipides et des phospholipides et ii) à l'opposé, une activation de la biosynthèse des acides aminés et des gènes de défense. Les résultats obtenus par Geiger *et al*, dans un modèle d'infection de neutrophiles, suggèrent que l'expression intracellulaire des PSM est dépendante de l'activation de la RSH synthase, enzyme nécessaire à la synthèse des (p)ppGpp. Ainsi la réponse stringente semble participer à la sécrétion des PSM et à la survie de la bactérie après sa phagocytose [151]. A la lumière de l'ensemble de ces données, il semble capital à l'avenir d'explorer davantage les voies impliquées dans la régulation de l'expression de ces PSM, notamment au niveau intracellulaire, en utilisant des modèles d'infection de cellules phagocytaires ou non.

Ce questionnement sur la régulation de l'expression de ces facteurs de virulence prend tout son sens lorsqu'il est mis en face de nos résultats montrant des différences majeures de capacité de survie et de cytotoxicité entre les MRSA d'origine hospitaliers et communautaires. La régulation de l'expression des PSM détermine la synthèse, la concentration et le type de PSM sécrétés. L'hypothèse d'une corrélation entre la cytotoxicité/survie intracellulaire et la concentration ou le type de PSM sécrété par les souches est débattue. Deux pistes nous amènent à penser que cette corrélation existe :

i) La première s'appuie sur des données concernant la production de PSM par *S. epidermidis*. Ce pathogène provoque des infections moins sévères et aiguës que celles causées par *S. aureus*. Or, *S. epidermidis* sécrètent des quantités faibles de PSM ayant une action cytolytique. Inversement, les PSM ne possédant pas d'action cytolytique comme les PSM β sont sécrétés abondamment par *S. epidermidis* contrairement à ce qui est observé chez *S. aureus* [220]. Ces quantifications d'expression de PSM ont été réalisées chez plus de 30 souches de *S. aureus* appartenant à des fonds génétiques différents et plus de 300 souches de *S. epidermidis* aboutissant toujours à la conclusion que les PSM cytolytiques sont sécrétés davantage par *S. aureus* que par *S. epidermidis*. Ceci reflète probablement

l'adaptation des activités biologiques des PSM avec le mode de vie de ces deux espèces de staphylocoques, *S. epidermidis* étant un très bon représentant des bactéries commensales et *S. aureus* un bon exemple de pathogène responsable d'infections invasives. Il serait intéressant de savoir si, par rapport aux CA-MRSA responsables d'une cytotoxicité accrue et d'IOA aiguës, les HA-MRSA, adaptés à une vie intracellulaire et responsables d'IOA chroniques et indolentes sécrètent davantage de PSM non cytolytique à l'instar de *S. epidermidis*.

ii) La seconde piste s'appuie sur des données très récentes de Cheung *et al.* Ces auteurs ont montré pour la première fois qu'un variant allélique d'un type de PSM, appelé PSM α 3N22Y est associé à des tableaux cliniques particuliers [221]. En effet, les MRSA appartenant au complexe clonal 30, habituellement responsables de septicémies avec complications hématogènes, présentent une unique mutation non synonyme dans le gène codant pour le PSM α 3. Ces souches, exprimant le PSM α 3N22Y, sont moins cytotoxiques, possèdent une activité chémo-attractante plus faible et ont un pouvoir de dissémination par voie hématogène plus important que les souches exprimant le PSM α 3 sauvage. En exprimant ce PSM muté, les souches de staphylocoques appartenant au clone CC30 échappent au système immunitaire du fait d'une moindre reconnaissance de ce PSM « atténué » par les cellules immunitaires [221]. Sur la base de ces données, il serait pertinent d'élargir ces observations sur une large collection de souche cliniques en réalisant des associations entre le type de PSM sécrété et le type d'infections.

4. Détection de la delta-toxine : un nouveau marqueur diagnostique de la chronicité des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*

Ce travail mené avec une collection de souches cliniques de MSSA complète le travail décrit précédemment sur les MRSA. Grâce à cette collection de souches cliniques de MSSA, nous avons, une fois encore, associé la présentation clinique des infections causées par ces souches avec la persistance intracellulaire des staphylocoques. De plus, très récemment, Kalinka *et al* ont réalisé un travail complémentaire au nôtre en utilisant des souches de *S. aureus* issues d'ostéomyélites chroniques et aiguës [222]. Les résultats décrits par cette équipe suggèrent que, par rapport aux souches issues d'infections aiguës, les souches issues d'infections chroniques i) ont un pouvoir d'adhésion à la matrice osseuse identique, ii) sont moins cytotoxiques, iii) s'adaptent plus facilement à la vie intracellulaire en formant davantage de SCV et en persistant davantage, iv) produisent autant de biofilm. Associés à ceux menés par Kalinka *et al*, nos travaux confirment indiscutablement l'hypothèse selon laquelle la vie intracellulaire des staphylocoques est un mécanisme physiopathologique

essentiel à la chronicisation des infections osseuses. Pour certains auteurs, ce passage intracellulaire, que l'on retrouve dans d'autres pathologies évoluant sur un mode chronique, pourraient expliquer, au moins en partie, l'échec des essais de développement de vaccins anti-staphylococciques basés sur une meilleure réponse humorale reconnaissant des protéines exprimées par les staphylocoques extracellulaires [223].

En plus de l'association chronicité-persistence intracellulaire, nos travaux suggèrent que l'utilisation d'un algorithme basé sur l'absence d'expression de la delta-hémolysine, reflet d'une perte d'expression d'*agr*, pourrait être un marqueur de chronicité permettant d'orienter la prise en charge initiale du patient atteints d'IOA. En effet, nos résultats suggèrent que l'absence de détection de la delta-hémolysine, qui n'est autre qu'un PSM, permettrait d'affirmer le caractère chronique ou la transition vers la chronicité. Dans ce cas, cela poserait donc l'indication de retrait du matériel, prise en charge préconisée en cas d'infection chronique. Cette piste repose essentiellement sur l'association entre la présence ou non de la delta-hémolysine chez les souches de *S. aureus* et trois critères témoins de la chronicité des IOA que sont : i) le délai d'évolution des infections osseuses, ii) la capacité d'internalisation dans les ostéoblastes et iii) la formation de biofilm. Toutefois, ces hypothèses étant basées sur notre seule étude rétrospective observationnelle, incluant des patients assez hétérogènes, un travail prospectif est actuellement en cours incluant des patients atteints d'une infection sur matériel mono-microbienne à *S. aureus* bénéficiant d'un traitement conservateur, et évaluant leur devenir en fonction du statut *agr* de la souche isolée (Etude Delta-Os).

Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que d'autres facteurs (bactériens ou cellulaires) puissent également avoir un rôle essentiel dans le passage à la chronicité des IOA. Par exemple, plusieurs travaux suggèrent que l'expression d'une protéase l'auréolysine serait associée à la chronicisation des infections osseuses [100, 222].

Enfin, pour compléter cette étude, nous conduisons depuis quelques mois un travail complémentaire afin d'approfondir les connaissances sur le processus de chronicisation des IOA. Tous les travaux, dont les nôtres, actuellement disponibles dans la littérature sont basées sur des comparaisons de souches responsables d'IOA aiguës à d'autres souches impliquées dans des infections chroniques mais toujours chez des patients différents. Aucune étude n'a actuellement pu comparer la souche isolée lors de l'infection aiguë à celle isolée lors de la récurrence (phase chronique) chez un même patient. Ainsi, il n'existe actuellement que peu ou pas de données permettant de savoir si les facteurs et les phénotype de persistance de la bactérie sont présents dès la primo-infection ou s'ils apparaissent secondairement sous les pressions de sélection que constituent le microenvironnement, le système immunitaire de l'hôte et les antibiotiques,. De même, la part respective de chaque mécanisme impliqué dans le processus de persistance de l'infection n'est pas actuellement connue avec précision. Le travail que nous avons initié,

consiste à comparer des souches de *S. aureus* isolées lors de l'épisode initiale de l'IOA et lors de la récurrence chez le même patient sur la base de ces mécanismes : capacité de formation de biofilm, capacité d'adhésion, d'internalisation et de persistance dans les ostéoblastes, cytotoxicité, réponse inflammatoire induite *in vivo*, expression et régulation des facteurs de virulence. Les premiers résultats révèlent une adaptation *in vivo* de la bactérie, en abaissant son niveau de virulence permettant ainsi une meilleure persistance intracellulaire.

5. L'interaction ostéoclastes-*S. aureus*

Nos travaux ont permis de répondre à d'importantes interrogations sur les mécanismes physiopathologiques aboutissant aux lésions osseuses observées chez les patients atteints d'IOA. Très peu de données étaient disponibles concernant la genèse de cette destruction de la matrice osseuse lors d'IOA à *S. aureus*, responsable de séquelles fonctionnelles très importantes et pouvant induire un descellement de prothèses lorsqu'il s'agit d'infections sur matériel.

Nos travaux ont permis de mettre en lumière le rôle potentiel des ostéoclastes dans ces phénomènes de lyse osseuse jusqu'alors très peu étudiés. De plus, les rares résultats obtenus par les équipes ayant travaillé sur les interactions entre les ostéoclastes et les staphylocoques étaient contradictoires. Ainsi, Kim *et al* suggèrent que les lipopeptides staphylococciques induisent l'ostéoclastogénèse alors que Yang *et al* concluent à une inhibition de l'ostéoclastogénèse par l'acide lipoteichoïque présent chez les staphylocoques [106, 107]. Ces discordances démontrent que l'effet des staphylocoques sur une cellule eucaryote ne peut pas se réduire à l'étude de telle ou telle protéine staphylococcique isolée ou à l'utilisation de staphylocoques tués. A partir de ces observations, nous avons donc développé des modèles d'infection d'ostéoclastes primaires utilisant, pour la première fois, des staphylocoques vivants permettant de prendre ainsi en compte l'impact du sécrétome bactérien dans sa globalité.

Nos résultats ont permis de démontrer que les staphylocoques modifient la capacité de résorption osseuse par deux mécanismes complémentaires, en impactant i) l'ostéoclastogénèse et ii) l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes matures. Ces deux mécanismes aboutissent à une destruction de la matrice osseuse, phénomène classiquement observé lors d'IOA. Cette action sur la lignée ostéoclastique s'ajoute à celle déjà bien documentée sur l'action des staphylocoques sur les ostéoblastes.

Ces bactéries ont non seulement une activité cytotoxique sur une partie des ostéoblastes, mais diminuent aussi la différenciation ostéogénique et réduisent la capacité de minéralisation des ostéoblastes [80, 101, 224]. La combinaison de l'ensemble de ces données suggère que les staphylocoques perturbent l'équilibre nécessaire à un remodelage osseux harmonieux et adéquat, en diminuant l'activité ostéoblastique tout en augmentant l'activité ostéoclastique. Toutefois ces hypothèses sont émises grâce à des résultats obtenus dans des modèles d'infections *in vitro* uniquement. Bien que la réalisation de ces modèles

soit le seul moyen d'observer l'impact des bactéries sur les ostéoclastes sans l'action des ostéoblastes, ces modèles ne prennent pas à compte la complexité cellulaire du tissu osseux. Afin de déterminer la contribution de chaque type cellulaire dans le remodelage osseux lors d'IOA, il serait intéressant de réaliser des expériences complémentaires i) utilisant des modèles de co-culture, notamment des cultures de tissu en 3 dimensions avec des ostéoblastes et des ostéoclastes primaires [225], ii) en réalisant des microdissections à l'aide de laser à partir d'explants *ex vivo* [226], et iii) en réalisant de la microscopie intravitale afin d'observer le comportement de chaque type cellulaire chez des animaux atteints d'IOA [227].

Nos résultats aussi soulèvent des questions complémentaires concernant les mécanismes d'internalisation des bactéries dans les ostéoclastes. En utilisant un couple de souches isogéniques pour la protéine FnBP, nous avons pu montrer que les staphylocoques sont internalisés par les précurseurs et les ostéoclastes matures indépendamment de la présence de FnBP. Or, comme nous l'avons évoqué dans la revue bibliographique, cette protéine FnBP, via son interaction avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, joue un rôle clef dans l'endocytose des staphylocoques par les ostéoblastes. Ces éléments suggèrent donc que le mécanisme d'internalisation bactérienne est différent chez les ostéoblastes et chez les ostéoclastes. Compte tenu de la capacité de phagocytose que possèdent les ostéoclastes [228], nous émettons l'hypothèse que ce mécanisme de phagocytose puisse intervenir dans l'internalisation de *S. aureus*. Des expériences complémentaires mettant en jeu des inhibiteurs de phagocytose pourraient être envisagés pour répondre définitivement à cette question.

La revue bibliographique de cette thèse a mis en avant le rôle primordial de l'arsenal toxinique, dans la pathogénie de *S. aureus*. De plus, les résultats apportés par nos travaux sur l'impact des MRSA et des MSSA sur les ostéoblastes, montrent que l'action des staphylocoques sur les cellules eucaryotes peut être très différente d'une souche à une autre, selon leur équipement toxinique. Le rôle de ces facteurs de virulence n'a pas été étudié spécifiquement dans notre travail portant sur les ostéoclastes et aucune donnée n'est disponible dans la littérature. Cette question reste donc entière. C'est pourquoi nous souhaitons étudier l'impact sur les ostéoclastes et leurs capacités de résorption, de ces différentes souches de staphylocoques dont l'arsenal des facteurs de virulence est parfaitement caractérisé. En parallèle, un autre aspect de cette question, que nous avons abordé ces derniers mois, est l'étude de l'impact direct de toxines recombinantes sur les ostéoclastes humains. Nos premiers résultats indiquent que les ostéoclastes sont sensibles à l'action cytolytique des « pore-forming » toxines, notamment la PVL dont les cibles cellulaires étaient jusque-là limitées aux polynucléaires et aux macrophages. Par ailleurs, il semble que les toxines superantigéniques aient, elles, un effet inducteur sur l'activité de résorption des ostéoclastes matures. Ces données indiquent que des protéines sécrétées par les staphylocoques peuvent présenter une action sur les ostéoclastes. L'ensemble de ces résultats pourrait au moins pour une part expliquer les zones de lyse osseuse observée

localement ou à distance du foyer infectieux au cours des IOA à *S. aureus*. Un article est en cours de préparation.

Enfin, les travaux présentés dans le cadre de cette thèse et plus généralement ceux réalisés au sein de notre équipe et décrits dans la littérature, ont montré qu'une déminéralisation et une résorption osseuse étaient induites au cours des IOA. Les bactéries responsables d'IOA sont ainsi à l'origine de remaniements majeurs du tissu osseux avec formation de plages d'ostéolyse. Ces remaniements sont susceptibles de libérer localement et/ou de façon systémique des biomarqueurs de la résorption osseuse, détectables et quantifiables dans différents fluides biologiques (liquide articulaire, sang, urine, etc.). L'intérêt du dosage de ces biomarqueurs n'est plus à démontrer dans le suivi de traitement de certaines pathologies osseuses comme l'ostéoporose, ou encore la maladie de Paget. En réalisant des dosages de marqueurs de résorption que sont la lysylpyridinoline (LP) et l'hydroxylsylpyridinoline (HP) dans l'urine de patients atteints d'ostéomyélites mandibulaires [229], Springer *et al* ont obtenu des résultats très encourageants attestant que ces marqueurs sont de très bons témoins de l'évolution des infections. Dans ce contexte, nous avons initié un nouveau projet, intitulé BioMIOs, qui a pour objectif le développement de nouveaux outils diagnostiques et pronostiques, basés sur le dosage des biomarqueurs du remodelage osseux, afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'IOA sur matériel. Ce projet, pour lequel nous avons obtenu l'accord du CPP (Comite de Protection des Personnes) bénéficie des expertises complémentaires et synergiques dans le domaine des IOA et du remodelage osseux de 3 partenaires :

- expertise clinique, microbiologique et statistique au sein de l'Inserm U1111-Centre International de Recherche en Infectiologie et des Hospices Civils de Lyon notamment au sein des services de bactériologie, maladies infectieuses et tropicales, chirurgie orthopédique, du CNR des staphylocoques et du centre inter-régional de référence pour la prise en charges des IOA complexes (CRIOAc)
- expertise technique apportée par la société Synarc Laboratory, entreprise leader dans le développement, la validation, le dosage de biomarqueurs osseux.

Grâce à la mobilisation de ces acteurs académiques, cliniques et industriels, un suivi prospectif d'une large cohorte de patients présentant une suspicion d'IOA sur matériel est mis en place et les dosages de différents biomarqueurs dans différents liquides biologiques (sang, urine, liquide articulaire) seront réalisés chez les patients. Nous tenterons de corrélérer les paramètres cliniques avec les résultats obtenus pour chacun de ces biomarqueurs ainsi que pour des combinaisons de biomarqueurs. Notre hypothèse est qu'à l'image du traitement de certaines maladies osseuses comme l'ostéoporose, des biomarqueurs du remodelage osseux pourraient avoir une valeur diagnostique en cas d'IOA, une valeur pronostique de l'évolution des patients atteints d'IOA et une valeur prédictive précoce d'échec/succès thérapeutique des antibiothérapies mises en place. L'objectif global du développement de tels biomarqueurs est d'améliorer la prise en charge des patients présentant une IOA.

**ANNEXE I: Antimicrobial activity
against intra-osteoblastic
Staphylococcus aureus: a new
therapeutic concept for bone and joint
infection?**

1 **Antimicrobial activity against intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus*: a**
2 **new therapeutic concept for bone and joint infection?**

3
4 Florent Valour^{1,2*}, Sophie Trouillet-Assant², Natacha Riffard², Jason Tasse², Sacha
5 Flammier², Jean-Philippe Rasigade^{2,3}, Christian Chidiac^{1,2}, François Vandenesch^{2,3,4}, Tristan
6 Ferry^{1,2}, and Frédéric Laurent^{2,3,4}, on behalf of the Lyon BJI study group

7
8 ¹Infectious diseases department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ²INSERM U1111,
9 International Centre for Research in Infectiology, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon,
10 France; ³Laboratory of Bacteriology, Hospices Civils de Lyon, France; ⁴French National
11 Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

12
13 ***Corresponding author:** Florent Valour; Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier
14 Nord, Laboratoire de bactériologie; 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon –
15 France; Phone: 00.33.4.72.07.18.37; Fax: 00.33.4.72.07.18.42; Email adress:
16 florent.valour@chu-lyon.fr

17
18 **Running title:** Antibiotic activity against intra-osteoblastic *S. aureus*

19
20 **Keywords:** *Staphylococcus aureus*; Bone and joint infection; Antimicrobial intracellular
21 activity.

23 **Synopsis**

24

25 **Objectives:** Although *S. aureus* persistence in osteoblasts, partly as small-colony variants
26 (SCVs), can contribute to bone and joint infection (BJI) relapses, the intracellular activity of
27 antimicrobials is not currently considered in the choice of treatment strategies for BJI. Here,
28 antistaphylococcal antimicrobials are evaluated for their intra-osteoblastic activity and their
29 impact on the intracellular emergence of SCVs in an *ex vivo* osteoblast infection model.

30 **Methods:** Osteoblastic MG63 cells were infected for 2 h with HG001 *S. aureus*. After killing
31 the remaining extracellular bacteria with lysostaphin, infected cells were incubated for 24 h
32 with antimicrobials at the intraosseous concentrations reached with standard therapeutic
33 doses. Intracellular bacteria and SCVs were then quantified by plating cell lysates.

