# *UNIVERSITÉ DE STRASBOURG*

***ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***

**Virulence bactérienne précoce : fonctions cellulaires et contrôle de l'infection aiguë et subaiguë : EA 7290**

# THÈSE présentée par :

**Xavier Argemi**

Soutenue le : **15 mai 2017**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Bactériologie

## Etude de la Virulence de *Staphylococcus lugdunensis*

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **Mr HANSMANN Yves** | Professeur, Université de Strasbourg |
| **Mr RIEGEL Philippe** | Docteur, Université de Strasbourg |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **Mme SCHVOERER Evelyne** | Professeur, Université de Nancy |
| **Mr LESENS Olivier** | Professeur, Université de Clermont-Ferrand |

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

| | |
|---|---|
| **Mr MEZIANI Ferhat** | Professeur, Université de Strasbourg |
| **Mr PUECH Pierre-Henri** | Docteur, Université de Marseille |

Xavier Argemi

**EA 7290 Virulence bactérienne précoce : fonctions cellulaires et contrôle de l'infection aiguë et subaiguë**
Institut de bactériologie
3 rue Koeberlé
67000 Strasbourg

## Remerciements

Au Dr Gilles Prévost, directeur du laboratoire, qui a été présent à chaque instant, a guidé ces recherches avec patience, gentillesse, et une connaissance infaillible qui ont fait de ces années de thèse un moment riche, plaisant et stimulant.

Au Pr Yves Hansmann, qui a dirigé ce travail et m'a donné le temps nécessaire à sa réalisation, par sa présence et son soutien sans faille auprès des patients.

Au Dr Philippe Riegel, qui a co-dirigé la thèse et a su apporter au fil de ces 4 années son expérience et son savoir en bactériologie.

A Daniel Keller, ingénieur de recherche, véritable puits de science sans qui nous n'aurions jamais pu obtenir de si riches résultats et découvrir cette protéase. Daniel pour qui la chimie n'a sans doute pas beaucoup de secrets et qui, avec patience, a toujours su répondre à mes milles questions…

Au Pr Evelyne Schvoerer et au Pr Olivier Lesens, mes rapporteurs, qui ont accepté de prendre le temps de juger ce travail et venir de loin pour cela.

Au Pr Ferhat Meziani et au Pr Pierre-Henri Puech, qui ont accepté de faire parti de ce jury de thèse et examiner le fruit de ces 4 années de recherche.

A mes collègues du laboratoire, Gaëlle et Elodie, brillantes thésardes et véritables compagnons de route. A Chimène qui nous apporté le soleil du Bénin et Xieng Liu pour sa bonne humeur et son délicieux thé noir fleur de lotus. A Gaëlle, Fatima, Kevin, les étudiants de Master qui auront, le temps d'un beau diplôme, aidé à la réalisation de ces travaux.

A Nico, Nawal, Marion et Cécile, mes collègues cliniciens avec qui j'ai la chance et le bonheur de travailler, passer du temps, et qui sont avant tout des amis chers.

A mes copains de Marseille auxquels je pense tous les jours Alex, Del, Guigui, Alex2, Marion, Vincent, PHP, Sandrine, Pilou, Nico et Roberto Malone.

A mes parents géniaux, dont le soutien sans faille et l'intelligence me permettent d'avancer, encore et toujours.

A mes frères et sœurs, Nico, Sof et Manu et mes innombrables neveux, nièces que j'adore et Jeanne pour ses corrections.

A la femme la plus merveilleuse du monde, ma muse et mon amie, Clara.

## Table des matières


**I. Introduction ..... 11**
A. Taxonomie des staphylocoques et découverte de *Staphylococcus lugdunensis* ..... 13
B. Etudes cliniques des infections à *S. lugdunensis* ..... 15
*1. Infections de la peau et des tissus mous ..... 15*
*2. Bactériémies et endocardites ..... 15*
*3. Infections ostéo-articulaires ..... 16*
*4. Autres infections ..... 16*
*5. Flore cutanée ..... 17*
C. Virulence des staphylocoques ..... 17
*1. Virulence de Staphylococcus aureus ..... 18*
*2. Virulence des staphylocoques à coagulase négative ..... 23*
*3. Facteurs de virulence de Staphylococcus lugdunensis ..... 26*
D. Caractéristiques microbiologiques de *Staphylococcus lugdunensis* ..... 27
*1. Caractéristiques générales ..... 27*
*2. Identification par méthodes phénotypiques ..... 29*
*3. Identification par amplification génique ..... 30*
*4. Identification par spectrométrie de masse ..... 31*
*5. Sensibilité aux antibiotiques ..... 31*
E. Autres applications microbiologiques de la spectrométrie de masse ..... 31
*1. Recherche de facteurs de virulence ..... 32*
*2. Typage bactérien ..... 32*
F. Caractéristiques génétiques de *Staphylococcus lugdunensis* ..... 33
*1. Séquençages complets ..... 33*
*2. Séquençage de gènes cibles ..... 35*
G. Les éléments génétiques mobiles ..... 36
*1. Mode de transferts de l'information génétique ..... 36*
*2. Unités de transferts de l'information génétique ..... 40*
H. Synthèse et objectifs du travail de thèse ..... 51

**II. Matériels et méthodes ..... 53**
A. Etudes préliminaires ..... 55
*1. Epidémiologie des staphylocoques aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg ..... 55*
*2. Etude rétrospective de la pathogénicité de Staphylococcus lugdunensis ..... 57*
B. Etude prospective de la virulence de *Staphylococcus lugdunensis* dans les infections sévères : étude VISLISI ..... 60
*1. Design de l'étude ..... 60*
*2. Méthodologie statistique ..... 66*
*3. Mise en place de l'étude ..... 67*
C. Analyses bactériologiques ..... 68
*1. Identification des souches bactériennes ..... 68*
*2. Tests de sensibilité aux antibiotiques ..... 68*
*3. Analyse des profils en spectrométrie de masse ..... 68*
D. Recherche de facteurs de virulence ..... 76
*1. Recherche d'un facteur d'adhésion au fibrinogène ..... 76*
*2. Recherche d'une béta hémolysine ..... 78*
*3. Tests d'hémolyse sur globule rouge humain et de lapin ..... 79*

*4. Tests de leucotoxicité ..... 80*
*5. Recherche de leucotoxines et toxines superantigéniques par Dot Blot et Western Blot 81*
*6. Recherche d'une activité protéolytique ..... 83*
E. Identification d'une nouvelle protéase ..... 84
*1. Purification de la protéase ..... 84*
*2. Séquençage peptidique de la protéase ..... 87*
*3. Séquençage du gène codant pour la protéase ..... 89*
*4. Recherche du gène codant pour la protéase sur l'ensemble des souches de S. lugdunensis ..... 89*
*5. Etude de la séquence nucléotidique du gène de la protéase ..... 90*
F. Séquençage de novo et analyse des génomes ..... 91
*1. Séquençage de nouvelle génération ..... 91*
*2. Séquençage Illumina ..... 94*
*3. Choix d'une méthode de séquençage pour Staphylococcus lugdunensis ..... 96*
*4. Extraction de l'ADN ..... 97*
*5. Assemblage des génomes ..... 97*

**III. Publication des résultats ..... 109**

A. Article 1 : L'utilisation de la spectrométrie de masse en routine dans les laboratoires de microbiologie améliore l'identification des staphylocoques à coagulase négative et met en évidence la pathogénicité de *S. lugdunensis* ..... 111
*B.* Article 2 : Etude rétrospective du rôle pathologique de *Staphylococcus lugdunensis* ..... 113
C. Article 3 : Identification d'une métalloprotéase comme potentiel facteur de virulence de *Staphylococcus lugdunensis* dans l'étude clinique prospective VISLISI ..... 115
*1. Inclusions dans l'étude VISLISI ..... 117*
*2. Analyse des profils spectrométriques souches de S. lugdunensis ..... 118*
*3. Recherche d'une activité hémolytique et leucotoxique ..... 119*
*4. Recherche de leucotoxicité ..... 120*
*5. Recherche de leucotoxines et superantigènes par Dot Blot et Western Blot ..... 120*
*6. Etude des propriétés biochimiques de la lugdulysine ..... 120*
*7. Analyses complémentaires du gène codant pour la lugdulysine ..... 121*
D. Article 4 : Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus lugdunensis*, une analyse complémentaire de l'étude clinique VISLISI ..... 129
E. Article 5 : Infection chronique de prothèse articulaire secondaire à la transformation de *Staphylococcus lugdunensis* en variant à petites colonies ..... 131
F. Article 6 : Séquençage complet de 7 souches de *S. lugdunensis* et mise en évidence d'éléments génétiques mobiles ..... 133
*1. Analyses qualitatives des séquençages Illumina ..... 135*
*2. Alignement des assemblages ..... 138*
*3. Représentation des plasmides ..... 139*

**IV. Discussion ..... 141**

A. Synthèse des résultats et des perspectives de travail ..... 143
B. *Staphylococcus lugdunensis* et infections ostéo articulaires ..... 144
*1. Rôle de la lugdulysine et des facteurs d'adhésion ..... 144*
*2. Diabète, biofilm et infections ostéo-articulaires ..... 144*