34 **Results:** A bactericidal effect was observed with fosfomycin, linezolid, tigecycline, oxacillin,
35 rifampin, ofloxacin, and clindamycin, with a reduction in intracellular inoculum of -2.5, -3.1,
36 -3.9, -4.2, -4.9, -4.9, and -5.2 log₁₀ CFU/100,000 cells, respectively ($p < 10^{-4}$). Conversely, a
37 bacteriostatic effect was observed with ceftaroline and teicoplanin, whereas vancomycin and
38 daptomycin had no significant impact on intracellular bacterial growth. Ofloxacin,
39 daptomycin, and vancomycin significantly limited intracellular SCV emergence. Overall,
40 ofloxacin was the only molecule to combine an excellent intracellular activity while limiting
41 the emergence of SCVs.

42 **Conclusions:** These data provide a basis for refining the choice of antibiotics to prioritise in
43 the management of BJI, justifying the combination of a fluoroquinolone for its intracellular
44 activity with an anti-biofilm molecule, such as rifampin.

45

46 Introduction

47

48 *Staphylococcus aureus* represents the leading cause of bone and joint infection (BJI).^{1,2} This
49 particular tropism and its ability to cause difficult-to-treat infections lie in the wide panel of
50 staphylococcal virulence factors, which allow host colonisation, tissue invasion, and host
51 immune system subversion.^{3,4} With regard to BJI, three phenotypic mechanisms provide a
52 bacterial reservoir responsible for staphylococcal BJI chronicity and relapses. First, by
53 promoting immune system and antimicrobial action evasions, biofilm formation has been
54 associated with persistent BJIs, emphasising the need of infected tissue removal, especially in
55 cases of orthopaedic device-associated infections (ODIs).⁵⁻⁷ Second, implications of the
56 ability of staphylococci to invade and persist within bone cells, and especially osteoblasts, in
57 BJI chronicity has been suggested for years by numerous studies evaluating this mechanism
58 using a few laboratory strains.⁸⁻¹⁰ We have recently demonstrated this hypothesis among a
59 large collection of clinical BJI isolates of methicillin-susceptible (MS) and -resistant (MR)
60 *S. aureus*.^{11,12} Finally, bacterial phenotype switching to small-colony variants (SCVs) has
61 been associated with BJI persistence and is enhanced under adverse/stressful growing
62 conditions, such as those for bacteria embedded in biofilms, internalised within host cells,
63 and/or in the presence of antibiotics.¹³⁻¹⁵

64 To date, the choice of antimicrobial therapy for *S. aureus* BJI is mainly based on the *in vitro*
65 antibacterial activity and bone diffusion of antimicrobials.^{1,2,16} Recently, certain
66 pathophysiological mechanisms of BJI have also been taken into consideration. For instance,
67 the use of rifampin is recommended in ODI due to its activity into staphylococcal biofilm.^{16,17}
68 Although *S. aureus* can be internalised into human osteoblasts and persist in bone cells partly
69 as SCVs, which can lead to an intracellular bacterial reservoir responsible for BJI chronicity
70 and relapse, the intracellular activity of antimicrobials is not currently considered in the

71 treatment strategies of BJI. Therefore, we aimed to evaluate the intra-osteoblastic activity of
72 the main antimicrobials used for staphylococcal BJI in an *in vitro* model of osteoblast
73 infection and to assess their impact on the emergence of intracellular SCVs.

74

75 **Materials and methods**

76

77 ***Bacterial strain***

78 The methicillin-susceptible *S. aureus* HG001 strain was used for all the experiments. The
79 minimal inhibitory concentrations (MICs) of the antimicrobials tested in the cellular model
80 were determined by the Etest method using Mueller-Hinton agar according to the
81 manufacturer's instructions (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and the recommendations of
82 the French Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (CA-SFM).

83

84 ***MG63 osteoblastic cell culture***

85 All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). The human
86 osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427),¹⁸ purchased from LGC standard (USA), was
87 routinely cultured in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in a growth
88 medium (CGM) consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented
89 with 10% foetal calf serum, 25 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine +/- 100 U/mL penicillin
90 and 100 µg/mL streptomycin (CGM with antibiotic). The cells were passaged once a week
91 and used up to passage 20 after thawing. Prior to assays, osteoblasts were seeded at 40,000
92 cells per well into 48-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 500 µL
93 of growth medium with antibiotics and cultured for 24 h until 70 to 80% confluence.

94

95 ***Bacterial suspension standardisation and osteoblast infection***

96 Prior to the assays, the *S. aureus* HG001 strain was subcultivated on Columbia agar
97 supplemented with 5% sheep blood (COS, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37°C for 24
98 h. Three colonies were then used to inoculate 5 mL of brain-heart infusion (BHI; AES, Bruz,
99 France) incubated overnight at 37°C. The suspensions were washed and resuspended in CGM
100 at a concentration corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of 100 using a
101 previously established clone-specific regression formula correlating the bacterial density
102 (CFU/mL) with the optical density at 600 nm (OD₆₀₀): $CFU/mL = 7.10^8 \times OD_{600} - 3.10^7$ (data
103 not shown). Normalised bacterial suspensions were then sonicated for 10 min at 100%
104 (Bactsonic, LaboModern, Paris, France) to minimise clumping and added to the bone cell
105 culture wells. After incubation for 30 min at 4°C to allow sedimentation of the bacteria while
106 blocking internalisation, all the cultures were simultaneously transferred to 37°C to
107 synchronise the beginning of the internalisation step. After 2 h, the cell cultures were washed
108 twice with 500 µL of DMEM and incubated for 1 h with growth medium supplemented with
109 10 µg/mL lysostaphin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to kill the remaining
110 extracellular staphylococcal cells.

111

112 ***Antimicrobial intracellular activity and impact on intracellular SCV selection***

113 After killing the extracellular bacteria with lysostaphin, the infected cells were washed twice
114 with DMEM and incubated for 24 h with growth medium containing the tested antimicrobials
115 at three concentrations. “Bone concentration” (C_{bone}) corresponded to the intraosseous
116 concentrations reached in humans when using standard therapeutic dosages and was
117 determined after a pharmacologic literature review.^{19,20} These molecules were also used at
118 minimal ($C_{min} = C_{bone} / 3$) and maximal ($C_{max} = C_{bone} \times 3$) concentrations to assess the
119 existence of potential dose effects (Table 1). For each condition, lysostaphin at 10 µg/mL was

120 also added to the growth medium to kill the bacteria released upon host cell lysis, thus
121 preventing these bacteria from reinfecting new host cells.

122 After 24 h of incubation, the osteoblasts were washed twice with DMEM and subsequently
123 lysed by a 10-minute incubation with sterile water. Cell lysates were sonicated to minimise
124 clumping, and dilutions of these lysates were spiral-plated in duplicate on COS using a WASP
125 automated plater (AES Chemunex, Bruz, France). After overnight incubation at 37°C, the
126 plates were photographed, and the colonies were counted using automated computer image
127 analysis software (ImageJ. Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda,
128 Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012). SCVs, defined as colonies with an area
129 smaller than 5-fold less than the median area measured for all colonies on each plate, were
130 enumerated.

131 Of note, antimicrobial-induced cytotoxicity was assessed by quantifying lactate
132 dehydrogenase (LDH) release (resulting from damaged cells) in the cell culture supernatant of
133 osteoblasts incubated with each tested antimicrobial at C_{max} using a colorimetric method
134 (Dimension Vista automated clinical chemistry analyser, Siemens Healthcare Diagnostics,
135 Tarrytown, NY).

136

137 *Statistical analysis*

138 For every concentration, each antimicrobial was evaluated in triplicate during three
139 independent experiments. The results are presented as the mean, with the 95% confidence
140 interval (CI) of the 9 measure points available for each condition. To standardise the results,
141 intracellular inocula were normalised for 100,000 osteoblasts and expressed as changes
142 observed in the number of intracellular colony-forming units ($\Delta \log$ CFU) at 24 h compared
143 with untreated cells using the Mann-Whitney U-test. Intracellular SCVs were expressed using
144 the ratio of the number of SVC colonies among antimicrobial-treated cells compared to

145 untreated osteoblasts. The existence of a dose effect was assessed by linear regression
146 between the three used concentrations. A p-value <0.05 was considered to be significant. All
147 analyses were performed using GraphPad-Prism v5.03 (GraphPad Software, San Diego,
148 California, USA).

149

150 **Results**

151

152 *Susceptibility studies*

153 The MICs, as determined by the Etest method, showed that *S. aureus* HG001 was fully
154 susceptible to all the antistaphylococcal molecules tested in the present study (Table 1).

155

156 *Antimicrobial-induced cellular toxicity*

157 The data obtained by the LDH-release assay demonstrated that the antimicrobials used at C_{max}
158 (and consequently at C_{min} and C_{bone}) had no impact on LDH concentration in the supernatant,
159 and thus were not responsible for cell death.

160

161 *Intracellular action*

162 The intracellular effect of the antimicrobials was expressed by the inoculum change between
163 the initial and 24 h inocula ($\Delta\log$ -CFU) and compared with untreated cells. Of note, the mean
164 initial inoculum was 1.8×10^6 CFU/100,000 osteoblasts (95%CI [1.4×10^6 ; 2.1×10^6]).

165 At the bone concentration, vancomycin and daptomycin were not able to significantly prevent
166 the intracellular growth observed in untreated cells ($+3.2 \log_{10}$ CFU/100,000 cells; 95%CI
167 [$+2.1$; $+4.3$]), highlighted by an intracellular inoculum increase of $+2.9$ (95%CI [$+0.8$; $+4.9$];
168 $p=0.830$) and $+1.7$ (95%CI [-0.7 ; $+4.0$]) \log_{10} CFU/100,000 cells ($p=0.070$), respectively.

169 Compared to untreated cells, an intracellular bacteriostatic effect was observed with

170 ceftaroline and teicoplanin, which was estimated at -0.1 (95%CI [-2.5; +2.3]; $p=0.002$) and -
171 0.2 (95%CI [-2.7; +2.3]; $p=0.001$) log₁₀ CFU/100,000 osteoblasts, respectively. At the bone
172 concentration, a significant bactericidal effect was observed with fosfomycin (-2.5 log₁₀
173 CFU/100,000 cells; 95%CI [-0.6; -4.5]; $p<10^{-4}$), linezolid (-3.1 log₁₀ CFU/100,000 cells;
174 95%CI [-2.9; -4.8]; $p<10^{-4}$), tigecycline (-3.9 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-2.9; -4.8];
175 $p<10^{-4}$), oxacillin (-4.2 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-3.1; -5.3]; $p<10^{-4}$), rifampin (-4.9
176 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-4.8; -4.9]; $p<10^{-4}$), ofloxacin (-4.9 log₁₀ CFU/100,000
177 cells; 95%CI [-4.9; -5.0]; $p<10^{-4}$), and clindamycin (-5.2 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-
178 5.1; -5.2]; $p<10^{-4}$) (Figure 1, panel A; Supplementary data 1).

179 At the minimal concentration, only rifampin (-4.7 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-4.9; -
180 4.6]; $p<10^{-4}$), clindamycin (-5.2 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-5.2; -5.1]; $p<10^{-4}$),
181 ofloxacin (-3.2 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-4.9; -1.4]; $p<10^{-3}$), and fosfomycin (-3.7
182 log₁₀ CFU/100,000 cells; 95%CI [-5.1; -2.3]; $p<10^{-4}$) were bactericidal. At the maximal
183 concentration, all antibiotics were bactericidal, with the exception of vancomycin and
184 daptomycin (Figure 2; Supplementary data 1).

185 The combined analysis of the three concentrations used for each antimicrobial revealed a
186 significant dose effect for oxacillin, ceftaroline, vancomycin, daptomycin, tigecycline, and
187 ofloxacin (Figure 2; Supplementary data 1).

188

189 ***Impact of antistaphylococcal antibiotics on intracellular SCV emergence***

190 After 24 h, the number of SCVs in untreated cells was 13,514/100,000 osteoblasts (95%CI
191 [6,448; 20,580]), corresponding to 4.1% (95%CI [2.6-5.7]) of all colonies. Our data showed
192 that this number did not increase, regardless of the antibiotic and concentration tested.

193 At the bone concentration, the number of SCVs was significantly decreased in the osteoblasts
194 treated with ofloxacin, rifampin, and daptomycin, with a reduction of -79.7% (95%CI [-88.4;

195 -71.0]; $p=0.001$), -89.7% (95%CI [-96.6; -82.7]; $p=0.011$), and -50.9% (95%CI [-25.1;
196 +126.9]; $p=0.004$), respectively, compared to untreated cells (Figure 1, panel B;
197 Supplementary data 1).

198 Additionally, oxacillin (-92.2%; 95%CI [-85.4; -99.0]; $p<10^{-3}$), ceftaroline (-17.1; 95%CI [-
199 102.1; +136.4]; $p=0.044$), linezolid (-64.2; 95%CI [-93.1; -35.4]; $p=0.023$), fosfomycin (-
200 94.7; 95%CI [-87.1; +102.4]; $p<10^{-3}$), and tigecycline (-8.1; 95%CI [-129.0; +145.2];
201 $p=0.015$) reduced the proportion of intracellular SCVs but only at the maximum
202 concentration.

203 A slight but significant dose effect was observed only with oxacillin (Figure 3, Supplementary
204 data 1). Other differences were not statistically significant.

205

206 Discussion

207

208 Considering that intra-osteoblastic *S. aureus* constitutes a bacterial reservoir leading to
209 chronicity and relapse,^{11,12} targeting intracellular bacteria might be a major therapeutic issue
210 in the antimicrobial therapy for BJI and should to be taken into account. Compared with
211 previous evaluations of the intracellular activity of antimicrobials, the present study was
212 specifically adapted to BJI by the following: i) the use of a human osteoblast infection model,
213 thereby allowing a better estimation of the situation encountered in BJI, as opposed to using
214 monocyte-macrophage cells, as previously described,^{21,22} and ii) the evaluation of the
215 antimicrobial intraosseous concentrations reached in humans when using standard therapeutic
216 doses and not plasmatic (or higher) concentrations, which do not correspond to the therapeutic
217 tissue reality.¹⁹

218 At the bone concentration, vancomycin and daptomycin did not result in a significant
219 reduction in the intracellular inoculum, and ceftaroline and teicoplanin appeared only

220 bacteriostatic. Conversely, the other tested antimicrobials achieved a significant intracellular
221 bactericidal effect: rifampin, ofloxacin, and clindamycin were the most active molecules.
222 These results must be analysed with regard to the relative intracellular distribution of bacteria
223 and antimicrobials and the physicochemical parameters of intracellular compartments. After
224 the internalisation step, *S. aureus* is processed in a phagolysosome, which is characterised by
225 a low pH, and certain *S. aureus* strains are able to escape from the phagosome. The proportion
226 of bacteria released into the cytoplasm depends on the time from infection (ranging from 10-
227 30% at 2 h to 60-80% after 8 h) but also on various virulence factors including delta- and
228 beta-toxins and phenol-soluble modulins.²³ Within this context, the low activity of
229 vancomycin on intracellular staphylococci can consequently lie in its slow uptake and modest
230 cellular accumulation²⁴ compared to teicoplanin, a more lipophilic glycopeptide, which shows
231 a more extensive and faster accumulation.²⁵ Conversely, the good intracellular activity of
232 clindamycin, fluoroquinolones, and rifampin can be explained by their well-known rapid
233 accumulation in eukaryotic cells.²⁶⁻²⁸ However, fluoroquinolones are mainly located in the
234 cytosol, whereas clindamycin and rifampin are distributed both in the cytosol and
235 phagosomes, likely allowing these molecules to target all intracellular *S. aureus* cells.²⁹
236 Moreover, the local environment, and especially the acidic pH, can be unfavourable to the
237 activity of some antibiotics. For instance, such conditions only slightly affect
238 fluoroquinolones and clindamycin, with the retention of their good intracellular activity.²⁹
239 Interestingly, some studies have even shown that methicillin-resistant *S. aureus* strains
240 recover their susceptibility to β -lactam antibiotics when they are phagocytised by eukaryotic
241 cells due to the acidic pH in phagolysosomes.^{30,31} Indeed, penicillin-binding protein (PBP) 2a,
242 a low β -lactam-affinity PBP encoded by the *mecA* gene and conferring resistance to penicillin,
243 can be acetylated by β -lactams due to a pH-induced conformational change.³² This mechanism

244 can possibly be involved in the increased intracellular activity of β -lactams against MSSA due
245 to a similar conformational modification of natural PBPs.

246 To our knowledge, only two studies previously assessed the intra-osteoblastic activity of some
247 antimicrobials. Kreis et al. recently obtained results concordant with ours using tigecycline
248 and rifampin but with tigecycline concentrations 30-fold higher than therapeutic bone
249 concentrations.³³ Ellington et al. also suggested an excellent intra-osteoblastic activity of
250 rifampicin, clindamycin, and macrolides, but these compounds were used at MICs and not at
251 bone concentrations.²¹ Other studies were performed using monocyte or macrophage cell
252 lines, showing that the intracellular activity of the anti-staphylococcal depends on the
253 exposure time and the extracellular concentration of the molecules tested, which emphasises
254 the importance of using therapeutic bone concentrations.³⁴ As in the present work, these
255 studies have also highlighted a superiority of fluoroquinolones on internalised bacteria and the
256 inefficiency of vancomycin in macrophages.³⁴⁻³⁶ Finally, animal models have also been used
257 to evaluate the intracellular activity of anti-staphylococcal molecules. In a mouse model of
258 staphylococcal peritonitis, Sandberg et al. classified the intracellular activity of antimicrobials
259 as follows: dicloxacillin > rifampin > gentamicin.³⁷ However, a peritonitis model does not
260 match the tissue reality of BJI, for which antibiotic diffusion problems is a major concern. In
261 another mouse model of foreign-device infection, Murillo et al. confirmed the superiority of
262 fluoroquinolones over β -lactam antibiotics in the eradication of intracellular *S. aureus*.³⁸

263 The interpretation of the results obtained for SCVs is more complex, as the observed results
264 after 24 h of treatment is a balance between the emergence of these phenotypic variants,
265 which can be promoted by the stress induced by the tested antibiotics themselves, and the
266 efficacy of these same antibiotics on the SCVs. A previous study has shown that most
267 antibiotics were able to kill intracellular SCVs, depending on the concentration used.³⁹ Using
268 a therapeutic concentration, we showed that among intracellularly active antimicrobials, only

269 ofloxacin was able to limit the intracellular emergence of SCVs. Finally, an accurate
270 definition of SCV, involving not only colony size but also metabolism markers, for example,
271 is lacking and may have helped to more precisely describe these variants.

272 Some limitations of our study must be addressed. First, only one *S. aureus* reference strain
273 was tested, which may represent a limitation to the extrapolation of our results to different
274 clinical isolates. Moreover, it would have been interesting to assess the intracellular
275 concentrations of antibiotics, which was not technically feasible in our laboratory.
276 Nevertheless, as mentioned above, only a sub-cellular pharmacodynamics analysis would
277 have been relevant, taking into account both the intracellular location of bacteria and
278 antimicrobials. Thus, the binding of each antimicrobial to culture medium proteins was not
279 considered and may have impacted the available amount of antibiotic for intracellular
280 diffusion. However, this parameter is rarely taken into account in bone diffusion studies in the
281 literature. Consequently, the choice of concentrations used in our study is most likely the most
282 relevant according to current pharmacological knowledge. Finally, antimicrobials were added
283 after a two-hour period of cell infection. However, Ellington et al. showed that the
284 intracellular antibiotic activity decreased when staphylococci persisted for 12 hours
285 intracellularly before treatment, likely due to a change in the bacterial cell wall.²¹ A similar
286 study using various incubation periods could be interesting to confirm these results under our
287 experimental conditions.