*3. Infections chroniques et variant à petites colonies ..... 145*
*4. Perspectives ..... 146*
C. Eléments génétiques mobiles de *Staphylococcus lugdunensis* ..... 147
*1. Génome accessoire de Staphylococcus lugdunensis ..... 147*
*2. Biofilms et transferts génétiques horizontaux ..... 147*
*3. Perspectives ..... 148*
D. Application de la spectrométrie de masse à l'étude de la virulence bactérienne ... 148
*1. Spectrométrie de masse et analyse hiérarchique ..... 148*
*2. Spectrométrie de masse et analyse de facteurs de virulence ..... 149*
*3. Perspectives ..... 149*

**V. Conclusions ..... 151**

**VI. Synthèse des publications, posters et présentations ..... 155**
A. Articles ..... 157
B. Présentations orales ..... 157
*1. Congrès régionaux ..... 157*
*2. Congrès nationaux ..... 158*
C. Posters ..... 158
*1. Congrès nationaux ..... 158*
*2. Congrès internationaux ..... 158*

**VII. Annexes ..... 159**

**Index des Figures ..... 171**

**Index des Tables ..... 172**

**Références bibliographiques ..... 173**

## Liste des abréviations

α-HCCA : acide α-4-cyano-hydroxy-cinnamique

ADNe : ADN extracellulaire

BET : Bromure d'éthidium

BHI : Milieu cœur cervelle, brain heart infusion

BSA : Albumine sérique bovine, bovin serum albumin

CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II

EMCM : European Microbiology Criteria for Interpretation

eV : Electrons-volts

Gb : Giga-bases

h : heures

HUS : Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

IC : Intervalle de Confiance

IGV : Integrative Genome Viewer (logiciel)

INRA : Institut National de Recherches Agronomiques

kb : Kilo-bases

kV : Kilo-volts

M : Molaire

Mb : Million de bases

min : Minutes

mM : Millimolaire

MLST : Multi Locus Sequence Typing

MSP : Main Spectra Projection

OR : Odd ratio

pb : Paire de bases

PBS : Tampon phsophate salin, phosphate buffered saline

PCA : Analyse en composant principaux, principal component analysis

PNAG : Poly-N-acetylglucosamine

PRCIs : Ilots chromosomiques en relation avec un phage, Phage-Related Chromosomal Islands

SCN : Staphylocoques à coagulase négative

SCV : Variant à petites colonies, small colony variant

TBE : Tris, borate, EDTA

TFA : Acide tri-fluoro-acétique

# I. Introduction

## A. Taxonomie des staphylocoques et découverte de *Staphylococcus lugdunensis*

Les staphylocoques sont des organismes unicellulaires appartenant au phylum des *Firmicutes* et à la famille des *Staphylococcaceae* qui comprend le genre *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* est l'espèce de staphylocoque la plus étudiée, car elle constitue un des principaux agents infectieux en pathologie humaine. Il existe néanmoins de nombreuses autres espèces, souvent commensales chez l'homme mais aussi chez l'animal, dont le rôle pathogène est apparu avec les progrès de la médecine. Les thérapeutiques invasives et immunosuppressives ont donné l'occasion à ces autres espèces de staphylocoques d'exprimer tout leur potentiel de virulence comme *S. epidermidis* [1]. On distingue classiquement *S. aureus* des autres staphylocoques par la production d'une coagulase, une protéine se fixant à la prothrombine, l'activant ainsi puis capable de transformer le fibrinogène en fibrine et de coaguler le plasma sanguin. On oppose donc à cette espèce les staphylocoques à coagulase négative (SCN). La coagulase a été décrite il y a plus de 50 ans chez *S. aureus* avec l'identification de 2 activités distinctes qui correspondent en fait à la présence de protéines différentes [2]. Une coagulase libre (CoA) qui est une protéine sécrétée par la bactérie se liant au fibrinogène et qui active la cascade de la coagulation par l'activation directe de la prothrombine [3]. Une coagulase liée qui correspond à deux protéines liées à la membrane plasmique (ClfA et ClfB) se liant directement au fibrinogène et responsables de l'agrégation plaquettaire. La capacité de ces 2 protéines à agréger les bactéries en présence de fibrinogène leur a donné le nom de clumping factor. S'il s'agit des 2 facteurs d'adhésion historiques au fibrinogène mais nous savons maintenant que de nombreuses protéines produites par *S. aureus* peuvent se fixer au fibrinogène et que cela constitue un médiateur central de sa virulence [4][5][6][7].

Dans le même temps, l'intérêt croissant des microbiologistes et des cliniciens pour les SCN a permis l'identification de nombreuses nouvelles espèces depuis 3 décennies et certaines présentent des caractéristiques assez inattendues comme la production d'une coagulase, remettant en cause la dichotomie classique : *S. aureus* (coagulase positive) et SCN [8]. D'une manière générale, l'identification de nouvelles espèces de staphylocoque a longtemps reposé sur leurs caractéristiques biochimiques, c'est à dire sur leur équipement enzymatique. C'est dans ce contexte que Jean Freney et ses collaborateurs ont travaillé dans les années 80 sur la mise au point de galeries d'identification biochimique des staphylocoques et découvert deux nouvelles espèces de SCN : *Staphylococcus lugdunensis* et *Staphylococcus schlieferi* [9]. Les auteurs ont pu montrer que ces 2 staphylocoques possédaient une caractéristique tout à fait particulière : la production d'un clumping factor. Depuis, les microbiologistes ont montré que d'autres SCN étaient capables de produire un clumping factor comme *Staphylococcus sciuri* ainsi que plusieurs SCN issus du monde animal pouvaient produire une coagulase libre : *Staphylococcus intermedius* (chien), *Staphylococcus hyicus* (porc), *Staphylococcus delphini* (dauphin) et *Staphylococcus lutrae* (loutre) [8]. Ces nouvelles données, mais surtout l'utilisation de l'information contenue dans les génomes bactériens (gènes ménagers, ARNr 16S, séquences de génomes complètes) ont bouleversé la taxonomie des staphylocoques. Ryan Lampers et ses collaborateurs ont récemment proposé une classification basée à la fois sur des critères phylogénétiques en utilisant les séquences de différents gènes (gène codant pour l'ARNr 16S et les gènes *dnaJ, rpoB, tuf*) et sur des

critères biochimiques connus comme la coagulase libre, une approche particulièrement intéressante chez les procaryotes [10][11]. Dans une revue complète de la littérature sur les SCN, Karsten Becker et ses collaborateurs donnent une traduction synthétique de ces nouvelles données et des principaux paramètres phénotypiques permettant de caractériser les staphylocoques (Tableau 1) [8].

**Tableau 1.** Classification des staphylocoques sur la base des relations phylogénétiques établies entre plusieurs loci (gène codant pour l'ARNr 16S, dnaJ, rpoB, tuf). (Reproduit et traduit de Karsten Becker et coll., 2014).

| Oxydase | **Négative** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Novobiocine | **Sensible** | | | | | | |
| Coagulase | **Négative** | **Positive[1]-variable[2]-négative[3]** | | | **Négative** | | |
| Groupe | **Hyicus-Intermedius** | | | **Epidermidis-Aureus** | | | |
| Cluster | **Muscae** | **Hyicus** | **Intermedius** | **Aureus** | **Epidermidis** | **Warneri** | **Haemolyticus** |
| Espèce | *S. muscae*<br>*S. microti*<br>*S. rostri* | *S. hyicus*[2]<br>*S. agnetis*[2]<br>*S. chromogenes*[3]<br>*S. felis*[3] | *S. intermedius*[1]<br>*S. delphini*[1]<br>*S. lutrae*[1]<br>*S. pseudointer-medius*[1]<br>*S. schleidefri*<br>*ssp. schleiferi*[3]<br>*ssp. coagulans*[1] | *S. aureus*<br>*ssp. aureus*[1]<br>*ssp. anaerobius*[1]<br>*S. simiae*[1] | *S. epidermidis*<br>*S. capitis*<br>*ssp. capitis*<br>*ssp. urealyiticus*<br>*S. caprae*<br>*S. saccharolyticus* | *S. warneri*<br>*S. pasteuri* | *S. haemolyticus*<br>*S. devriesei*<br>*S. hominis*<br>*ssp hominis*<br>*ssp. novobios-epticus*<br>*S. jettensis*<br>*S. petrasii*<br>*ssp. croceilyt-icus*<br>*ssp. petrasii* |

| Oxydase | **Négative** | | | | | | **Positive** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Novobiocine | **Sensible** | | | | **Résistant** | | |
| Coagulase | **Négative** | | | | | | |
| Groupe | Lugdunensis | Auricularis | Simulans | Saprophyticus | | | Sciuri |
| Cluster | Lugdunensis | Auricularis | Simulans-Carnosus | Pettenkoferi-Massiliensis | Saprophyticus | Cohnii-Nepalensis | |
| Espèce | *S. lugdunensis* | *S. auricularis* | *S. simulans*<br>*S. carnosus*<br>*ssp. carnosus*<br>*ssp. utilis*<br>*S. condimenti*<br>*S. piscifermen-tans* | *S. pettenkoferi*<br>*S. massiliensis* | *S. saprophyticus*<br>*ssp. saprophy-ticyus*<br>*ssp. Bovis*<br>*S. equorum*<br>*ssp. equorum*<br>*ssp. linens*<br>*S. gallinarum*<br>*S. succinus*<br>*ssp. succinus*<br>*ssp. casei*<br>*S. xylosus* | *S. cohnii*<br>*ssp. cohnii*<br>*ssp. urealy-ticus*<br>*S. nepalensis* | *S. sciuri*<br>*ssp. Sciuri*<br>*ssp. carnaticus*<br>*ssp.rodentium*<br>*S. fleuretii*<br>*S. lentus*<br>*S. stepanovicii*<br>*S. vitulinus* |