288 In conclusion, our results provide the first assessment of the intra-osteoblastic activity of a
289 large panel of antimicrobial used in BJI, as evaluated at therapeutic bone concentrations.
290 Ofloxacin exhibited the best therapeutic pattern, with an excellent intracellular activity while
291 limiting the emergence of SCVs. These data provide a basis for refining the choice of
292 antibiotics to prioritise in the management of difficult-to-treat *S. aureus* BJI. For instance, our

293 results justify and promote the combination a fluoroquinolone due to its good intracellular
294 activity with an already well-known anti-biofilm molecule, such as rifampin.

295

296 **Acknowledgments**

297

298 **Lyon Bone and Joint Infection Study Group: Physicians** – *Florence Ader, François Biron,*
299 *André Boibieux, Anissa Bouaziz, Evelyne Braun, Christian Chidiac, Fatiha Daoud, Tristan*
300 *Ferry, Judith Karsenty, Johanna Lippman, Patrick Miailhes, Thomas Perpoint, Dominique*
301 *Peyramond, Marie-Paule Vallat, Florent Valour*; **Surgeons** – *Cédric Barrey, Pierre Breton,*
302 *Fabien Boucher, Romain Desmarchelier, Michel-Henry Fessy, Olivier Guyen, Christophe*
303 *Lienhart, Sébastien Lustig, Alain-Ali Mojallal, Philippe Neyret, Franck Trouillet, Gualter*
304 *Vaz*; **Microbiologists** – *Frédéric Laurent, Jean-Philippe Rasigade, François Vandenesch*;
305 **Nuclear Medicine** – *Emmanuel Deshayes, Francesco Giammarile, Marc Janier, Isabelle*
306 *Morelec*; **PK/PD specialists** – *Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle, Michel Tod*;
307 **Clinical Research Assistant** – *Eugénie Mabrut.*

308

309 **Funding**

310

311 This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education,
312 the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Groupement
313 Inter-Regional à la Recherche Clinique et à l'Innovation (GIRCI-D50829 to J.P.R), and
314 bioMérieux (to F. Vandenesch). The funders had no role in the study design, data collection
315 and analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

316

317 **Transparency declarations**

318

319 All authors declare no conflict of interest.

320

321 **References**

322

323 1. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004; **364**: 369–79.324 2. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004; **351**:

325 1645–54.

326 3. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; **339**: 520–32.327 4. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F *et al.* Virulence determinants in *Staphylococcus aureus*328 and their involvement in clinical syndromes. *Curr Infect Dis Rep* 2005; **7**: 420–8.329 5. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH *et al.* Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic330 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; **52**: 13–22.331 6. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009;332 **11**: 1034–43.333 7. Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML *et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the334 implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 47.

335 8. Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient

336 with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 2005; **87**: 1343–

337 7.

338 9. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK *et al.* Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion339 of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1999; **26**: 317–23.340 10. Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC *et al.* Internalization of *Staphylococcus aureus* by341 cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1995; **19**: 409–19.

- 342 11. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T *et al.* PSMs of hypervirulent *Staphylococcus*
343 *aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PloS One* 2013; **8**: e63176.
- 344 12. Valour F, Rasigade JP, Trouillet S *et al.* Intra-osteoblastic persistence of methicillin-
345 susceptible *Staphylococcus aureus*: an adaptative mechanism of bone and joint infection
346 chronicity. In: *Abstracts of the fifty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agents*
347 *and Chemotherapy, San Francisco, CA, 2012.* Abstract B-1319, p. 143. American Society for
348 Microbiology, Washington, DC, USA.
- 349 13. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M *et al.* Persistent and relapsing infections
350 associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis Off Publ*
351 *Infect Dis Soc Am* 1995; **20**: 95–102.
- 352 14. Tuchscher L, Medina E, Hussain M *et al.* *Staphylococcus aureus* phenotype switching:
353 an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic
354 infection. *EMBO Mol Med* 2011; **3**: 129–41.
- 355 15. Von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of
356 staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* 2006; **37 Suppl 2**: S26–33.
- 357 16. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR *et al.* Diagnosis and management of prosthetic joint
358 infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin*
359 *Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2013; **56**: e1–e25.
- 360 17. Saginur R, Stdenis M, Ferris W *et al.* Multiple combination bactericidal testing of
361 staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother*
362 2006; **50**: 55–61.
- 363 18. Pautke C, Schieker M, Tischer T *et al.* Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63,
364 Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* 2004; **24**: 3743–8.

- 365 19. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M *et al.* Penetration of antibacterials into bone:
366 pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet*
367 2009; **48**: 89–124.
- 368 20. Chirouze C, Muret P, Berthier F *et al.* Penetration of daptomycin into bone and joint.
369 Abstracts of the 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
370 (ICAAC), Chicago, IL, 2011. Abstract A1-1745. American Society for Microbiology,
371 Washington, DC, USA.
- 372 21. Ellington JK, Harris M, Hudson MC *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus* and
373 antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res*
374 *Off Publ Orthop Res Soc* 2006; **24**: 87–93.
- 375 22. Mélard A, Garcia LG, Das D *et al.* Activity of ceftaroline against extracellular (broth) and
376 intracellular (THP-1 monocytes) forms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:
377 comparison with vancomycin, linezolid and daptomycin. *J Antimicrob Chemother* 2013;
378 **68**:648-58.
- 379 23. Fraunholz M, Sinha B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell*
380 *Infect Microbiol* 2012; **2**: 43.
- 381 24. Beauchamp D, Gourde P, Simard M *et al.* Subcellular localization of tobramycin and
382 vancomycin given alone and in combination in proximal tubular cells, determined by
383 immunogold labeling. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 2204–10.
- 384 25. Maderazo EG, Breaux SP, Woronick CL *et al.* High teicoplanin uptake by human
385 neutrophils. *Chemotherapy* 1988; **34**: 248–55.
- 386 26. Easmon CS, Crane JP. Cellular uptake of clindamycin and lincomycin. *Br J Exp Pathol*
387 1984; **65**: 725–30.
- 388 27. García I, Pascual A, Ballesta S *et al.* Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers
389 in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Int J Antimicrob Agents* 2000; **15**: 201–5.

- 390 28. Höger PH, Vosbeck K, Seger R *et al.* Uptake, intracellular activity, and influence of
391 rifampin on normal function of polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother*
392 1985; **28**: 667–74.
- 393 29. Carryn S, Chanteux H, Seral C *et al.* Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect*
394 *Dis Clin North Am* 2003; **17**: 615–34.
- 395 30. Lemaire S, Olivier A, Van Bambeke F *et al.* Restoration of susceptibility of intracellular
396 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams: comparison of strains, cells, and
397 antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2797–805.
- 398 31. Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P *et al.* Role of acidic pH in the
399 susceptibility of intraphagocytic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to
400 meropenem and cloxacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1627–32.
- 401 32. Lemaire S, Fuda C, Van Bambeke F *et al.* Restoration of susceptibility of methicillin-
402 resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactam antibiotics by acidic pH: role of penicillin-
403 binding protein PBP 2a. *J Biol Chem* 2008; **283**: 12769–76.
- 404 33. Kreis CA, Raschke MJ, Roßlenbroich SB *et al.* Therapy of intracellular *Staphylococcus*
405 *aureus* by tigecycline. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 267.
- 406 34. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P *et al.* Pharmacodynamic evaluation of
407 the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1
408 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 841–51.
- 409 35. Brinch KS, Tulkens PM, Van Bambeke F *et al.* Intracellular activity of the peptide
410 antibiotic NZ2114: studies with *Staphylococcus aureus* and human THP-1 monocytes, and
411 comparison with daptomycin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1720–4.
- 412 36. Lemaire S, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC *et al.* Activity of moxifloxacin against
413 intracellular community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison

- 414 with clindamycin, linezolid and co-trimoxazole and attempt at defining an intracellular
415 susceptibility breakpoint. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 596–607.
- 416 37. Sandberg A, Hessler JHR, Skov RL, Blom J *et al.* Intracellular activity of antibiotics
417 against *Staphylococcus aureus* in a mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother*
418 2009; **53**: 1874–83.
- 419 28. Murillo O, Pachón ME, Euba G *et al.* Intracellular antimicrobial activity appearing as a
420 relevant factor in antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection caused by
421 *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 1062–6.
- 422 39. Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC *et al.* Pharmacodynamic evaluation of the activity of
423 antibiotics against hemin- and menadione-dependent small-colony variants of *Staphylococcus*
424 *aureus* in models of extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) infections.
425 *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 3700–11.
- 426

427 **Tables**

428

429 **Table 1.** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* HG001 and antimicrobial
 430 concentrations

Antimicrobial	MIC	Usual plasmatic concentration	Usual bone:plasma ratio	C_{min}	C_{bone}	C_{max}
Beta-lactams						
Oxacillin	0.094	50	0.17	3.33	10	30
Ceftaroline	0.19	20	0.19	1.33	4	12
Clindamycin	0.032	4-14	0.35	1.33	4	12
Fosfomycin	2	4-14	0.35	1.33	4	12
Glyco/lipopeptides						
Vancomycin	1.5	20-40	0.21	2	6	18
Teicoplanin	1.5	10-70	0.21	1	3	9
Daptomycin	0.19	4-11	0.24	1.7	5	15
Linezolid	1	20	0.4	2.67	8	24
Ofloxacin	0.5	5	0.5	0.67	2	6
Rifampin	0.004	10-30	0.27	2	6	18
Tigecycline	0.125	0.2-1.5	0.35	0.1	0.3	0.9

431 All concentrations are expressed in mg/L. MICs were determined by the standard diffusion
 432 method (E-test). Usual plasmatic and bone/plasma concentration ratios were determined after
 433 a literature review, especially from the review published by Landersdorfer et al.²²

434 C_{bone} : Bone concentration; C_{min} : Minimal concentration; C_{max} : Maximal concentration; MIC:
 435 Minimal inhibitory concentration.

436

437 **Figure legends**

438

439 **Figure 1.** Intraosteoblastic inoculum change and intracellular proportion of small-colony
440 variants in the presence of the main antistaphylococcal molecules at the usual bone
441 concentration. Change in the number of intracellular CFU ($\Delta\log$ CFU; means \pm 95%CI) at 2
442 h, starting from an initial intracellular inoculum of 1.8×10^6 (95%CI 1.4×10^6 - 2.1×10^6) for
443 100,000 osteoblasts, was compared to untreated cells (Mann-Whitney U-test).

444 *CFU: Colony-forming units; CI: confidence interval; SCV: Small-colony variants; ***
445 *p* < 0.01; *** *p* < 0.001.

446

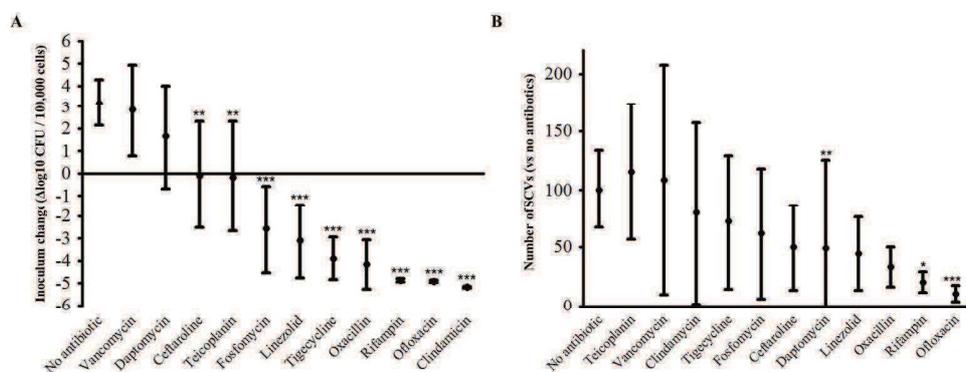
447 **Figure 2.** Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on intraosteoblastic inoculum.
448 The results are expressed by the change in the number of intracellular CFU ($\Delta\log$ CFU;
449 means \pm 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of 1.8×10^6 (95%CI
450 1.4×10^6 - 2.1×10^6) for 100,000 osteoblasts. Dose effect was assessed using linear regression
451 between the three used concentrations.

452 *CFU: Colony forming units; CI: confidence interval; * p* < 0.05.

453

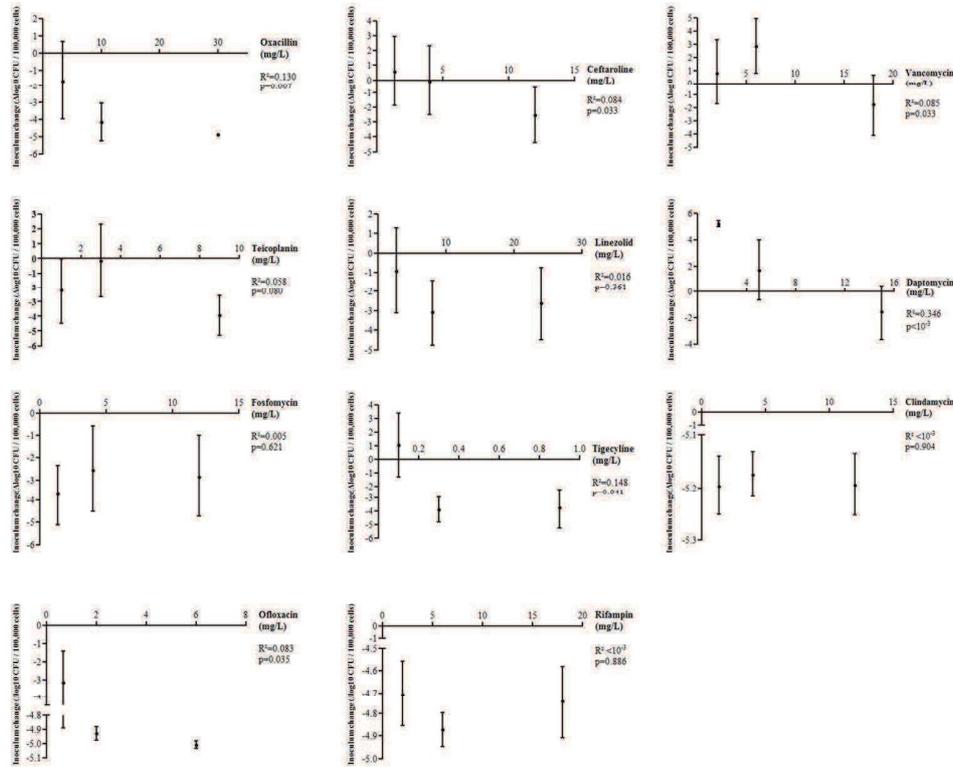
454 **Figure 3.** Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on the intraosteoblastic
455 emergence of small-colony variants. Change in the number of intracellular CFU ($\Delta\log$ CFU;
456 means \pm 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of 1.8×10^6 (95%CI
457 1.4×10^6 - 2.1×10^6) for 100,000 osteoblasts, was compared with untreated cells (Mann-
458 Whitney U-test). The dose effect was assessed using linear regression between the three used
459 concentrations.

460 *CFU: Colony-forming units; CI: confidence interval; SCV: Small-colony variants; * p* < 0.05.



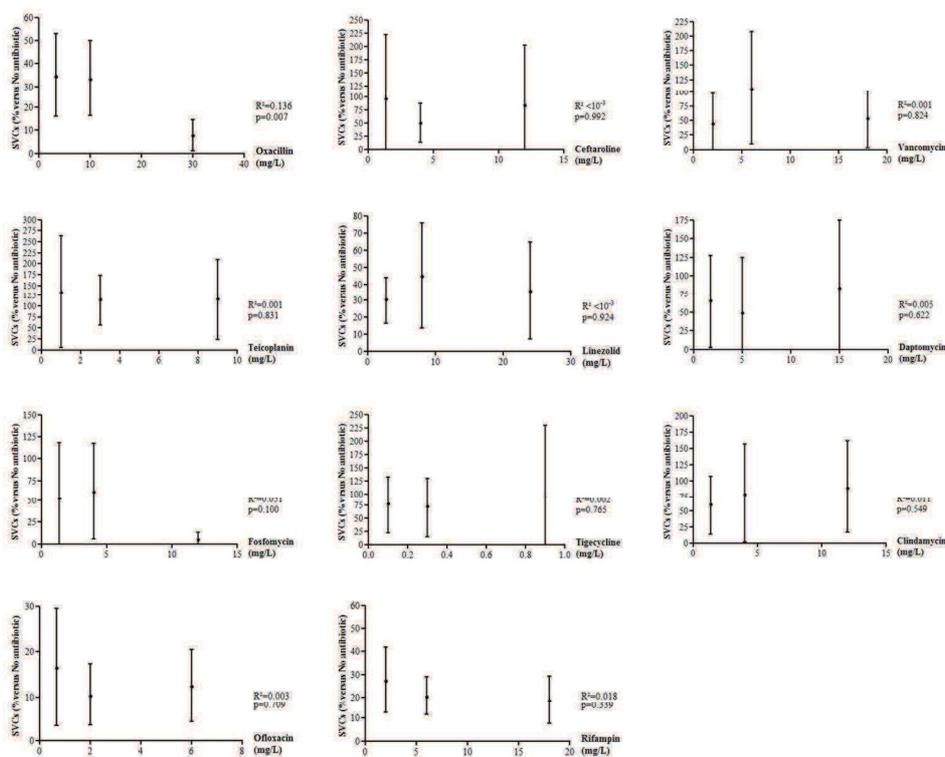
Intraosteoblastic inoculum change and intracellular proportion of small-colony variants in the presence of the main antistaphylococcal molecules at the usual bone concentration. Change in the number of intracellular CFU ($\Delta \log$ CFU; means \pm 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of 1.8×10^6 (95%CI $1.4 \times 10^6 - 2.1 \times 10^6$) for 100,000 osteoblasts, was compared to untreated cells (Mann-Whitney U-test).

CFU: Colony-forming units; CI: confidence interval; SCV: Small-colony variants; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.
260x109mm (300 x 300 DPI)



Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on intraosteoblastic inoculum. The results are expressed by the change in the number of intracellular CFU ($\Delta \log$ CFU; means \pm 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of 1.8×10^6 (95%CI $1.4 \times 10^6 - 2.1 \times 10^6$) for 100,000 osteoblasts. Dose effect was assessed using linear regression between the three used concentrations. CFU: Colony forming units; CI: confidence interval; * $p < 0.05$. 176x148mm (300 x 300 DPI)

Review only



Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on the intraosteoblastic emergence of small-colony variants. Change in the number of intracellular CFU ($\Delta \log$ CFU; means \pm 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of 1.8×10^6 (95%CI $1.4 \times 10^6 - 2.1 \times 10^6$) for 100,000 osteoblasts, was compared with untreated cells (Mann-Whitney U-test). The dose effect was assessed using linear regression between the three used concentrations.

CFU: Colony-forming units; CI: confidence interval; SCV: Small-colony variants; * $p < 0.05$.
176x148mm (300 x 300 DPI)

Antimicrobial	Minimal concentration		Bone concentration		Maximal concentration		Dose effect	
	Mean (95%CI)	p	Mean (95%CI)	p	Mean (95%CI)	p	R ²	p
Oxacillin								
Δlog CFU	-1.7 (-4.0; +0.7)	<10 ⁻³	-4.2 (-5.3; -3.1)	<10 ⁻³	-4.9 (-5.0; -4.8)	<10 ⁻³	0.130	0.007
SCVs (%)	34.5 (16.1; 52.9)	0.041	33.2 (16.3; 50.0)	0.053	7.8 (1.0; 14.6)	<10 ⁻³	0.136	0.007
Ceftaroline								
Δlog CFU	+0.5 (-1.9; +3.0)	0.006	-0.1 (-2.5; +2.3)	0.002	-2.6 (-4.4; -0.7)	<10 ⁻³	0.084	0.033
SCVs (%)	96.3 (-29.1; 221.7)	0.082	50.0 (13.1; 86.8)	0.071	82.9 (-36.4; 202.1)	0.044	<10 ⁻³	0.992
Vancomycin								
Δlog CFU	+0.8 (-1.7; +3.3)	0.333	+2.9 (+0.8; +4.9)	0.830	-1.7 (-4.1; 0.6)	0.002	0.085	0.033
SCVs (%)	44.4 (-8.2; 97.1)	0.072	108.5 (9.4; 207.6)	0.800	53.5 (3.6; 103.4)	0.185	0.001	0.824
Teicoplanin								
Δlog CFU	-2.3 (-4.5; -0.0)	<10 ⁻³	-0.2 (-2.7; +2.3)	0.001	-3.9 (-5.3; -2.6)	<10 ⁻³	0.058	0.080
SCVs (%)	134.6 (5.2; 263.9)	0.978	115.3 (56.5; 174.2)	0.374	117.2 (24.2; 210.1)	0.844	0.001	0.831
Linezolid								
Δlog CFU	-0.9 (-3.1; +1.3)	<10 ⁻³	-3.1 (-4.8; -1.4)	<10 ⁻³	-3.1 (-4.8; -1.4)	<10 ⁻³	0.016	0.361
SCVs (%)	30.1 (16.3; 43.9)	0.025	44.6 (13.5; 75.8)	0.087	35.8 (6.9; 64.6)	0.023	<10 ⁻³	0.924
Daptomycin								
Δlog CFU	+5.2 (+5.0; +5.4)	0.078	+1.7 (-0.7; +4.0)	0.070	-1.6 (-3.7; +0.5)	<10 ⁻³	0.346	<10 ⁻³
SCVs (%)	65.1 (2.3; 127.9)	0.052	49.1 (-26.9; 125.1)	0.004	83.3 (-7.9; 174.5)	0.057	0.005	0.622
Fosfomycin								

$\Delta\log$ CFU	-3.7 (-5.1; -2.3)	$<10^{-3}$	-2.6 (-4.5; -0.6)	$<10^{-3}$	-2.9 (-4.7; -1.0)	$<10^{-3}$	0.005	0.621
SCVs (%)	52.5 (-13.1; 118.1)	0.015	61.7 (5.7; 117.6)	0.057	5.3 (-2.4; 12.9)	$<10^{-3}$	0.051	0.100
Tigecycline								
$\Delta\log$ CFU	-3.7 (-5.1; -2.3)	0.005	-3.9 (-4.8; -2.9)	$<10^{-3}$	-3.8 (-4.7; -1.0)	$<10^{-3}$	0.148	0.041
SCVs (%)	77.1 (22.1; 132.2)	0.354	71.7 (14.2; 129.1)	0.128	91.9 (-45.2; 229.0)	0.015	0.002	0.765
Clindamycin								
$\Delta\log$ CFU	-5.2 (-5.2; -5.1)	$<10^{-3}$	-5.2 (-5.2; -5.1)	$<10^{-3}$	-5.2 (-5.3; -5.1)	$<10^{-3}$	$<10^{-3}$	0.904
SCVs (%)	59.7 (13.2; 106.2)	0.425	79.1 (1.3; 157.0)	0.415	88.9 (16.3; 161.5)	0.786	0.011	0.549
Ofloxacin								
$\Delta\log$ CFU	-3.2 (-4.9; -1.4)	$<10^{-3}$	-4.9 (-5.0; -4.9)	$<10^{-3}$	-5.0 (-5.0; -5.0)	$<10^{-3}$	0.083	0.035
SCVs (%)	16.4 (3.3; 29.6)	0.003	10.4 (3.4; 17.3)	0.001	12.4 (4.1; 20.6)	0.001	0.003	0.709
Rifampin								
$\Delta\log$ CFU	-4.7 (-4.9; -4.6)	$<10^{-3}$	-4.9 (-4.9; -4.8)	$<10^{-3}$	-4.7 (-4.9; -4.6)	$<10^{-3}$	$<10^{-3}$	0.886
SCVs (%)	27.1 (12.5; 41.8)	0.021	20.3 (11.6; 29.0)	0.011	18.4 (7.7; 29.2)	0.010	0.018	0.339

Supplementary data 1. Summary of the antimicrobial impact on intracellular global inoculum and SCVs

The reduction of intracellular inoculum ($\Delta\log$ CFU) represents the decrease in intracellular bacteria after 24h, compared to untreated cells by Mann-Whitney U-test. SCVs represent the number of colonies with an area inferior to 5-fold less of the median area measured for all colonies on each plate, and are expressed relative to untreated cells. The existence of a dose-effect was assessed by linear regression between the three used concentrations.

**Annexe II : Methicillin-susceptible
Staphylococcus aureus clonal
complex 398: high prevalence and
geographical heterogeneity in bone
and joint infection and nasal carriage.**

Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clonal complex 398: high prevalence and geographical heterogeneity in bone and joint infection and nasal carriage

F. Valour^{1,2,3,*}, J. Tasse^{3,*}, S. Trouillet-Assant³, J.-P. Rasigade^{1,3}, B. Lamy⁴, E. Chanard⁵, P. Verhoeven⁶, J.-W. Decusser⁷, H. Marchandin⁴, M. Bès^{3,8,9}, C. Chidiac^{2,3}, F. Vandenesch^{3,8,9}, T. Ferry^{2,3} and F. Laurent^{1,3,8,9}

on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection study group[†]

1) Bacteriology Department, Groupement Hospitalier Nord, 2) Infectious Diseases Department, Hospices Civils de Lyon, 3) International Centre for Research in Infectious Diseases, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, 4) Bacteriology Department, Montpellier University Hospitals, Montpellier, 5) Bacteriology Department, Novescia, Lyon, 6) Bacteriology Department, Saint Etienne University Hospitals, St Etienne, 7) Bacteriology Department, Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, 8) Bacteriology Department, Groupement Hospitalier Est, and 9) French National Reference Centre for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Abstract

The prevalence of clonal complex (CC) 398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) was unexpectedly high among bone and joint infections (BJIs) and nasal-colonizing isolates in France, with surprising geographical heterogeneity. With none of the major, most-known staphylococcal virulence genes, MSSA CC398 BJI was associated with lower biological inflammatory syndrome and lower treatment failure rates.

Keywords: Clonal complex 398, bone and joint infection, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, molecular epidemiology, nasal carriage, virulence factors

Original Submission: 1 September 2013; **Revised**

Submission: 15 December 2013; **Accepted:** 21 January 2014

Editor: P. Tassios

Article published online: 26 January 2014

Clin Microbiol Infect

Corresponding author: F. Valour, Laboratoire de Bactériologie, Groupement Hospitalier Nord, 103 Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France

E-mail: florent.valour@chu-lyon.fr

*These authors contributed equally to this work.

[†]Lyon Bone and Joint Infection study group members are given in Appendix 1.

In addition to being a frequent colonizing organism, *Staphylococcus aureus* is one of the leading causes of human suppurative infections, such as bone and joint infections (BJIs). Although wild isolates are susceptible to methicillin (methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA)), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates emerged from MSSA initially in hospital settings (so-called hospital-acquired MRSA) and then in the community (community-acquired MRSA) by acquiring the SCCmec element harbouring the *mecA* gene, which encodes a specific penicillin-binding protein (PBP2a). In the past 10 years, livestock has been described as a third MRSA reservoir (livestock-associated MRSA), notably because of the worldwide spread of MRSA of sequence type (ST) 398 or related STs clustered in clonal complex (CC) 398 [1,2]. Initially reported as an animal colonizer, MRSA CC398 has been shown to be responsible for various human infections [2]. Whole genome sequence analysis has provided evidence that this MRSA clone probably originated in humans as MSSA, and then jumped to livestock, where it acquired methicillin resistance-associated genes [1]. However, little is known about this MSSA CC398 counterpart. Poorly described in animals, this clone was recently reported in people lacking livestock-associated risk factors as a rare pathogen in various conditions such as bloodstream, respiratory tract and skin and soft tissue infections, and infective endocarditis in several countries, as well as a rare human nasal commensal [3–7]. However, the role of MSSA CC398 in BJIs has not been described.

To investigate MSSA CC398 in BJIs, we conducted a retrospective study of all patients with monomicrobial or polymicrobial MSSA BJI (i.e. clinical evidence of infection and at least one reliable MSSA-positive bacteriological sample) diagnosed in four French geographical areas between 2009 and 2012 (Fig. 1). Because nasal carriage of staphylococci is associated with a high risk of *S. aureus* infection, a control population of nasal-colonizing isolates was established in two of the participating centres, obtained by nasal sampling of patients admitted for orthopaedic surgery (excluding patients with BJIs) or in intensive-care units. *S. aureus* characterization was initially performed with the automated system Vitek-2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

A total of 485 isolates from patients with MSSA BJIs (Lyon, $n = 173$ (Hospices Civils de Lyon, $n = 75$; Novescia, $n = 98$); Montpellier, $n = 132$; Saint-Etienne, $n = 96$; Paris, $n = 84$) were screened by the use of CC398-specific PCR targeting the *saul-hsdS1* gene, as previously described [8]. Within this MSSA BJI collection, 68 of the 485 isolates (14.0%) belonged to CC398. For comparison, 31 (9.0%) of the 346 nasal-colonizing MSSA isolates (Hospices Civils de Lyon, from 2010 to 2012,

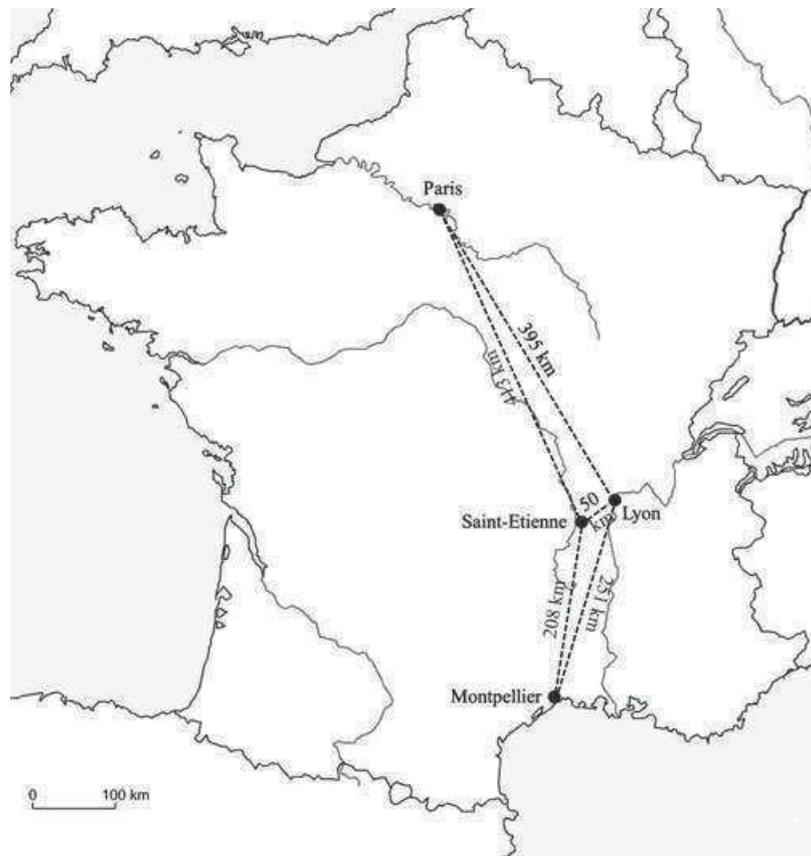


FIG. 1. Map showing the four geographical areas included in the study.

$n = 228$; Montpellier, 2012, $n = 118$) were CC398. Because most previous international staphylococcal clonal distribution studies have mainly focused on MRSA, it is difficult to determine whether this clone is emerging or has been neglected thus far. However, several facts argue for emergence. Concerning nasal-colonizing strains, CC398 accounted for only two of 829 (0.2%) MSSA isolates in a Dutch study published in 2008, and two of 52 (3.8%) Spanish MSSA isolates in 2009 [3,4]. With respect to BJIs, Luedicke *et al.* reported a high diversity of staphylococcal genetic backgrounds for the 2005–2006 period in Germany, with a distribution of the major CCs similar to that in our study, but no CC398 [9]. These differences may have been influenced by geographical area, but the hypothesis that this clone emerged and rapidly spread is supported by the fact that only one CC398 strain was identified in 2008 during screening of BJI MSSA strains isolated in our hospital in the period between 2001 and 2008 among 52 isolates (1.9%; $p = 0.081$).

Surprisingly, heterogeneity in geographical distribution was observed. The prevalence of CC398 among MSSA BJI isolates was only 3.1% in Saint-Etienne, reached 10.4% in Lyon, and was as high as 19.0% in Paris and 23.5% in Montpellier. The frequency in Montpellier was significantly different from that

observed in Saint-Etienne ($p = 0.002$) and Lyon ($p = 0.009$), and the frequency in Paris was different from that in Saint-Etienne ($p = 0.002$) and Lyon ($p = 0.046$). It is of note that the lower prevalence of MSSA CC398 was found in two cities that are close to each other (Lyon and Saint-Etienne; 50 km). Similarly, an important difference was observed in MSSA CC398 rate among nasal-colonizing isolates between Lyon ($n = 9/228$; 3.9%) and Montpellier ($n = 22/118$; 18.6%; $p = 0.013$). This heterogeneity in geographical prevalence raises the question of the driving mechanism. It may lie in greater endemic diffusion in some areas, possibly related to specific routes of transmission, risk factors, and environmental conditions, or the emergence of subpopulations associated with the acquisition of particular genetic traits in other areas.

In an ancillary study, MSSA BJIs identified in our hospital ($n = 75$) between 2011 and 2012 were extensively characterized with respect to genetic background, virulence and resistance genes, and clinical characteristics. CC assignment on the basis of DNA microarray results (StaphyType; Alere, Jena, Germany) was in agreement with the CC398-specific PCR results [10,11]. As expected for the MSSA collection, a great diversity of CCs was observed ($n = 20$), among which CC398 was the fourth most common ($n = 8$; 10.7%), behind

CC30 ($n = 12$; 16.0%), CC5 ($n = 10$; 13.3%), and CC45 ($n = 9$; 12.0%). CC398 was associated with three different *spa* types, namely t571 ($n = 6$), t034 ($n = 1$), and t002 ($n = 1$). No significant differences were observed between CC398 and other strains with respect to demographic characteristics and the clinical presentation of BJIs (Table 1). Conversely, MSSA CC398 BJIs were significantly associated with a lower biological inflammatory syndrome ($p = 0.035$) and lower treatment failure rates (0% vs. 37.3%, $p = 0.032$). These results should be interpreted with caution, because of the large number of statistical tests performed and the small number of included cases of each clone. Nevertheless, this low virulence profile is in agreement with DNA microarray analysis revealing no particular resistance gene (except for an isolated resistance to macrolides related to the *ermT* gene), and none of the major, most well-known staphylococcal virulence genes, with the exception of one strain bearing the genes for enterotox-

TABLE 1. Characteristics of the 75 patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) bone and joint infection (BII) included at the Lyon University Hospitals, and comparison between clonal complex (CC) 398 and other clones

	Total	CC398	Other clones	p
Total patients	75	8	67	
Demographic characteristics				
Sex (male)	47 (62.7)	6 (75.0)	41 (61.2)	0.364
Age (years)	52.7 ± 20.3	49.9 ± 17.0	53.1 ± 20.7	0.377
Charlson's comorbidity index	2.4 ± 2.8	1.8 ± 2.7	2.5 ± 2.8	0.492
BII characteristics				
Arthritis	26 (34.7)	4 (50)	22 (32.8)	0.278
Prosthesis joint infections	16 (21.3)	1 (12.5)	15 (22.4)	0.455
Osteomyelitis	38 (50.7)	4 (50)	34 (50.7)	0.629
Osteosynthesis device infections	25 (33.3)	4 (50)	21 (31.3)	0.249
Vertebral osteomyelitis	11 (14.7)	0 (0)	11 (16.4)	0.262
Vertebral osteosynthesis device infections	5 (6.7)	0 (0)	5 (7.5)	0.560
Acute BII	47 (62.7)	6 (75)	41 (61.2)	0.364
Delay from symptoms to diagnosis (days)	52.5 ± 362.9	3.4 ± 3.3	58.4 ± 383.9	0.246
Biological inflammatory syndrome				
CRP (mg/L)	110 ± 113	62 ± 96	116 ± 115	0.193
Leukocyte count (10^9 /mL)	10.2 ± 4.2	7.6 ± 2.3	10.5 ± 4.2	0.048
Neutrophil count (10^9 /mL)	7.8 ± 4.0	5.3 ± 2.0	8.1 ± 4.1	0.035
Local complication				
Fistula	58 (77.3)	6 (75)	52 (77.6)	0.583
Abscess	38 (50.7)	2 (25)	36 (53.7)	0.122
Bacteraemia	31 (41.3)	5 (62.5)	26 (38.8)	0.182
Bacteraemia Outcome	22/33 (66.7)	1/2 (50)	21/31 (67.7)	0.562
Treatment failure	25 (33.3)	0 (0)	25 (37.3)	0.032

CRP, C-reactive protein. Acute BII: time from the onset of symptoms to diagnosis of ≤ 4 weeks. Biological inflammatory syndrome: CRP level of >10 mg/L at the time of diagnosis. Treatment failure: (i) persistence of septic symptoms despite appropriate surgical and medical treatment; (ii) relapse owing to the same MSSA after cessation of treatment; or (iii) the need for a new operation for sepsis more than 5 days after the initial operation.

Results are presented as n (%) and mean \pm standard deviation. Comparisons were performed by use of a t -test with Welch's correction for continuous variables, and the chi-squared or Fisher exact test for dichotomous variables, as appropriate.

ins C and L. This may also explain why this 'unspecialized' pathogen is associated with a large panel of diseases [3–7]. However, all strains harboured the *chp* and *scn* genes on a mobile genetic element belonging to the immune evasion cluster and β -haemolysin-converting bacteriophages and described as being associated with *S. aureus* human host specificity for the ST398 lineage that has been lost in the animal-adapted MRSA CC398 [1,12]. The presence of such mobile genetic elements provides evidence for the capacity of the MSSA CC398 clone to be highly receptive to horizontal gene transfer, which might lead to human and/or virulence adaptation. This hypothesis was recently confirmed by the emergence and spread of a Pantone–Valentine leukocidin-positive CC398 subpopulation in Chinese skin and soft tissue infections, reaching 64.3% of CC398 isolates in a recent study [13]. This last report is very worrying; the acquisition of this hypervirulent phenotype by a clone that is well adapted to humans and able to be transmitted throughout the community (as demonstrated by high nasal colonization rates in some areas) may have a major impact on public health, and warrants regular monitoring.