[1] Positive, présence d'une coagulase libre
[2] Variable, présence d'une coagulase libre variable selon les souches
[3] Négative, absence de coagulase libre

## B. Etudes cliniques des infections à *S. lugdunensis*

L'identification des SCN dans les prélèvements médicaux a complètement bouleversé la perception des cliniciens, des microbiologistes et des chercheurs en général sur la notion de pathogénicité et la virulence. *S. epidermidis* est le SCN le plus souvent impliqué en pathologie humaine, mais *S. lugdunensis* apparaît au fil des études cliniques et microbiologiques comme un SCN particulièrement virulent.

Pour les besoins de ce travail, nous avons effectué une revue complète de la littérature de toutes les séries cliniques de patients ayant présenté une infection à *S. lugdunensis*. Nous avons exclu les cas cliniques isolés du tableau de synthèse de ces études, mais leur lecture est parfois pertinente. On retrouve ainsi la description de plusieurs patients ayant présenté un état de choc dans le cadre d'une bactériémie, plusieurs endocardites compliquées localement ou bien d'emboles septiques et des infections nécrosantes au niveau de la peau ou des sinus [12][13][14][15][16][17][18].

Les séries cliniques répertoriées sont détaillées dans le Tableau annexe 1 (paragraphe VII). On observe que les premières publications ont surtout décrit des patients présentant des infections de la peau et des tissus mous avant de voir apparaître les premières séries colligeant des infections plus graves comme des bactériémies, des endocardites ou des infections ostéo-articulaires. Ces études sont toutes rétrospectives et s'étendent jusqu'à 2016 sachant que ce travail de thèse a été débuté en 2013 et qu'entre 2013 et 2016, 8 études cliniques ont été publiées sur les 27 séries cliniques que nous rapportons depuis 2002.

### 1. Infections de la peau et des tissus mous

On relève 668 cas rapportés dans la littérature, toutes études confondues. Ce type d'infection est initialement apparu comme le plus fréquent en particulier suite à la publication d'une série importante de 491 patients présentant une infection à *S. lugdunensis* dont 413 infections de la peau et des tissus mous par Sidsel Bocher et ses collaborateurs [19]. Cette étude a eu le mérite d'alerter les cliniciens à propos de ce pathogène qui fut ensuite considéré comme émergent mais elle soufre d'importants biais méthodologiques, en particulier de l'absence de critères de significativité microbiologiques et de critères cliniques stricts permettant d'écarter les prélèvements simplement contaminés ou colonisés. On peut donc penser que le nombre de cas rapporté a été supérieur aux cas réels. On observe par contre que l'ensemble des souches testées étaient sensibles à l'oxacilline, ce qui est très inhabituel pour un SCN. On observe enfin que plusieurs séries font état de la fréquence des abcès chez ces patients, une donnée tout à fait importante quand on envisage la production de possibles facteurs de virulence [20][21].

### 2. Bactériémies et endocardites

Nous avons identifié 88 cas d'endocardites et 163 bactériémies à *S. lugdunensis*, ces pathologies n'étant pas exclusives. En effet certaines séries seulement permettent de déterminer la fréquence des endocardites au sein d'une cohorte de patients ayant une bactériémie et elle se situe entre 25 et 50% [22][23][24]. Po-Yen Liu et ses collaborateurs ont effectué une revue complète de la littérature de tous les cas