Finally, a particular ability of this clone to cause BJIs remains questionable. On the one hand, the high prevalence of MSSA CC398 in BJIs and the difference between BII and nasal-colonizing isolates, especially in our institution (nine MSSA CC398/228 nasal-colonizing isolates (3.9%) as compared with 10.4% CC398 BJIs ($p = 0.028$)), suggest a particular tropism of this clone for bone and joints. In Montpellier, the very widespread diffusion of the clone as indicated by the huge prevalence, even in carriage (23.5% of all MSSA), possibly masks the phenomenon, and makes it more difficult to obtain statistically significant data when comparing the prevalence of CC398 in BJIs and carriage. On the other hand, a global rise in the prevalence of MSSA CC398 has been observed in France in various pathogenic conditions, including bloodstream infections [5,7]. Moreover, DNA microarray analysis failed to highlight specific genetic virulence associated with BJIs. In any case, this rise in MSSA CC398 prevalence in BJIs as well as in many other infectious conditions may be attributable to specific unknown virulence factors or specific expression profiles impacting on phenotypic characteristics, such as biofilm formation and/or interactions with bone cells, which remain to be evaluated.

Acknowledgements

We thank S. Flammier, H. Meugnier and A. Sapin for technical assistance.

Funding

This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The funders played no role in the study design, data collection and analysis, preparation of the manuscript, or decision to publish.

Transparency Declaration

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Price LB, Stegger M, Hasman H *et al.* *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio* 2012; 3: e00305–e00311.
- Verkade E, Kluytmans J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. *Infect Genet Evol* 2013; doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.013. [Epub ahead of print].
- Lozano C, Gomez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 500–505.
- van Belkum A, Melles DC, Peeters JK *et al.* Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 479–483.
- Chroboczek T, Boisset S, Rasigade JP *et al.* Clonal complex 398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: a frequent unspecialized human pathogen with specific phenotypic and genotypic characteristics. *PLoS ONE* 2013; 8: e68462.
- Valentin-Domelier AS, Girard M, Bertrand X *et al.* Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? *PLoS ONE* 2011; 6: e28369.
- Tristan A, Rasigade JP, Ruizendaal E *et al.* Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. *PLoS ONE* 2012; 7: e51172.
- Stegger M, Lindsay JA, Moodley A, Skov R, Broens EM, Guardabassi L. Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying *sauI-hsdS1*. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 732–734.
- Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 457–463.
- Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, *et al.* Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using *spa* sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2805–2808.
- Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 237–251.
- van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 2006; 188: 1310–1315.
- Zhao C, Liu Y, Zhao M *et al.* Characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infection in Beijing: high prevalence of PVL+ ST398. *PLoS ONE* 2012; 7: e38577.

Appendix I. Lyon Bone and Joint Infection Study Group

Physicians: F. Ader, F. Biron, A. Boibieux, A. Bouaziz, E. Braun, C. Chidiac, F. Daoud, T. Ferry, J. Karsenty, J. Lippman, P. Mialhes, T. Perpoin, D. Peyramond, M.-P. Vallat, and F. Valour. Surgeons: C. Barrey, M.-H. Fessy, O. Guyen, C. Lienhart, S. Lustig, P. Neyret, F. Trouillet, and G. Vaz. Microbiologists: F. Laurent, J.-P. Rasigade, and F. Vandenesch. Nuclear medicine: E. Deshayes, F. Giammarile, M. Janier, and I. Morelec. Pharmacokinetic/pharmacodynamic specialists: M.-C. Gagnieu, S. Goutelle, and M. Tod. Clinical research assistant: M. Martinez.

**Annexe III : The levels of antibodies to
Panton-Valentine leukocidin (PVL)
vary with PVL prevalence along a
North-South gradient.**

1
2
3 1 **The levels of antibodies to Panton-Valentine leukocidin (PVL) vary with**
4
5 2 **PVL prevalence along a North-South gradient**
6

7 3 **Jean-Philippe Rasigade,¹⁻⁶ Sophie Trouillet-Assant,¹ Sebastien Breurec,⁷ Kenza Antri,⁸**
8 4 **Gerard Lina,¹⁻⁶ Michele Bes,¹⁻⁶ Anne Tristan,¹⁻⁶ Cedric Badiou,¹⁻⁵ Marylou Bernelin,¹**
9 5 **Cheikh Fall,⁷ Nadjia Ramdani-Bougoussa,⁸ Jerome Etienne,¹⁻⁶ François Vandenesch¹⁻⁶**
10 6 **and Frederic Laurent¹⁻⁶**

11 7 ¹CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France;

12 8 ²Inserm, U11111, Lyon, France;

13 9 ³Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France;

14 10 ⁴Université Lyon 1, Lyon, France;

15 11 ⁵CNRS, UMR5308, Lyon, France;

16 12 ⁶Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France;

17 13 ⁷Unité de Bactériologie Médicale et Environnementale, Institut Pasteur de Dakar, Dakar,
18 14 Senegal; and

19 15 ⁸Service de Microbiologie, Centre Hospitalo-Universitaire Mustapha Pacha, Algiers, Algeria.

20 16 **Corresponding Author.** Dr Jean-Philippe Rasigade, Inserm U11111, Faculté de Médecine
21 17 Lyon-Est, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 8, France (jean-
22 18 philippe.rasigade@chu-lyon.fr).

23 19 **Keywords.** *Staphylococcus aureus*; alpha-toxin; humoral immunity; Panton-Valentine
24 20 leukocidin; France; Algeria; Senegal

25 21 **Running Title.** PVL antibodies vary with PVL prevalence

26 22 **Proposed Article Type.** Original Article.

23 **ABSTRACT**

24 Recent research on *Staphylococcus aureus* vaccine development has focused on active
25 immunization against Panton-Valentine leukocidin (PVL), a potent leukotoxin associated with
26 both superficial and severe deep-seated infections. PVL prevalence is highly variable
27 worldwide, but it is unknown to what extent immunity to PVL varies between patients from
28 geographic areas with different PVL-positive *S. aureus* prevalences. We conducted a
29 retrospective multicentric study of anti-PVL and anti-alpha-toxin (Hla) antibody levels in
30 uninfected adult patients from France (low PVL prevalence; n = 200), Algeria (moderate
31 prevalence; n = 143) and Senegal (high prevalence; n = 228). The antibody levels were
32 quantified by ELISA. Because Hla is present in virtually all *S. aureus* strains, its
33 corresponding antibody levels were considered to reflect population exposure to *S. aureus*.
34 Compared with French participants, the average anti-PVL antibody levels were 2.5-fold and
35 8.2-fold higher in Algerian and Senegalese participants, respectively ($P < .001$). Conversely,
36 anti-Hla antibody levels did not differ between participants from the three countries,
37 suggesting that the observed differences in anti-PVL antibody levels were not biased by
38 variations in population exposure to *S. aureus*. Hence, anti-PVL antibody levels in the
39 general populations of France, Algeria and Senegal vary widely and match variations in PVL-
40 positive *S. aureus* strain prevalence, with an increasing North-to-South gradient. We
41 conclude that immunity to PVL in a given population correlates with local PVL prevalence.
42 This finding can help to inform PVL vaccine strategies, whose maximum benefits are
43 expected in patients with weak or absent PVL immunity.

44

1
2
3 45 **INTRODUCTION**
4
5

6 46 *Staphylococcus aureus* is a major human pathogen responsible for a wide array of infections,
7 47 ranging from mild superficial infections of the skin to life-threatening deep-seated infections,
8 48 such as infective endocarditis or pneumonia [1]. Because of its high prevalence and its
9 49 propensity to develop antimicrobial resistance, *S. aureus* is considered as a major public
10 50 health issue and a target of considerable interest for vaccine research [2]. However,
11 51 strikingly, all anti-*S. aureus* vaccination approaches have failed in clinical trials thus far [3], in
12 52 contrast with the encouraging results obtained in preclinical experiments. The causes of
13 53 these repeated failures are multifactorial. On the one hand, our understanding of the
14 54 mechanisms of protective immunity to *S. aureus* is incomplete; notably, it has been proposed
15 55 that cell-mediated immunity, rather than the humoral immunity targeted by classical antigen-
16 56 based vaccine approaches, might play a prominent role in preventing *S. aureus* infections
17 57 [2]. On the other hand, as a colonizing organism in humans, *S. aureus* is widely distributed,
18 58 so virtually all patients possess anti-*S. aureus* antibodies [4]. Thus, vaccines strategies
19 59 involving antigens common to all *S. aureus* strains may have failed to demonstrate
20 60 measurable benefits because they sought to elicit a seroresponse in patients with pre-
21 61 existing anti-*S. aureus* immunity.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38
39 62 In this context, targeting strain-specific toxins or antigens, rather than core genome-
40 63 encoded antigens, might be of interest because patients are less likely to have encountered
41 64 the toxin and developed a seroresponse. Among possible vaccine candidates, Panton-
42 65 Valentine leukocidin (PVL) has garnered much attention because of its frequent expression
43 66 in hypervirulent community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA), which has
44 67 rapidly emerged and spread worldwide over the last two decades [5]. PVL is a phage-borne
45 68 leukotoxin comprising two subunits, LukS-PV and LukF-PV, that is able to activate and
46 69 induce the apoptosis and lysis of innate immune cells after binding to the C5a receptor [6].
47
48
49
50
51
52
53
54
55

1
2
3 70 Although PVL is most frequently associated with skin and soft-tissue infections, it is also
4
5 71 involved in severe and frequently lethal deep-seated infections, such as necrotizing
6
7 72 pneumonia [7, 8], whose prevention by active immunization is highly desirable. Moreover,
8
9 73 high antibody titers to PVL have recently been reported to correlate with a lower risk of
10
11 74 sepsis and invasive infection [9, 10], indicating that the PVL seroresponse either affords
12
13 75 protection *per se* or is at least a marker of another form of protective immunity. Collectively,
14
15 76 these data suggest that an anti-PVL vaccine would bring the most benefit to patients with
16
17 77 weak or absent PVL immunity.

18
19
20 78 To help to refine future vaccine strategies, it is crucial to investigate whether different
21
22 79 patient populations, e.g., in different regions of the world, exhibit different levels of PVL
23
24 80 immunity. Indeed, PVL prevalence in *S. aureus* is highly variable worldwide, ranging from
25
26 81 less than 2% of strains in certain areas to more than 50% in others [11], but it is unknown to
27
28 82 what extent variations in toxin prevalence are associated with variations in PVL immunity at
29
30 83 the population level. To address this question, we conducted a multicentric study of the PVL
31
32 84 serologic status of uninfected patients from three countries with contrasting PVL
33
34 85 prevalences, namely, France (Europe), Algeria (Maghreb) and Senegal (West Africa).

35
36
37 86
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 87 **METHODS**4
5 88 **Study design, sample collection and ethics approval**

6
7
8
9 89 The study was multicentric, retrospective and cross-sectional. The overall aim of the
10
11 90 sampling procedure was to obtain blood samples from adult patients devoid of *S. aureus*
12
13 91 infection and immunological disorders who were from areas with contrasting PVL
14
15 92 prevalences. The participating centers were as follows: (1) the University Hospital of Lyon,
16
17 93 France, a country where the PVL-positive *S. aureus* prevalence is reported to be below 5%
18
19 94 in unselected strain populations [12, 13]; (2) the University Hospital of Algiers, Algeria, a
20
21 95 setting in which the prevalence is approximately 35% of strains [14, 15]; and (3) the Pasteur
22
23 96 Institute of Dakar, Senegal, where the prevalence is approximately 60% [16].

24
25
26 97 The inclusion criteria were age over 18 years, the absence of a patent or suspected
27
28 98 septic condition, and the absence of immunosuppressive medication. In France and Algeria,
29
30 99 only HIV-negative patients were included, whereas HIV infection was not accounted for in
31
32 100 Senegal because of data unavailability (of note, HIV prevalence in Senegal is less than .5%
33
34 101 [17]). All patients gave informed consent, stating that their blood samples could be used
35
36 102 anonymously for research purposes. Age and gender were the only items collected. The
37
38 103 patients from France were blood donors whose blood had been drawn for routine serological
39
40 104 screening in December 2009. Because the study materials were left over from routinely
41
42 105 collected samples and because no clinical data were recorded, approval by the ethics
43
44 106 committee was not required. The patients from Algeria had been enrolled and sampled from
45
46 107 2006 to 2007 to constitute the control group of a previous study dedicated to anti-*S. aureus*
47
48 108 antibodies [18]. The study had received approval from the Medical Ethics Committee of the
49
50 109 Mustapha Pacha Hospital. The patients from Senegal were enrolled in the clinical laboratory
51
52 110 of the Pasteur Institute of Dakar from March to April 2011. The study received approval from
53
54 111 the National Ethics Committee of Senegal.

1
2
3 112 Serum samples were stored at -80°C, were kept frozen during transportation and
4
5 113 were analyzed in the same facility at the University of Lyon, France.
6
7

8 114 **Serologic testing**

9
10 115 Serum antibodies to LukS-PV (one of the two components of PVL) were quantified using a
11
12 116 specific ELISA method with solid-phase recombinant toxins and peroxidase-conjugated anti-
13
14 117 immunoglobulin antibodies. To evaluate the global exposure to *S. aureus* in each cohort, we
15
16 118 also quantified the levels of antibodies to alpha-toxin (Hla), which is expressed by most
17
18 119 *S. aureus* strains [19]. This serological correlate of exposure was used to determine whether
19
20 120 differences in anti-LukS-PV antibodies were related to differences in global *S. aureus*
21
22 121 exposure, rather than only to differences in the prevalence of PVL-positive *S. aureus*.
23
24

25
26 122 Recombinant LukS-PV and Hla were produced in-house in *Escherichia coli*
27
28 123 BL21star(DE3)pLys (Invitrogen Corp.) and purified on Ni-nitrilotriacetic acid columns
29
30 124 (Qiagen), as described previously [20]. The wells of microtiter plates (Greiner Bio-One,
31
32 125 Munich, Germany) were then coated with either 5 µg/mL LukS-PV or .5 µg/mL Hla in
33
34 126 phosphate-buffered saline (PBS) with .1% sodium azide. After overnight incubation at room
35
36 127 temperature, the wells were sequentially washed three times with PBS-Tween and incubated
37
38 128 for 1 h at 37°C with (1) PBS-Tween and 5% lyophilized skimmed milk, (2) serially diluted
39
40 129 specimen (range: 1/1,000 to 1/100,000), and (3) peroxidase-conjugated rabbit anti-human
41
42 130 polyvalent IgG (Sigma, St. Louis, USA) diluted 1/30,000. After a final wash, the substrate
43
44 131 tetramethylbenzidine (Sigma) was added and incubated for 30 min before the reaction was
45
46 132 stopped by adding 75 µL of 1 M H₂SO₄. The optical density was then read at 450 nm.
47
48

49 133 Commercial human intravenous polyclonal immunoglobulin (IVIg) (Tégéline;
50
51 134 Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, Courtaboeuf, France) was
52
53 135 used as a standard, as described previously [21]. This IVIg was isolated by fractionation of a
54
55 136 pool of IgG collected from 20,000 French healthy donors. The amount of specific antibodies
56
57
58
59
60

1
2
3 137 contained in an IVIg solution at 12.5 g/L, which is the physiological human immunoglobulin
4
5 138 serum concentration, is thus considered to reflect the average antibody level in the general
6
7 139 French population. In the present study, the results for the clinical samples are expressed in
8
9 140 arbitrary units per liter (AU/L), where 1,000 AU/L corresponds to the amount of anti-LukS-PV
10
11 141 or anti-Hla antibodies in the standard IVIg solution. The reported values are means of
12
13 142 duplicate wells.

143 **Statistical analysis**

144 The distribution of the data was assessed visually. When the data followed a lognormal
145 distribution (with serologic results expressed as AU/L), hypothesis testing and modeling were
146 performed using the logarithm of the data, with negative values coerced to zero. Location
147 differences were tested for significance using Welch's *t*-test. *P*-values were corrected for
148 multiple hypothesis testing using the Holm-Bonferroni procedure where applicable.
149 Multivariate models using either anti-LukS-PV or anti-Hla antibody levels as the response
150 variable were constructed by multiple linear stepwise regression with forward variable
151 selection. Density estimations were performed using Gaussian kernels. The significance
152 threshold was set at .05 for all tests. These analyses were performed using R software
153 version 3.01 Good Sport (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

154

RESULTS**Characteristics of the study population**

A total of 571 patients were included, of whom 200 (35.0%) were from France, 143 (25.0%) were from Algeria, and 228 (40.0%) were from Senegal. Demographic characteristics are given in Table 1. Gender did not differ significantly between the cohorts, but age did, with patients from Algeria being older on average than patients from France ($P < .001$, Welch's t -test) and Senegal ($P = .003$) were.

Anti-LukS-PV, but not anti-Hla, antibody levels strongly differ between patients from France, Algeria and Senegal

The mean \pm standard deviation (SD) anti-LukS-PV antibody level in patients from France was $1,541 \pm 1,414$ AU/L, which was close to that of the reference material (pooled IVIg from healthy French donors), set by definition to 1,000 AU/L (Figure 1). Anti-LukS-PV antibody levels were 2.5-fold higher in patients from Algeria and 8.2-fold higher in patients from Senegal ($P < .001$ for both differences) (Table 1). Conversely, anti-Hla antibody levels did not differ significantly between the patients in the three cohorts ($P = .680$; Table 1). Hence, a strong North-to-South gradient in the distribution of anti-LukS-PV antibodies, but not anti-Hla antibodies, was observed at the population level, which indicates that the differences in the anti-LukS-PV antibody levels were not biased by variations in population exposure to *S. aureus*.

Factors associated with anti-LukS-PV and anti-Hla antibody levels

A multivariate analysis was performed to determine which factors were independently associated with humoral immunity to LukS-PV and Hla. Unsurprisingly, anti-LukS-PV and anti-Hla antibody levels were strongly associated, both in a univariate analysis (Pearson's

1
2
3 178 correlation coefficient $r = .36$, $P < .001$) and in the multivariate analysis, after controlling for
4
5 179 country, age and gender ($P < .001$).

6
7
8 180 Patients' country was an independent predictor of anti-LukS-PV antibody levels ($P <$
9
10 181 $.001$). The same association was found between country and anti-Hla antibody levels ($P <$
11
12 182 $.001$); however, this association appeared only in the multivariate, and not the univariate,
13
14 183 analysis, indicating that it most likely arose to compensate for the large differences in anti-
15
16 184 LukS-PV antibody levels between the three cohorts.

17
18
19 185 Age was moderately negatively associated with anti-Hla antibody levels, both in the
20
21 186 univariate ($r = -.123$, $P = .003$) and in the multivariate ($P = .023$) analyses. We also observed
22
23 187 a very weak positive association of age with anti-LukS-PV antibody levels ($r = .084$, $P =$
24
25 188 $.045$), but this association was not significant in the multivariate analysis ($P = .610$).
26
27 189 Interestingly, anti-LukS-PV antibody levels did not differ significantly by gender (mean \pm SD,
28
29 190 $6,455 \pm 11,394$ in males and $6,628 \pm 10,069$ AU/L in females, $P = .642$, Welch's t -test on
30
31 191 logs), but anti-Hla antibody levels did, with females exhibiting moderately higher levels than
32
33 192 males did ($1,292 \pm 1,323$ UA/L vs. $1,007 \pm 1,290$, respectively, $P < .001$). This pattern was
34
35 193 conserved in the multivariate analysis, with gender being independently associated with anti-
36
37 194 Hla, but not anti-LukS-PV, antibody levels ($P < .001$ and $P = .110$, respectively).

38
39
40 195

41
42
43 196
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

197 **DISCUSSION**

198 Anti-*S. aureus* vaccine strategies have failed thus far at least partly because they have
199 sought universal, and perhaps unachievable, protection, rather than prevention of precisely
200 defined infectious conditions in precisely defined at-risk populations [2]. PVL-directed vaccine
201 approaches have shown promising preclinical results [22, 23], but they are likely no
202 exception to the rule; it is thus crucial to gain knowledge that can help to determine the
203 optimal target population. Rather surprisingly, it is unknown whether immunity to PVL varies
204 between patients from different geographic areas. Our investigation of humoral immunity to
205 PVL in uninfected adult patients from three countries with contrasting PVL-positive *S. aureus*
206 prevalences demonstrates that anti-LukS-PV antibody levels vary widely between countries,
207 with a distribution that follows the same gradient as PVL prevalence does. These results are
208 crucial for informing the design of future clinical trials for vaccines because they highlight a
209 potential limit of PVL vaccine strategies. Indeed, although it initially seems reasonable to
210 immunize patients living in areas of high PVL prevalence, who are more likely to encounter
211 the toxin and develop an infection, we show that pre-existing anti-PVL antibody levels in such
212 patients are globally high, which could strongly affect the expected benefits of a PVL vaccine
213 in these populations.

214 The large differences in anti-LukS-PV antibody levels between the three cohorts
215 involved in our study raise the question of whether high antibody levels are associated with
216 protection against PVL-related diseases. Recent studies have suggested that PVL-directed
217 immunity does not prevent the occurrence of subsequent PVL-related infections [24] but is
218 protective against sepsis and death in cases of deep-seated PVL-related infection [9, 10]. In
219 the current study, because of the lack of large-scale clinical and epidemiological studies
220 regarding PVL infections in Algeria and Senegal, we could not establish a direct link between
221 population-level PVL immunity and the outcome of PVL-positive *S. aureus* infections in these

1
2
3 222 countries. However, clinical studies from the US have reported findings that we consider as
4
5 223 indirect but strong evidence in support of the hypothesis that PVL prevalence in a given
6
7 224 population or community correlates with better infection outcomes. In particular, among US
8
9 225 citizens, it has been well established that African-American patients are more at risk for
10
11 226 colonization or infection with PVL-secreting strains than Caucasian patients are [25-27],
12
13 227 although the underlying reasons for this phenomenon are largely unknown. In a large-scale
14
15 228 epidemiological study [28], Klevens et al. reported invasive MRSA infection and related death
16
17 229 among Caucasian and African-American patients in both community and healthcare settings.
18
19 230 In this study, CA-MRSA infections, which were likely caused by PVL-secreting MRSA, were
20
21 231 3-fold more frequent in African-American patients compared with Caucasian patients.
22
23 232 However, the former were 6-fold less likely to die during hospitalization than the latter were.
24
25 233 Strikingly, this negative association of infection incidence and mortality was not present for
26
27 234 healthcare-associated infections, which were much less likely to involve PVL-secreting
28
29 235 strains. These figures were not specifically discussed by the authors, and they must be
30
31 236 interpreted with caution because investigation of PVL-associated infection and death was not
32
33 237 the primary goal of the study. However, given the large number of patients included (n =
34
35 238 8,987) and the amplitudes of the differences, these data strongly support a negative
36
37 239 association between previous exposure to PVL and PVL-associated death. Similar indirect
38
39 240 evidence can be found in a recent study by Fritz et al. [9], in which US patients who were
40
41 241 either colonized or infected with PVL-positive *S. aureus* were enrolled at a single hospital. In
42
43 242 this study, being African-American was positively associated with PVL-positive *S. aureus*
44
45 243 colonization but negatively associated with invasive infection due to the same pathogen.
46
47 244 Taken together with the observations from these studies, our finding that PVL prevalence
48
49 245 correlates with PVL immunity provides a plausible explanation for the negative association of
50
51 246 PVL prevalence and invasive PVL infection, suggesting that patients with frequent PVL
52
53 247 exposure develop immunity that affords them protection against the most severe clinical
54
55

1
2
3 248 forms of PVL-positive *S. aureus* infections. This hypothesis is in keeping with a previous
4
5 249 report that a history of PVL-related infection is associated with better outcomes in French
6
7 250 patients with pneumonia caused by PVL-secreting *S. aureus* [29]. However, specific studies
8
9 251 of humoral immunity to PVL and invasive PVL-related infection incidence in patients from
10
11 252 diverse geographic areas are warranted to confirm or disprove this hypothesis.

12
13
14 253 Our study has limitations in addition to those inherent to its retrospective design. First,
15
16 254 the patients from Senegal were not screened for HIV. However, it is unlikely that the possible
17
18 255 inclusion of HIV-positive patients biased the results because (1) HIV prevalence in Senegal
19
20 256 is very low, at < .5% [17], and (2) the inclusion of immunocompromised patients would have
21
22 257 biased the results toward lower antibody levels, which would not invalidate our conclusion
23
24 258 that patients from Senegal exhibit high antibody levels. Second, the inclusion periods differed
25
26 259 between the cohorts (Algeria, 2006-2007; France, 2009; and Senegal, 2011). However, only
27
28 260 large changes in PVL prevalences in these countries, which have not been reported to the
29
30 261 best of our knowledge, could have significantly modified the North-to-South gradient in PVL
31
32 262 prevalence upon which our conclusions were based. Third, our investigation of PVL serologic
33
34 263 status was based on the quantification of antibody levels targeted to only one of the two PVL
35
36 264 subunits, namely, LukS-PV. This choice was driven by the results of previous studies that
37
38 265 demonstrated that antibody responses to both subunits were either similar [9, 24] or stronger
39
40 266 against LukS-PV than against LukF-PV [18]. It is thus unlikely that the addition of anti-LukF-
41
42 267 PV antibody quantification to our study would have led to different conclusions. Finally, for
43
44 268 ethical reasons, only adult patients were enrolled, although PVL infections frequently occur in
45
46 269 children and adolescents [24]. Because of the large number of patients included, we believe
47
48 270 that the differences observed between the cohorts can be reasonably extrapolated to
49
50 271 younger patients; however, only specific studies in pediatric populations can offer a definitive
51
52 272 answer to this question.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 273 To conclude, we have demonstrated that humoral immunity to PVL varies widely
4
5 274 between Western European, North African and Sub-Saharan African populations and that
6
7 275 this immunity is distributed along a North-to-South gradient that correlates with that of PVL
8
9 276 prevalence in *S. aureus*. In light of recent reports that anti-PVL antibody titers correlate with
10
11 277 protective immunity against severe PVL-related infections [10], our findings have strong
12
13 278 implications for the development of PVL-directed vaccine strategies. In particular, our
14
15 279 findings suggest that such vaccines could bring little or no benefit to patients with frequent
16
17 280 PVL exposure, who are likely to have already raised a protective anti-PVL immune response.
18
19 281 Conversely, we propose that the optimal benefits of PVL immunization could be attained in
20
21 282 patients without pre-existing PVL exposure who might be exposed to PVL-positive *S. aureus*,
22
23 283 such as European inhabitants traveling to areas with high PVL prevalence [30]. More
24
25 284 generally, our findings also imply that the results of PVL vaccine efficacy studies are likely
26
27 285 dependent on the level of PVL exposure in the targeted population. Therefore, such studies
28
29 286 should be conducted in patients with homogeneous levels of PVL exposure, which can be
30
31 287 challenging in countries such as the US, whose population includes communities with
32
33 288 variable prevalences of PVL-positive *S. aureus*.

34
35
36 289
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

290 **Notes**

291 **Funding**

292 This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education
293 and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm).

294 **Acknowledgments**

295 The authors would like to thank Chantal Roure-Sobas and Mohamed Tazir for helpful advice
296 on the serologic testing strategy.

297 **Potential Conflicts of Interest**

298 The authors report no potential conflicts.

299

300 **Figure Legend**301 **Figure 1. Comparison of the distributions of anti-LukS-PV and anti-Hla antibody levels**302 **in adult patients from France, Algeria and Senegal.** Serum antibodies to LukS-PV (a PVL

303 subunit) and Hla were quantified using an ELISA procedure. The results are expressed in

304 arbitrary units per liter (AU/L), with 1,000 AU/L corresponding to the amount of antibodies in

305 a 12.5 g/L IVIg solution obtained from a pool of healthy donors from France. The density

306 curves were obtained using a Gaussian kernel on log-transformed data. **(A)**, Anti-LukS-PV307 antibody levels followed an increasing gradient from France to Algeria and Senegal ($P < .001$ 308 for all pairwise differences using Welch's t -test on logs with Holm-Bonferroni correction),309 which correlates with the gradient of PVL prevalence in these countries [12-16]. **(B)**,310 Antibodies to Hla, which is uniformly distributed among *S. aureus* species, were equally311 distributed among patients from the three countries ($P = 1$ for all pairwise differences),

312 suggesting that the differences in anti-LukS-PV antibody levels do not reflect differences in

313 global population exposure to *S. aureus* between the countries.

Table 1. Age, gender and antibody levels against the Panton-Valentine leukocidin subunit LukS-PV and alpha-toxin in adult patients from France, Algeria and Senegal.

Characteristic	Cohort				<i>P</i> ^a	Association with LukS-PV immunity		Association with Hla immunity	
	Total N = 571	France N = 200	Algeria N = 143	Senegal N = 228		<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c	<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c
Age, mean ± SD	46.4 ± 17.1	40.4 ± 15.5	52.8 ± 20.2	47.6 ± 14.6	<.001	.045	.610	.003	.023
Gender (%)									
Male	299 (52.4)	107 (53.5)	75 (52.5)	117 (51.3)	.904	.642	.110	<.001	<.001
Female	272 (47.6)	93 (46.5)	68 (47.5)	111 (48.7)					
Anti-LukS-PV antibody level, mean AU/L ± SD	6,537 ± 10,774	1,541 ± 1,414	3,905 ± 4,239	12,570 ± 14,683	<.001			<.001	<.001
Anti-Hla antibody level, mean AU/L ± SD	1,143 ± 1,312	1,082 ± 1,174	985 ± 1,273	1,295 ± 1,436	.680	<.001	<.001		

Analyses of antibody levels performed on log-transformed data.
Abbreviations: Hla, alpha-toxin; SD, standard deviation.
^a*P*-values for differences between cohorts. Categorical variables analyzed by Fisher's exact test; continuous variables analyzed by ANOVA with Fisher's *F*-test.
^bUnivariate analysis by ANOVA and *F*-test for both continuous and categorical variables.
^cMultivariate analysis by stepwise regression with forward variable selection. Patients' country was independently associated with both anti-LukS-PV and anti-Hla antibody levels (*P* < .001 in both models).

314

315 **References**

- 316 1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339: 520-532.
- 317 2. Proctor RA. Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis*
318 2012; 54: 1179-1186.
- 319 3. Daum RS, Spellberg B. Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis*
320 2012; 54: 560-567.
- 321 4. Verkaik NJ, Lebon A, de Vogel CP, et al. Induction of antibodies by *Staphylococcus*
322 *aureus* nasal colonization in young children. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1312-1317.
- 323 5. Tristan A, Bes M, Meugnier H, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--
324 positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 594-
325 600.
- 326 6. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJ, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine
327 Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 584-594.
- 328 7. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains
329 carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in
330 young immunocompetent patients. *Lancet* 2002; 359: 753-759.
- 331 8. Gillet Y, Vanhems P, Lina G, et al. Factors predicting mortality in necrotizing community-
332 acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine
333 leukocidin. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 315-321.
- 334 9. Fritz SA, Tiemann KM, Hogan PG, et al. A serologic correlate of protective immunity
335 against community-onset *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 1554-
336 1561.

- 1
2
3 337 10. Adhikari RP, Ajao AO, Aman MJ, et al. Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus*
4
5 338 exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *S. aureus* infections.
6
7 339 *J Infect Dis* 2012; 206: 915-923.
8
9
10 340 11. Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-
11
12 341 resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010; 375: 1557-1568.
13
14
15 342 12. Nhan TX, Leclercq R, Cattoir V. Prevalence of toxin genes in consecutive clinical isolates
16
17 343 of *Staphylococcus aureus* and clinical impact. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 719-
18
19 344 725.
20
21
22 345 13. Robert J, Etienne J, Bertrand X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing
23
24 346 Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital
25
26 347 laboratories, 2000-2003. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 585-587.
27
28
29 348 14. Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, et al. High prevalence of methicillin-resistant
30
31 349 *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clin*
32
33 350 *Microbiol Infect* 2010; 17: 526-532.
34
35
36 351 15. Ramdani-Bougoussa N, Bes M, Meugnier H, et al. Detection of methicillin-resistant
37
38 352 *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-
39
40 353 Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:
41
42 354 1083-1085.
43
44
45 355 16. Breurec S, Fall C, Pouillot R, et al. Epidemiology of methicillin-susceptible
46
47 356 *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: high prevalence of Panton-
48
49 357 Valentine leukocidin genes. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 633-639.
50
51
52 358 17. World Health Organization. Health Profile, Senegal. 2011; Accessed Feb. 21, 2014 at:
53
54 359 <http://www.who.int/countries/sen/en>
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 360 18. Verkaik NJ, Dauwalder O, Antri K, et al. Immunogenicity of toxins during *Staphylococcus*
4
5 361 *aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 61-68.
6
7
8 362 19. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component
9
10 363 Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging
11
12 364 Virulence Factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 12.
13
14
15 365 20. Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine
16
17 366 leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human
18
19 367 neutrophils. *J Clin Invest* 2005; 115: 3117-3127.
20
21
22 368 21. Croze M, Dauwalder O, Dumitrescu O, et al. Serum antibodies against Panton-Valentine
23
24 369 leukocidin in a normal population and during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Microbiol*
25
26 370 *Infect* 2009; 15: 144-148.
27
28
29 371 22. Karauzum H, Adhikari RP, Sarwar J, et al. Structurally designed attenuated subunit
30
31 372 vaccines for *S. aureus* LukS-PV and LukF-PV confer protection in a mouse bacteremia
32
33 373 model. *PLoS One* 2013; 8: e65384.
34
35
36 374 23. Brown EL, Dumitrescu O, Thomas D, et al. The Panton-Valentine leukocidin vaccine
37
38 375 protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300.
39
40 376 *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 156-164.
41
42
43 377 24. Hermos CR, Yoong P, Pier GB. High levels of antibody to panton-valentine leukocidin are
44
45 378 not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue
46
47 379 infection. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1138-1146.
48
49
50 380 25. Skiest DJ, Brown K, Cooper TW, Hoffman-Roberts H, Mussa HR, Elliott AC. Prospective
51
52 381 comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant community-associated
53
54 382 *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients. *J Infect* 2007; 54: 427-434.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 383 26. Skiest D, Brown K, Hester J, et al. Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus*
4
5 384 *aureus* in an urban HIV clinic. *HIV Med* 2006; 7: 361-368.
6
7
8 385 27. Srinivasan A, Seifried S, Zhu L, et al. Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-
9
10 386 resistant *Staphylococcus aureus* infections in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer*
11
12 387 2009; 53: 1216-1220.
13
14 388 28. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus*
15
16 389 *aureus* infections in the United States. *Jama* 2007; 298: 1763-1771.
17
18
19 390 29. Rasigade JP, Sicot N, Laurent F, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. A history of Panton-
20
21 391 Valentine leukocidin (PVL)-associated infection protects against death in PVL-associated
22
23 392 pneumonia. *Vaccine* 2011; 29: 4185-4186.
24
25
26 393 30. Beilouny B, Ciupea A, Eloy C, Simon G. Fatal community-acquired pneumonia due to
27
28 394 *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes after a stay in Africa.
29
30 395 *Intensive Care Med* 2008; 34: 388-389.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

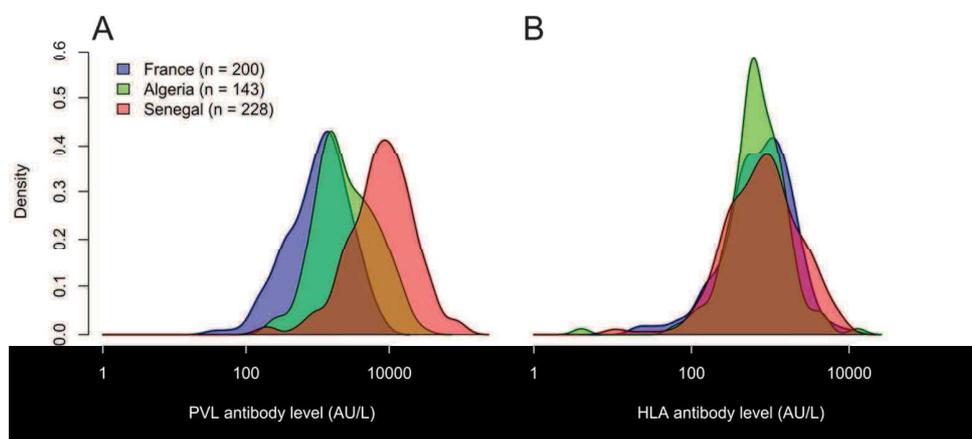


Figure 1. Comparison of the distributions of anti-LukS-PV and anti-Hla antibody levels in adult patients from France, Algeria and Senegal. Serum antibodies to LukS-PV (a PVL subunit) and Hla were quantified using an ELISA procedure. The results are expressed in arbitrary units per liter (AU/L), with 1,000 AU/L corresponding to the amount of antibodies in a 12.5 g/L IVIg solution obtained from a pool of healthy donors from France. The density curves were obtained using a Gaussian kernel on log-transformed data. (A), Anti-LukS-PV antibody levels followed an increasing gradient from France to Algeria and Senegal ($P < .001$ for all pairwise differences using Welch's t-test on logs with Holm-Bonferroni correction), which correlates with the gradient of PVL prevalence in these countries [12-16]. (B), Antibodies to Hla, which is uniformly distributed among *S. aureus* species, were equally distributed among patients from the three countries ($P = 1$ for all pairwise differences), suggesting that the differences in anti-LukS-PV antibody levels do not reflect differences in global population exposure to *S. aureus* between the countries.