d'endocardites recensés dans la littérature et montrés que sur 67 endocardites 45% étaient sans porte d'entrée identifiée, 80% sur valve native, 87% concernaient le cœur gauche, 69% avaient nécessité une intervention chirurgicale et enfin la mortalité globale était de 39% [25]. Ce taux de létalité tout à fait inquiétant doit être interprété avec précautions compte tenu du type d'analyse (revue de la littérature basée sur des études rétrospectives). Plus récemment, Marwa A Sabe a rapporté un taux de guérison de 100% dans une étude rétrospective de 15 cas ayant nécessité une prise en charge chirurgicale dans 40% des cas [15]. Néanmoins, d'une manière générale la fréquence des endocardites paraît tout à fait exceptionnelle pour un SCN. La mortalité des endocardites à *S. aureus* est habituellement proche de 20% et le recours à la chirurgie nécessaire dans 26% des cas [26][27]. Concernant l'ensemble des SCN, la mortalité décrite est en général proche de 12% et le recours à la chirurgie nécessaire dans 12% des cas [28][8]. Il ne faut pas sous-estimer le biais de recrutement majeur que peut représenter l'analyse de séries de cas rétrospectifs et de cas isolés, mais ces observations restent inhabituelles. Concernant les bactériémies isolées, on peut signaler les résultats de l'étude de Jung-Fu Lin et de ses collaborateurs qui ont recueilli le cas de 48 patients ayant présenté une infection à *S. lugdunensis* dont 41 bactériémies avec un taux de mortalité de 21% sans en décrire les causes et sachant que 44% de ces bactériémies n'avaient pas de porte d'entrée [29].

### 3. Infections ostéo-articulaires

Nous avons identifié 93 patients dans l'ensemble des séries cliniques publiées. La première cohorte d'importance a été décrite par Neel B. Shah et ses collaborateurs [30]. Les auteurs rapportent le cas de 28 patients dont 25 présentaient une infection de prothèse totale du genou. Une étude plus récente de Julien Lourtet-Hascoet et de ses collaborateurs a comparé le cas de 28 patients présentant une infection ostéo-articulaire à *S. lugdunensis* à celui de patients présentant une infection à *S. aureus* (n=30) et *S. epidermidis* (n=30) [31]. Les auteurs montrent que plus de 90% des infections à *S. lugdunensis* surviennent sur prothèse articulaire et le plus souvent au niveau du genou (57%), mais aussi que ces infections sont significativement plus inflammatoires que les infections à *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Le taux de guérison dans cette série est de 89%.

### 4. Autres infections

Les séries cliniques que nous avons détaillées dans le Tableau annexe 1 décrivent d'autres types d'infections et en particulier des infections urinaires et pulmonaires. Mais il faut parcourir les différents cas cliniques publiés pour observer la description d'infections sinusiennes, neuro-méningées ou ophtalmologiques qui confirment le tropisme large de cet agent infectieux comme cela est décrit avec tous les staphylocoques [32][33][34][35].

On retient à la lecture de ces articles plusieurs éléments concordants :

**- Toutes ces études sont rétrospectives avec des biais de recrutements parfois majeurs.**

**- Les infections de la peau et des tissus mous sont les plus fréquemment décrites.**

**- Les endocardites et les infections ostéo-articulaires sont apparues plus récemment dans la littérature et constituent le deuxième type d'infections les plus fréquentes.**

**- La létalité des endocardites est importante ainsi que le taux de recours à la chirurgie.**

**- Cette bactérie ne pose pas de problème de résistance aux antibiotiques.**

### 5. Flore cutanée

Plusieurs études permettent de déterminer les lieux de portage de *S. lugdunensis* qui est un agent commensal de la peau au même titre que les membres du groupe *S. epidermidis*-like (Tableau 1). Le travail prospectif de Léna Bieber et de ses collaborateurs en Suède (étude n°1 dans le Tableau 2) est le plus fiable méthodologiquement et montre que 66.7% des 75 volontaires sains inclus dans l'étude sont porteurs de *S. lugdunensis* principalement au niveau de l'aine (32%) et au niveau axillaire (20%).

**Tableau 2.** Etudes sur la colonisation à *S. lugdunensis*.

| | R[1] | Portage total | Zones de portage | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Aine | Axillaire | Périnée | Nez | Orteils |
| **Etude 1, n=75** | [36] | 66.7% | 32% | 20% | 14.7% | 9.3% | 5.3% |
| **Etude 2, n=140** | [37] | 22% | 22% | - | - | - | - |
| **Etude 3, n=252** | [38] | 51.6% | 39.3% | 19.8% | | 17.9% | |

[1] R, référence

## C. Virulence des staphylocoques

Le terme de virulence clinique est souvent utilisé par excès pour décrire la sévérité des tableaux cliniques induits par un agent infectieux. La virulence au sens microbiologique fait plutôt référence à l'existence d'une substance, le plus souvent protéique, produite par un agent infectieux et responsable d'un tableau clinique qui lui est directement imputable ou qui y participe. Ce tableau clinique peut être sévère, comme par exemple dans le choc toxique staphylococcique induit par la toxine TSST-1 de *S. aureus* ou plus bénin comme la furonculose récidivante induite par la leucocidine de Panton Valentine produite par *S. aureus* [39]. Enfin, une même toxine peut être responsable de tableaux

cliniques variables qui sont fonctions du site infecté, de l'état du patient (notamment immunitaire) et de la quantité de toxine produite, comme la leucocidine de Panton Valentine qui est aussi responsable de pneumopathies nécrosantes extrêmement sévères [39].