101x50mm (300 x 300 DPI)

Références bibliographiques

1. Parvizi J, Pawasarat IM, Azzam KA, Joshi A, Hansen EN, Bozic KJ: **Periprosthetic joint infection: the economic impact of methicillin-resistant infections.** *J Arthroplasty* 2010, **25**(6 Suppl):103-107.
2. Lee K, Goodman SB: **Current state and future of joint replacements in the hip and knee.** *Expert Rev Med Devices* 2008, **5**(3):383-393.
3. Otto M: **Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**(8):555-567.
4. Uckay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F: **Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis.** *Ann Med* 2009, **41**(2):109-119.
5. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE: **Prosthetic-joint infections.** *N Engl J Med* 2004, **351**(16):1645-1654.
6. Hall-Stoodley L, Stoodley P: **Evolving concepts in biofilm infections.** *Cell Microbiol* 2009, **11**(7):1034-1043.
7. Arciola CR, Hansch GM, Visai L, Testoni F, Maurer S, Campoccia D, Selan L, Montanaro L: **Interactions of staphylococci with osteoblasts and phagocytes in the pathogenesis of implant-associated osteomyelitis.** *Int J Artif Organs* 2012, **35**(10):713-726.
8. von Eiff C, Peters G, Becker K: **The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections.** *Injury* 2006, **37** Suppl 2:S26-33.
9. Cierny G, Mader JT, Penninck JJ: **A clinical staging system for adult osteomyelitis.** *Clin Orthop Relat Res* 2003(414):7-24.
10. Lew DP, Waldvogel FA: **Osteomyelitis.** *Lancet* 2004, **364**(9431):369-379.
11. Chihara S, Segreti J: **Osteomyelitis.** *Dis Mon* 2010, **56**(1):5-31.
12. Ceroni D, Kampouroglou G, Valaikaite R, Anderson Della Llana R, Salvo D: **Osteoarticular infections in young children: what has changed over the last years?** *Swiss Med Wkly* 2014, **144**:w13971.
13. Gutierrez K: **Bone and Joint Infections in Children.** *Pediatr Clin N Am* 2005, **52** 779– 794.
14. Carek PJ, Dickerson LM, Sack JL: **Diagnosis and management of osteomyelitis.** *Am Fam Physician* 2001, **63**(12):2413-2420.
15. Morrissy RT, Haynes DW: **Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology.** *J Pediatr Orthop* 1989, **9**(4):447-456.
16. Espersen F, Frimodt-Moller N, Thamdrup Rosdahl V, Skinhoj P, Bentzon MW: **Changing pattern of bone and joint infections due to Staphylococcus aureus: study of cases of bacteremia in Denmark, 1959-1988.** *Rev Infect Dis* 1991, **13**(3):347-358.
17. Gillespie WJ: **Epidemiology in bone and joint infection.** *Infect Dis Clin North Am* 1990, **4**(3):361-376.
18. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH: **Osteomyelitis in long bones.** *J Bone Joint Surg Am* 2004, **86-A**(10):2305-2318.
19. Ciampolini J, Harding KG: **Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often?** *Postgrad Med J* 2000, **76**(898):479-483.
20. Gallie WE: **First recurrence of osteomyelitis eighty years after infection.** *J Bone Joint Surg Br* 1951, **33-B**(1):110-111.
21. Greer RB, Rosenberg AE: **Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 6-1993. A 69-year-old woman with a sclerotic lesion of the femur and pulmonary nodules.** *N Engl J Med* 1993, **328**(6):422-428.
22. Korovessis P, Fortis AP, Spastris P, Droutsas P: **Acute osteomyelitis of the patella 50 years after a knee fusion for septic arthritis. A case report.** *Clin Orthop Relat Res* 1991(272):205-207.

23. Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezeque H, Beltrand E, Rosele B, d'Escrivan T, Loiez C, Caillaux M *et al*: **Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus***. *Clin Infect Dis* 2011, **53**(4):334-340.
24. **Clinical practice recommendations. Osteoarticular infections on materials (prosthesis, implant, osteosynthesis**. *Med Mal Infect* 2009, **39**(11):815-863.
25. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, Hanssen A, Wilson WR: **Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america**. *Clin Infect Dis* 2013, **56**(1):e1-e25.
26. **Primary infectious spondylitis, and following intradiscal procedure, without prosthesis. Recommendations**. *Med Mal Infect* 2007, **37**(9):573-583.
27. Goldenberg DL: **Septic arthritis**. *Lancet* 1998, **351**(9097):197-202.
28. Shirliff ME, Mader JT: **Acute septic arthritis**. *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**(4):527-544.
29. Stott NS: **Paediatric bone and joint infection**. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2001, **9**(1):83-90.
30. Nade S: **Septic arthritis**. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003, **17**(2):183-200.
31. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer AI, Gaborit C, Rosset P, Rusch E, Bernard L: **Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes**. *J Hosp Infect* 2008, **82**(1):40-48.
32. Greig JM, Wood MJ: ***Staphylococcus lugdunensis* vertebral osteomyelitis**. *Clin Microbiol Infect* 2003, **9**(11):1139-1141.
33. Lang S, Livesley MA, Lambert PA, Elliott J, Elliott TS: **The genomic diversity of coagulase-negative staphylococci associated with nosocomial infections**. *J Hosp Infect* 1999, **43**(3):187-193.
34. Murdoch DR, Everts RJ, Chambers ST, Cowan IA: **Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus lugdunensis***. *J Clin Microbiol* 1996, **34**(4):993-994.
35. Vallianou N, Evangelopoulos A, Makri P, Zacharias G, Stefanitsi P, Karachalios A, Avgerinos PC: **Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis due to *Staphylococcus simulans*: a case report**. *J Med Case Rep* 2008, **2**:183.
36. Ceroni D, Cherkaoui A, Ferey S, Kaelin A, Schrenzel J: ***Kingella kingae* osteoarticular infections in young children: clinical features and contribution of a new specific real-time PCR assay to the diagnosis**. *J Pediatr Orthop* 2010, **30**(3):301-304.
37. Giudicelli J SJ-C: **Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose**. *Revue de l'ACOMEN* 1998, **4**.
38. Ross MH, Pawlina W.: **Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology** 5edn: LWW; 2006.
39. Couret I.: **Biologie de remodelage osseux**. *Médecine nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique* 2004, **28**(2).
40. Marie P.: **Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste**. *Médecine/science* 2001, **17**:1252-1259.
41. Wang Q, Yu X, Libera M: **Reducing bacterial colonization of 3-d nanofiber cell scaffolds by hierarchical assembly of microgels and an antimicrobial Peptide**. *Adv Healthc Mater* 2013, **2**(5):687-691.
42. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K: **Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction**. *Cell Metab* 2007, **5**(6):464-475.
43. Pajevic P: **Regulation of bone resorption and mineral homeostasis by osteocytes**. *IBMS BoneKEy* 2009, **6**(2):63-70.
44. Vaananen HK, Laitala-Leinonen T: **Osteoclast lineage and function**. *Arch Biochem Biophys* 2008, **473**(2):132-138.
45. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM: **The cell biology of osteoclast function**. *J Cell Sci* 2000, **113** (Pt 3):377-381.

46. Nesbitt S, Nesbit A, Helfrich M, Horton M: **Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6, α 7, α 8, α 9, α 10, α 11, α 12, α 13, α 14, α 15, α 16, α 17, α 18, α 19, α 20, α 21, α 22, α 23, α 24, α 25, α 26, α 27, α 28, α 29, α 30, α 31, α 32, α 33, α 34, α 35, α 36, α 37, α 38, α 39, α 40, α 41, α 42, α 43, α 44, α 45, α 46, α 47, α 48, α 49, α 50, α 51, α 52, α 53, α 54, α 55, α 56, α 57, α 58, α 59, α 60, α 61, α 62, α 63, α 64, α 65, α 66, α 67, α 68, α 69, α 70, α 71, α 72, α 73, α 74, α 75, α 76, α 77, α 78, α 79, α 80, α 81, α 82, α 83, α 84, α 85, α 86, α 87, α 88, α 89, α 90, α 91, α 92, α 93, α 94, α 95, α 96, α 97, α 98, α 99, α 100.** *J Biol Chem* 1993, **268**(22):16737-16745.
47. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R *et al*: **Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts.** *J Biol Chem* 1996, **271**(21):12511-12516.
48. Kubatzky KF, Kloos B, Hildebrand D: **Signaling cascades of Pasteurella multocida toxin in immune evasion.** *Toxins (Basel)* 2013, **5**(9):1664-1681.
49. Frost HM: **Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem.** *Anat Rec* 1990, **226**(4):403-413.
50. Hadjidakis DJ, Androulakis, II: **Bone remodeling.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1092**:385-396.
51. Coxon JP, Oades GM, Colston KW, Kirby RS: **Advances in the use of bisphosphonates in the prostate cancer setting.** *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2004, **7**(2):99-104.
52. Henderson B, Nair SP: **Hard labour: bacterial infection of the skeleton.** *Trends Microbiol* 2003, **11**(12):570-577.
53. Matsuo K, Irie N: **Osteoclast-osteoblast communication.** *Arch Biochem Biophys* 2008, **473**(2):201-209.
54. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B *et al*: **MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL.** *Cancer Cell* 2005, **7**(5):485-496.
55. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S: **Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand.** *J Biol Chem* 2006, **281**(48):36846-36855.
56. Boyce BF, Xing L: **Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling.** *Arch Biochem Biophys* 2008, **473**(2):139-146.
57. Kim HH, Lee DE, Shin JN, Lee YS, Jeon YM, Chung CH, Ni J, Kwon BS, Lee ZH: **Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase.** *FEBS Lett* 1999, **443**(3):297-302.
58. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM: **RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease.** *Trends Mol Med* 2006, **12**(1):17-25.
59. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S *et al*: **TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling.** *Genes Dev* 1999, **13**(8):1015-1024.
60. Kanazawa K, Azuma Y, Nakano H, Kudo A: **TRAF5 functions in both RANKL- and TNFalpha-induced osteoclastogenesis.** *J Bone Miner Res* 2003, **18**(3):443-450.
61. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A *et al*: **Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(7):3597-3602.
62. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D: **The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, **15**(6):457-475.
63. Dufresne A, Derbel O, Cassier P, Vaz G, Decouvlaere AV, Blay JY: **Giant-cell tumor of bone, anti-RANKL therapy.** *Bonekey Rep* 2012, **1**:149.
64. Arron JR, Choi Y: **Bone versus immune system.** *Nature* 2000, **408**(6812):535-536.
65. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K *et al*: **T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma.** *Nature* 2000, **408**(6812):600-605.
66. Zupan J, Jeras M, Marc J: **Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts.** *Biochem Med (Zagreb)* 2013, **23**(1):43-63.

67. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y: **IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, **15**(1):49-60.
68. Klosterhalfen B, Peters KM, Tons C, Hauptmann S, Klein CL, Kirkpatrick CJ: **Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis.** *J Trauma* 1996, **40**(3):372-378.
69. Evans CA, Jellis J, Hughes SP, Remick DG, Friedland JS: **Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-8 secretion and the acute-phase response in patients with bacterial and tuberculous osteomyelitis.** *J Infect Dis* 1998, **177**(6):1582-1587.
70. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Gotze C: **Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement.** *J Bone Joint Surg Br* 2007, **89**(1):94-99.
71. Garcia-Alvarez F, Navarro-Zorraquino M, Castro A, Grasa JM, Pastor C, Monzon M, Martinez A, Garcia-Alvarez I, Castillo J, Lozano R: **Effect of age on cytokine response in an experimental model of osteomyelitis.** *Biogerontology* 2009, **10**(5):649-658.
72. Yoshii T, Magara S, Miyai D, Nishimura H, Kuroki E, Furudoi S, Komori T, Ohbayashi C: **Local levels of interleukin-1beta, -4, -6 and tumor necrosis factor alpha in an experimental model of murine osteomyelitis due to staphylococcus aureus.** *Cytokine* 2002, **19**(2):59-65.
73. Pivrotto LA, Cissel DS, Keeting PE: **Sex hormones mediate interleukin-1 beta production by human osteoblastic HOBIT cells.** *Mol Cell Endocrinol* 1995, **111**(1):67-74.
74. Marriott I, Hughes FM, Jr., Bost KL: **Bacterial infection of osteoblasts induces interleukin-1beta and interleukin-18 transcription but not protein synthesis.** *J Interferon Cytokine Res* 2002, **22**(10):1049-1055.
75. Bu R, Borysenko CW, Li Y, Cao L, Sabokbar A, Blair HC: **Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts.** *Bone* 2003, **33**(5):760-770.
76. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T *et al*: **IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.** *J Immunol* 1990, **145**(10):3297-3303.
77. Mundy GR: **Inflammatory mediators and the destruction of bone.** *J Periodontal Res* 1991, **26**(3 Pt 2):213-217.
78. Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I, Hudson MC: **Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production.** *J Infect Dis* 1999, **180**(6):1912-1920.
79. Robinson DA, Enright MC: **Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(12):3926-3934.
80. Claro T, Widaa A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW: **Staphylococcus aureus protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection.** *Microbiology* 2013, **159**(Pt 1):147-154.
81. Bost KL, Bento JL, Ellington JK, Marriott I, Hudson MC: **Induction of colony-stimulating factor expression following Staphylococcus or Salmonella interaction with mouse or human osteoblasts.** *Infect Immun* 2000, **68**(9):5075-5083.
82. Bost KL, Bento JL, Petty CC, Schrum LW, Hudson MC, Marriott I: **Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with Staphylococcus aureus or Salmonella.** *J Interferon Cytokine Res* 2001, **21**(5):297-304.
83. Gasper NA, Petty CC, Schrum LW, Marriott I, Bost KL: **Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4.** *Infect Immun* 2002, **70**(8):4075-4082.
84. Marriott I, Gray DL, Rati DM, Fowler VG, Jr., Stryjewski ME, Levin LS, Hudson MC, Bost KL: **Osteoblasts produce monocyte chemoattractant protein-1 in a murine model of Staphylococcus aureus osteomyelitis and infected human bone tissue.** *Bone* 2005, **37**(4):504-512.

85. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT: **IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis.** *J Immunol* 1998, **160**(1):403-409.
86. Konig A, Muhlbauer RC, Fleisch H: **Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [3H]tetracycline excretion from prelabeled mice.** *J Bone Miner Res* 1988, **3**(6):621-627.
87. Chiang CY, Kyritsis G, Graves DT, Amar S: **Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide.** *Infect Immun* 1999, **67**(8):4231-4236.
88. Kim MS, Day CJ, Morrison NA: **MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation.** *J Biol Chem* 2005, **280**(16):16163-16169.
89. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H *et al*: **MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **383**(3):373-377.
90. Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA: **Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(6):735-742.
91. Canalis E: **Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro.** *Endocrinology* 1987, **121**(5):1596-1604.
92. Smith DD, Gowen M, Mundy GR: **Effects of interferon-gamma and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures.** *Endocrinology* 1987, **120**(6):2494-2499.
93. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E: **Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures.** *Endocrinology* 1988, **123**(3):1442-1448.
94. Nanes MS: **Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology.** *Gene* 2003, **321**:1-15.
95. Nanes MS, McKoy WM, Marx SJ: **Inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8).** *Endocrinology* 1989, **124**(1):339-345.
96. Nanes MS, Rubin J, Titus L, Hendy GN, Catherwood B: **Tumor necrosis factor-alpha inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated bone Gla protein synthesis in rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8) by a pretranslational mechanism.** *Endocrinology* 1991, **128**(5):2577-2582.
97. Li YP, Stashenko P: **Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter.** *J Immunol* 1992, **148**(3):788-794.
98. Souza PP, Lerner UH: **The role of cytokines in inflammatory bone loss.** *Immunol Invest* 2013, **42**(7):555-622.
99. O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC: **STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone.** *J Biol Chem* 1999, **274**(27):19301-19308.
100. Cassat JE, Hammer ND, Campbell JP, Benson MA, Perrien DS, Mrak LN, Smeltzer MS, Torres VJ, Skaar EP: **A secreted bacterial protease tailors the Staphylococcus aureus virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis.** *Cell Host Microbe* 2013, **13**(6):759-772.
101. Claro T, Widaa A, O'Seaghda M, Miajlovic H, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW: **Staphylococcus aureus protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis.** *PLoS One* 2011, **6**(4):e18748.

102. Jin T, Zhu YL, Li J, Shi J, He XQ, Ding J, Xu YQ: **Staphylococcal protein A, Panton-Valentine leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis.** *Cell Physiol Biochem* 2013, **32**(2):322-333.
103. Fiedler T, Salamon A, Adam S, Herzmann N, Taubenheim J, Peters K: **Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells.** *Exp Cell Res* 2013, **319**(18):2883-2892.
104. Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y: **Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation.** *J Immunol* 2002, **169**(3):1516-1523.
105. Lau YS, Wang W, Sabokbar A, Simpson H, Nair S, Henderson B, Berendt A, Athanasou NA: **Staphylococcus aureus capsular material promotes osteoclast formation.** *Injury* 2006, **37 Suppl 2**:S41-48.
106. Kim J, Yang J, Park OJ, Kang SS, Kim WS, Kurokawa K, Yun CH, Kim HH, Lee BL, Han SH: **Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation.** *J Bone Miner Res* 2013, **28**(11):2381-2391.
107. Yang J, Ryu YH, Yun CH, Han SH: **Impaired osteoclastogenesis by staphylococcal lipoteichoic acid through Toll-like receptor 2 with partial involvement of MyD88.** *J Leukoc Biol* 2009, **86**(4):823-831.
108. Wright KM, Friedland JS: **Regulation of chemokine gene expression and secretion in Staphylococcus aureus-infected osteoblasts.** *Microbes Infect* 2004, **6**(9):844-852.
109. Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, Harris M, Henderson B, Bentley G, Meghji S: **Mechanisms of internalization of Staphylococcus aureus by cultured human osteoblasts.** *Infect Immun* 1999, **67**(5):2677-2681.
110. DeLoid GM, Sulahian TH, Imrich A, Kobzik L: **Heterogeneity in macrophage phagocytosis of Staphylococcus aureus strains: high-throughput scanning cytometry-based analysis.** *PLoS One* 2009, **4**(7):e6209.
111. Agerer F, Waeckerle S, Hauck CR: **Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method.** *Journal of Microbiological Methods* 2004, **59**(1):23-32.
112. Oviedo-Boyso J, Bravo-Patino A, Cajero-Juarez M, Valdez-Alarcon JJ, Baizabal-Aguirre VM: **TNF-alpha reduces the level of Staphylococcus epidermidis internalization by bovine endothelial cells.** *FEMS Microbiol Lett* 2009, **292**(1):92-99.
113. Lammers. S, Nuijten. PJ, HE. S: **The fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells.** *FEMS microbiology letters* 1999, **180**(1):103-109.
114. Almeida RA, Oliver SP: **Interaction of coagulase-negative Staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells.** *Microbial Pathogenesis* 2001, **31**(5):205-212.
115. Anaya-Lopez JL, Contreras-Guzman OE, Carabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, Lopez-Meza JE, Valdez-Alarcon JJ, Ochoa-Zarzosa A: **Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis.** *Research in veterinary science* 2006, **81**(3):358-361.
116. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Gotz F, Peters G, Heilmann C: **A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor.** *Cell Microbiol* 2010, **12**(12):1746-1764.
117. Kintarak S, Whawell SA, Speight PM, Packer S, Nair SP: **Internalization of Staphylococcus aureus by human keratinocytes.** *Infect Immun* 2004, **72**(10):5668-5675.
118. Bosse J, Gruber H, Ramp W: **Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent , long-term osteomyelitis. A case report.** *J Bone Joint Surg* 2005, **87**(6):1343-1347.
119. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC: **Mechanisms of Staphylococcus aureus invasion of cultured osteoblasts.** *Microb Pathog* 1999, **26**(6):317-323.
120. Foster TJ, Hook M: **Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus.** *Trends Microbiol* 1998, **6**(12):484-488.