La corrélation directe entre un tableau clinique particulier et la production d'une toxine bactérienne est finalement rare si l'on considère l'ensemble des infections bactériennes mais particulièrement instructif sur le plan physiopathologique et cela peut surtout constituer le point de départ de thérapeutiques anti-toxiniques ciblées [40]. *S. aureus* constitue à cet égard un modèle d'étude. La variété, la gravité et la fréquence des infections à *S. aureus* ont permis l'identification de protéines impliquées dans sa pathogénicité, directement ou indirectement, constituant à proprement parler des facteurs de virulence.

## 1. Virulence de *Staphylococcus aureus*

Plusieurs revues de la littérature extrêmement complètes ont été consacrées à la virulence de *S. aureus* sur laquelle nous ne reviendrons pas en détail [27,41–43]. Cette bactérie possède le plus large éventail de facteurs dits de virulence dont l'imputabilité clinique chez l'homme n'est pas toujours parfaitement démontrée, mais possible au regard des substances considérées, de leur effet *in vitro* et sur des modèles animaux. Il est cependant important de noter qu'une majorité d'entre eux ciblent les éléments de l'immunité innée qui préparent ou contribuent à l'immunité adaptative.

On distingue schématiquement 3 catégories de facteurs en fonction de leur localisation et participant à la pathogénicité de *S. aureus* : les protéines sécrétées telles que les toxines (cytotoxines et toxines superantigéniques) et les exoenzymes (protéases, lipases entre autres), les protéines d'adhésion liées à la paroi bactérienne (facteurs d'adhésion au fibrinogène et à la fibronectine par exemple), les protéines cytoplasmiques comme les protéines impliquées dans la synthèse de la capsule bactérienne. Ces facteurs de virulence sont étroitement coordonnés au niveau transcriptionnel par plusieurs systèmes de régulation habituellement constitués de 2 composants et situés au niveau de plusieurs loci : *agr, saeRS, srrAB, lytRS* et *arlRS* [44]. Ces systèmes ont pour fonction de percevoir les conditions environnementales et de stimuler ou inhiber la production de certains facteurs de virulence.

### *a)* Le locus *agr*, un système de régulation

Le locus *agr* est probablement le plus étudié et le mieux connu des systèmes de régulation. Il régule positivement l'expression de toxines sécrétées comme les hémolysines α et β, les leucotoxines ou TSST-1, mais réprime la transcription de protéines d'adhésion comme la protéine A, la coagulase ou la protéine d'adhésion au fibrinogène. Plusieurs dizaines de gènes sont directement régulés par ce locus qui contrôle aussi des fonctions métaboliques et de transport ce qui lui confère au final une activité pléiotropique [45][46]. Son expression est cinétique au cours de la croissance bactérienne, il est inhibé au début de la phase de croissance bactérienne où les bactéries expriment des facteurs d'adhésion leur permettant de s'établir au niveau d'un tissu par exemple. L'inoculum bactérien augmentant la concentration des métabolites signaux, les

gènes du locus s'activent pendant la phase de croissance exponentielle permettant la synthèse de facteurs comme les cytotoxines pour fournir les éléments nutritifs nécessaires aux bactéries, mais aussi en inhibant la transcription des facteurs d'adhésion pour permettre aux bactéries de se mobiliser et d'essaimer. Le locus *agr* est constitué de 5 gènes : *agrA, agrC, agrD, agrB* et *hld* sous le contrôle de 2 promoteurs indépendants : P2 et P3. Lors de la phase exponentielle de croissance bactérienne le gène *agrD* code pour une protéine AgrD qui est maturée et exportée par la protéine AgrB ce qui génère un oligopeptide activateur dans le milieu extracellulaire. Ce peptide s'accumule progressivement jusqu'à atteindre un seuil quantitatif qui est directement fonction de la densité cellulaire bactérienne et qui permet sa fixation à un récepteur transmembranaire, AgrC. Cette protéine change alors de conformation et entraine la phosphorylation intra cytoplasmique de AgrA dont la conformation permet alors d'activer le promoteur P2 (boucle d'auto d'auto-activation) mais aussi le promoteur P3 qui aboutit à la transcription du gène hld et la synthèse d'un ARN de 514 nucléotides, l'ARNIII. Il s'agit de l'effecteur final du système de régulation qui active la transcription de gènes codants pour diverses toxines (hémolysines et toxines superantigéniques entre autres). Il peut aussi coder en tant qu'ARN messager pour une protéine, la δ-hémolysine, une cytotoxine sans relation avec les capacités régulatrices de son ARN codant. Ce mécanisme global de régulation de la virulence en fonction de la population bactérienne est appelé détection du quorum ou quorum sensing [47]. Ces éléments sont résumés dans la Figure 1 [40].