121. Wright JA, Nair SP: **Interaction of staphylococci with bone.** *Int J Med Microbiol* 2010, **300**(2-3):193-204.
122. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH: **Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1.** *Cell Microbiol* 1999, **1**(2):101-117.
123. Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP: **Staphylococcus aureus fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria.** *Infect Immun* 2001, **69**(5):2872-2877.
124. Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M: **Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells.** *Infect Immun* 2000, **68**(12):6871-6878.
125. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP: **Invasion of bone cells by Staphylococcus epidermidis.** *Microbes Infect* 2007, **9**(4):460-465.
126. Fassler R, Meyer M: **Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice.** *Genes Dev* 1995, **9**(15):1896-1908.
127. Berger TM, Hirsch E, Djonov V, Schittny JC: **Loss of beta1-integrin-deficient cells during the development of endoderm-derived epithelia.** *Anat Embryol (Berl)* 2003, **207**(4-5):283-288.
128. Schroder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M: **Live cell imaging of phagosome maturation in Staphylococcus aureus infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes.** *Med Microbiol Immunol* 2006, **195**(4):185-194.
129. Hoffmann C, Ohlsen K, Hauck CR: **Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria.** *Eur J Cell Biol* 2011, **90**(11):891-896.
130. Alexander EH, Rivera FA, Marriott I, Anguita J, Bost KL, Hudson MC: **Staphylococcus aureus - induced tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts.** *BMC Microbiol* 2003, **3**:5.
131. Alexander EH, Bento JL, Hughes FM, Jr., Marriott I, Hudson MC, Bost KL: **Staphylococcus aureus and Salmonella enterica serovar Dublin induce tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression by normal mouse and human osteoblasts.** *Infect Immun* 2001, **69**(3):1581-1586.
132. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A: **TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?** *Cancer Treat Rev* 2009, **35**(3):280-288.
133. Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, Colin DA, Monteil H, Prevost G: **Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of Staphylococcus aureus.** *FEBS Lett* 2003, **552**(1):54-60.
134. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J: **Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(30):13473-13478.
135. Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, Wang Y, Bubeck Wardenburg J: **A Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice.** *Nat Med* 2011, **17**(10):1310-1314.
136. Husmann M, Beckmann E, Boller K, Kloft N, Tenzer S, Bobkiewicz W, Neukirch C, Bayley H, Bhakdi S: **Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis.** *FEBS Lett* 2009, **583**(2):337-344.
137. Imre G, Heering J, Takeda AN, Husmann M, Thiede B, zu Heringdorf DM, Green DR, van der Goot FG, Sinha B, Dotsch V *et al*: **Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis.** *Embo J* 2012, **31**(11):2615-2628.
138. Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, Strangfeld K, Wagner B, Fischer U, Cheung AL, Peters G, Schulze-Osthoff K, Sinha B: **Multiple virulence factors are required for Staphylococcus aureus-induced apoptosis in endothelial cells.** *Cell Microbiol* 2005, **7**(8):1087-1097.

139. Montoya M, Gouaux E: **Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1609**(1):19-27.
140. Boyle-Vavra S, Daum RS: **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin.** *Lab Invest* 2007, **87**(1):3-9.
141. Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G: ***Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils.** *PLoS Pathog* 2010, **6**(1):e1000715.
142. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJ, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJ, van Kessel KP, Vandenesch F *et al*: **The staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin targets human C5a receptors.** *Cell Host Microbe* 2013, **13**(5):584-594.
143. Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, Brenner RE, Schneider M, Lambris JD, Huber-Lang M: **Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1beta.** *J Cell Biochem* 2011, **112**(9):2594-2605.
144. Konig B, Prevost G, Piemont Y, Konig W: **Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes.** *J Infect Dis* 1995, **171**(3):607-613.
145. Chi CY, Lin CC, Liao IC, Yao YC, Shen FC, Liu CC, Lin CF: **Panton-Valentine leukocidin facilitates the escape of *Staphylococcus aureus* from human keratinocyte endosomes and induces apoptosis.** *J Infect Dis* 2014, **209**(2):224-235.
146. Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM *et al*: ***Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils.** *J Clin Invest* 2005, **115**(11):3117-3127.
147. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A *et al*: **Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA.** *Nat Med* 2007, **13**(12):1510-1514.
148. Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, Fischer ER, Cheung GY, Li M, Otto M: **Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system.** *Nat Med* 2013, **19**(3):364-367.
149. Surewaard BG, Nijland R, Spaan AN, Kruijtz JA, de Haas CJ, van Strijp JA: **Inactivation of staphylococcal phenol soluble modulins by serum lipoprotein particles.** *PLoS Pathog* 2012, **8**(3):e1002606.
150. Surewaard BG, de Haas CJ, Vervoort F, Rigby KM, DeLeo FR, Otto M, van Strijp JA, Nijland R: **Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis.** *Cellular microbiology* 2013, **15**(8):1427-1437.
151. Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, Krismer B, Schrenzel J, Lalk M, Wolz C: **The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression.** *PLoS Pathog* 2012, **8**(11):e1003016.
152. Levine B, Mizushima N, Virgin HW: **Autophagy in immunity and inflammation.** *Nature* 2011, **469**(7330):323-335.
153. Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Kronke M, Krut O: ***Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death.** *J Biol Chem* 2007, **282**(4):2695-2706.
154. Mestre MB, Colombo MI: **Autophagy and toxins: a matter of life or death.** *Curr Mol Med* 2013, **13**(2):241-251.
155. Haussler S, Lehmann C, Breselge C, Rohde M, Classen M, Tummler B, Vandamme P, Steinmetz I: **Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the *Burkholderia cepacia* complex.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003, **22**(4):249-253.

156. Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, Löffler B: **Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence.** *J Infect Dis* 2010, **202**(7):1031-1040.
157. von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Gotz F: **A site-directed Staphylococcus aureus hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly.** *J Bacteriol* 1997, **179**(15):4706-4712.
158. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K *et al*: **Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection.** *EMBO Mol Med* 2011, **3**(3):129-141.
159. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L *et al*: **A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: the silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-derived macrophages.** *PLoS One* 2008, **3**(1):e1409.
160. Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G: **Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes.** *Int J Med Microbiol* 2014, **304**(2):170-176.
161. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G: **Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections.** *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**(4):295-305.
162. Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Kelley WL, Lew DP, Schrenzel J, Proctor RA, McNamara PJ, Peters G, Von Eiff C: **Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of Staphylococcus aureus expressing small colony variant phenotypes.** *Infect Immun* 2002, **70**(10):5428-5437.
163. Horst SA, Hoerr V, Beineke A, Kreis C, Tuchscher L, Kalinka J, Lehne S, Schleicher I, Kohler G, Fuchs T *et al*: **A novel mouse model of Staphylococcus aureus chronic osteomyelitis that closely mimics the human infection: an integrated view of disease pathogenesis.** *Am J Pathol* 2012, **181**(4):1206-1214.
164. Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S, Tulkens PM: **Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives.** *Curr Opin Drug Discov Devel* 2006, **9**(2):218-230.
165. Krut O, Utermohlen O, Schlossherr X, Kronke M: **Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical Staphylococcus aureus isolates.** *Infect Immun* 2003, **71**(5):2716-2723.
166. Hamza T, Li B: **Differential responses of osteoblasts and macrophages upon.** *BMC Microbiol* 2014, **14**(1):207.
167. Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE: **Frequency of alpha- and beta-haemolysin in Staphylococcus aureus of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression.** *APMIS* 1999, **107**(4):425-430.
168. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R: **Intracellular Staphylococcus aureus and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis.** *J Orthop Res* 2006, **24**(1):87-93.
169. Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, Hudson M: **Intracellular Staphylococcus aureus. A mechanism for the indolence of osteomyelitis.** *J Bone Joint Surg Br* 2003, **85**(6):918-921.
170. Lebeaux D, Ghigo JM: **[Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?].** *Med Sci (Paris)* 2012, **28**(8-9):727-739.
171. Bjarnsholt T: **The role of bacterial biofilms in chronic infections.** *APMIS Suppl* 2013(136):1-51.
172. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, GÃ¶tz F: **The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation.** *Infection and immunity* 1999, **67**(10):5427-5433.

173. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP: **Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(4):1973-1976.
174. Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach TH, Tan VY, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M: **How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(4):1281-1286.
175. Lewis K: **Persister cells, dormancy and infectious disease.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**(1):48-56.
176. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S: **Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal.** *Nat Rev Microbiol* 2012, **10**(1):39-50.
177. Davies D: **Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**(2):114-122.
178. Joo HS, Otto M: **Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens.** *Chem Biol* 2012, **19**(12):1503-1513.
179. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM: **Microbial biofilms.** *Annu Rev Microbiol* 1995, **49**:711-745.
180. Pragman AA, Schlievert PM: **Virulence regulation in Staphylococcus aureus: the need for in vivo analysis of virulence factor regulation.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004, **42**(2):147-154.
181. Hartmann T, Baronian G, Nippe N, Voss M, Schulthess B, Wolz C, Eisenbeis J, Schmidt-Hohagen K, Gaupp R, Sunderkotter C *et al*: **The catabolite control protein E (CcpE) affects virulence determinant production and pathogenesis of Staphylococcus aureus.** *J Biol Chem* 2014.
182. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR: **Peptide signaling in the staphylococci.** *Chem Rev* 2011, **111**(1):117-151.
183. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP: **Regulation of exoprotein gene expression in Staphylococcus aureus by agar.** *Mol Gen Genet* 1986, **202**(1):58-61.
184. Balaban N, Novick RP: **Autocrine regulation of toxin synthesis by Staphylococcus aureus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(5):1619-1623.
185. Ji G, Beavis R, Novick RP: **Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants.** *Science* 1997, **276**(5321):2027-2030.
186. Ji G, Beavis RC, Novick RP: **Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(26):12055-12059.
187. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J: **Virulence determinants in Staphylococcus aureus and their involvement in clinical syndromes.** *Curr Infect Dis Rep* 2005, **7**(6):420-428.
188. Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM: **Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of Staphylococcus aureus.** *J Bacteriol* 2001, **183**(4):1113-1123.
189. Lyon GJ, Novick RP: **Peptide signaling in Staphylococcus aureus and other Gram-positive bacteria.** *Peptides* 2004, **25**(9):1389-1403.
190. Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, Smeltzer MS, Hurlburt BK: **Staphylococcus aureus AgrA binding to the RNAlII-agr regulatory region.** *J Bacteriol* 2004, **186**(22):7549-7555.
191. Novick RP: **Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.** *Mol Microbiol* 2003, **48**(6):1429-1449.
192. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J, Lina G: **High genetic variability of the agr locus in Staphylococcus species.** *J Bacteriol* 2002, **184**(4):1180-1186.
193. Bayer MG, Heinrichs JH, Cheung AL: **The molecular architecture of the sar locus in Staphylococcus aureus.** *J Bacteriol* 1996, **178**(15):4563-4570.

194. Cheung AL, Bayer MG, Heinrichs JH: **sar Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the agr locus of *Staphylococcus aureus***. *J Bacteriol* 1997, **179**(12):3963-3971.
195. Heinrichs JH, Bayer MG, Cheung AL: **Characterization of the sar locus and its interaction with agr in *Staphylococcus aureus***. *J Bacteriol* 1996, **178**(2):418-423.
196. Bronner S, Monteil H, Prevost G: **Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications**. *FEMS Microbiol Rev* 2004, **28**(2):183-200.
197. Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P *et al*: **A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells**. *BMC Genomics* 2007, **8**:171.
198. Park SY, Chong YP, Park HJ, Park KH, Moon SM, Jeong JY, Kim MN, Kim SH, Lee SO, Choi SH *et al*: **agr Dysfunction and persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with removed eradicable foci**. *Infection* 2013, **41**(1):111-119.
199. Grundmeier M, Tuchscher L, Bruck M, Viemann D, Roth J, Willscher E, Becker K, Peters G, Loffler B: **Staphylococcal strains vary greatly in their ability to induce an inflammatory response in endothelial cells**. *J Infect Dis* 2010, **201**(6):871-880.
200. Lattar SM, Tuchscher LP, Caccuri RL, Centron D, Becker K, Alonso CA, Barberis C, Miranda G, Buzzola FR, von Eiff C *et al*: **Capsule expression and genotypic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic or acute osteomyelitis**. *Infect Immun* 2009, **77**(5):1968-1975.
201. Tuchscher LP, Buzzola FR, Alvarez LP, Caccuri RL, Lee JC, Sordelli DO: **Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice**. *Infect Immun* 2005, **73**(12):7932-7937.
202. Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G *et al*: **Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses**. *J Clin Microbiol* 2000, **38**(2):846-850.
203. Tuchscher L, Loffler B, Buzzola FR, Sordelli DO: ***Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression**. *Future Microbiol* 2010, **5**(12):1823-1832.
204. Riskey AL, Loughman A, Cywes-Bentley C, Foster TJ, Lee JC: **Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets**. *J Infect Dis* 2007, **196**(6):919-927.
205. Pohlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser KB, Doring G, Lee JC, Fournier JM, Botzenhart K, Wolz C: **Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase**. *Infect Immun* 2000, **68**(9):4865-4871.
206. Dassy B, Hogan T, Foster TJ, Fournier JM: **Involvement of the accessory gene regulator (agr) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus***. *J Gen Microbiol* 1993, **139 Pt 6**:1301-1306.
207. Luong T, Sau S, Gomez M, Lee JC, Lee CY: **Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide expression by agr and sarA**. *Infect Immun* 2002, **70**(2):444-450.
208. Fowler VG, Jr., Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, Stryjewski ME, Eliopoulos GM, Reller LB, Corey GR *et al*: **Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein**. *J Infect Dis* 2004, **190**(6):1140-1149.
209. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, Shardell MD, McGregor JC, Thom KA, Perencevich EN: **Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients**. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**(3):1082-1087.

210. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydiere AM, Ader F, Bes M, Lina G, Tristan A, Reverdy ME *et al*: **Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry.** *PLoS One* 2012, **7**(7):e40660.
211. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M: **Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*.** *J Infect Dis* 2000, **182**(6):1688-1693.
212. Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimaraes MA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM: **agr RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.** *Microbiology* 2008, **154**(Pt 11):3480-3490.
213. Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F: **A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells.** *Journal of microbiological methods* 2011, **86**(2):145-149.
214. Rasigade JP, Moulay A, Lhoste Y, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Laurent F, Dumitrescu O: **Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*.** *BMC Microbiol* 2011, **11**:263.
215. Anaya-Lopez JL, Contreras-Guzman OE, Carabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, Lopez-Meza JE, Valdez-Alarcon JJ, Ochoa-Zarzosa A: **Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis.** *Res Vet Sci* 2006, **81**(3):358-361.
216. Almeida RA, Oliver SP: **Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells.** *Microb Pathog* 2001, **31**(5):205-212.
217. Lankinen P, Lehtimaki K, Hakanen AJ, Roivainen A, Aro HT: **A comparative 18F-FDG PET/CT imaging of experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and *Staphylococcus epidermidis* foreign-body-associated infection in the rabbit tibia.** *EJNMMI Res* 2012, **2**(1):41.
218. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, Bubeck Wardenburg J, Schneewind O, Otto M, DeLeo FR: **Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection.** *J Infect Dis* 2011, **204**(6):937-941.
219. Qazi SN, Council E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, Winzer K, Chan WC, Williams P, Hill PJ: **agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome.** *Infect Immun* 2001, **69**(11):7074-7082.
220. Cheung GY, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Whitney AR, Teintze M, DeLeo FR, Otto M: ***Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils.** *PLoS Pathog* 2010, **6**(10):e1001133.
221. Cheung GY, Kretschmer D, Duong AC, Yeh AJ, Ho TV, Chen Y, Joo HS, Kreiswirth BN, Peschel A, Otto M: **Production of an attenuated phenol-soluble modulins unique to the MRSA clonal complex 30 increases severity of bloodstream infection.** *PLoS Pathog* 2014, **10**(8):e1004298.
222. Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, Sordelli D, Hansen U, Niemann S, Oetermann S, Peters G, Loffler B, Tuchscher L: ***Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation.** *Int J Med Microbiol* 2014.
223. Peschel A, Otto M: **Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection.** *Nat Rev Microbiol* 2013, **11**(10):667-673.
224. Tucker KA, Reilly SS, Leslie CS, Hudson MC: **Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **186**(2):151-156.
225. Clarke MS, Sundaresan A, Vanderburg CR, Banigan MG, Pellis NR: **A three-dimensional tissue culture model of bone formation utilizing rotational co-culture of human adult osteoblasts and osteoclasts.** *Acta Biomater* 2013, **9**(8):7908-7916.
226. Kasahara T, Imai S, Kojima H, Katagi M, Kimura H, Chan L, Matsusue Y: **Malfunction of bone marrow-derived osteoclasts and the delay of bone fracture healing in diabetic mice.** *Bone* 2010, **47**(3):617-625.

227. Kikuta J, Ishii M: **Intravital multiphoton microscopy for dissecting cellular dynamics in arthritic inflammation and bone destruction.** *Methods Mol Biol* 2014, **1142**:1-10.
228. Heymann D, Guicheux J, Rousselle AV: **Ultrastructural evidence in vitro of osteoclast-induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms.** *Histol Histopathol* 2001, **16**(1):37-44.
229. Springer IN, Wiltfang J, Dunsche A, Lier GC, Bartsch M, Warnke PH, Barth EL, Terheyden H, Russo PA, Czech N *et al*: **A new method of monitoring osteomyelitis.** *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007, **36**(6):527-532.

RESUME

Les infections ostéo-articulaires (IOA), principalement causées par les staphylocoques, sont des infections graves, responsables d'un taux élevé de mortalité et de morbidité suite à l'inflammation et l'importante destruction osseuse. Nous avons étudié si les interactions hôtes-pathogènes pouvaient influencer sur la présentation clinique (aiguë, chronique, ...) des IOA. Nous avons d'abord développé un modèle *in vitro* d'infection intracellulaire d'ostéoblastes humains permettant de quantifier l'adhésion, l'invasion, la survie intracellulaire des staphylocoques et les dommages subis par les cellules infectées. Grâce à ce modèle, nous avons ensuite montré que les souches de *S. aureus* (SA) communautaires résistants à la méticilline (CA-MRSA), un groupe polyphylétique de souches hypervirulentes associées à des formes aiguës et sévères d'IOA, induisent une cytotoxicité supérieure à celle des MRSA hospitaliers (HA-MRSA) associés à des IOA plus souvent chroniques. Ces résultats nous ont amenés à décrire un nouveau mécanisme de virulence des CA-MRSA basé sur l'invasion des ostéoblastes et l'activité intracellulaire d'une toxine staphylococcique, les phénol-soluble modulins (PSM). Par la suite, en utilisant une large collection de souches cliniques de SA sensibles à la méticilline (MSSA) de fond génétique très divers, et en utilisant comme seul critère de corrélation la durée d'évolution réellement observée chez les patients, nous avons obtenus les premiers résultats validant l'hypothèse du rôle de l'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes dans la chronicité des IOA. Ces travaux nous ont également permis de démontrer la corrélation entre la dysfonction d'un des principaux systèmes de régulation de la virulence chez SA, le système *agr*, et le caractère chronique des IOA. La fonctionnalité du système *agr*, qui se traduit par la sécrétion de la delta-hémolysine, est facilement détectable par spectrométrie de masse par la nouvelle technologie MALDI-TOF-MS, utilisée en laboratoire de routine pour l'identification bactérienne. Ainsi, nos résultats suggèrent que cette technique pourrait représenter la première méthode objective d'évaluation du degré de chronicité d'une IOA au moment du diagnostic, permettant ainsi d'améliorer la prise en charge initiale des patients. En parallèle, nous avons démontré que l'interaction entre SA et les ostéoclastes, seules cellules capables de résorber la matrice osseuse, était responsable de la destruction osseuse observée chez les patients atteints d'IOA par deux mécanismes complémentaires : i) SA inhibe l'ostéoclastogénèse des précurseurs myéloïdes qui se différencient alors en macrophages. Ces macrophages sécrètent une multitude de signaux pro-inflammatoires facilitant ainsi le recrutement d'ostéoclastes matures sur le site de l'infection et l'ostéoclastogénèse des précurseurs non infectés ; ii) l'infection des ostéoclastes matures par SA triple leur capacité de résorption. Ainsi nous avons démontré que les ostéoclastes jouaient un rôle central dans la destruction osseuse observée lors des IOA.

Nos travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension et l'amélioration de la prise en charge des IOA à SA.