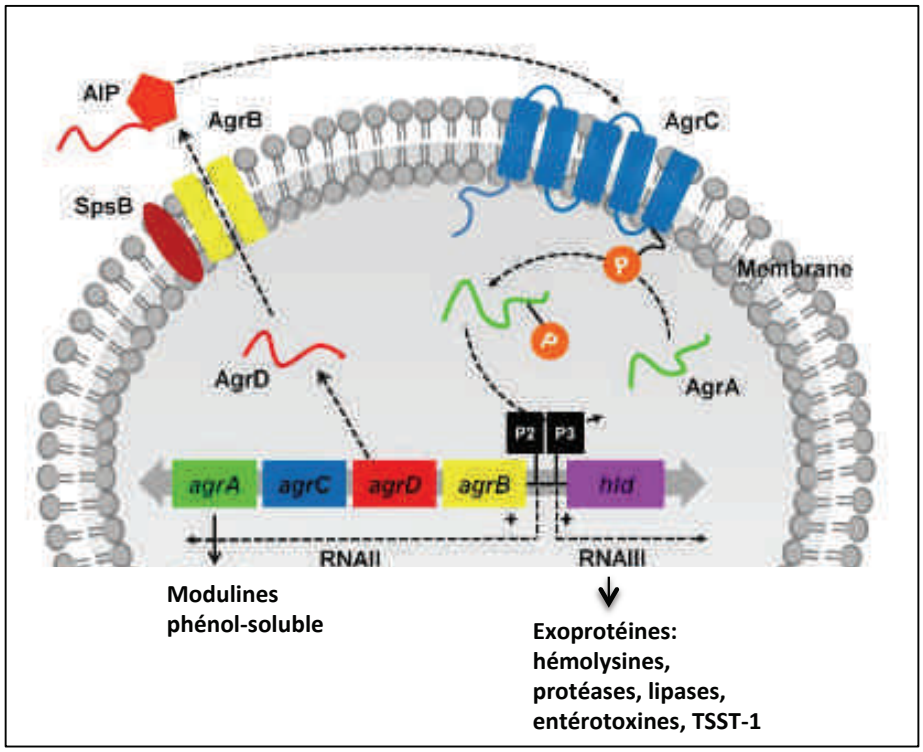



**Figure 1.** Régulation de la production de facteurs de virulence par le locus *agr.* (Reproduit et traduit de Kong C et coll., 2016).

### b) Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*

Nous ne détaillerons pas l'ensemble des protéines de virulence potentielle décrites chez *S. aureus* dans le cadre de ce travail. Plusieurs revues de la littérature y sont consacrées et le centre national de référence a référencé 185 gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques qui peuvent être recherchés à la demande [48][42,49,50][51][52]. Un lien de causalité directe entre ces facteurs de virulence et une manifestation clinique humaine est souvent difficile à établir et a pu être décrit dans quelques situations. Plusieurs revues de la littérature font état des relations entre ces toxines, modèles *in vitro*, animaliers et en pathologie humaine en particulier au niveau cutané où les interactions sont les plus nombreuses [42,53,54][52].

**Leucocidine de Panton Valentine :** il s'agit d'une protéine composée de 2 sous unités : LukS-PV et LukF-PV. Les gènes, contigus, codant ces protéines sont portés par un bactériophage qui n'est retrouvé que chez 1 à 2% des souches, en France et en Europe. Cette protéine présente une activité lytique *in vitro* limitée aux globules blancs : monocytes, macrophages, polynucléaires et métamyélocytes. Elle est directement impliquée dans la survenue d'infections cutanées abcédées récidivantes mais aussi de pneumonies nécrosantes et d'infections ostéo-articulaires. La corrélation entre les pneumopathies et cette toxine a fait l'objet de débats dans la littérature, certaines études produisant des résultats discordants. Cependant, l'usage de modèles expérimentaux de souris humanisées pour le récepteur de la leucocidine rejoint la majorité des observations établissant un lien de causalité directe en particulier chez les patients jeunes, immunocompétents et infectés par des souches communautaires sensibles à la méticilline [42,55,56][57].

**TSST-1 et entérotoxines :** il s'agit de toxines superantigéniques ayant un rôle central dans un tableau clinique d'une extrême gravité : le choc toxique staphylococcique, qui peut survenir spécifiquement au cours des cycles menstruels (choc toxique menstruel) ou à partir de plaies contaminées. Ces protéines sécrétées se fixent sur la partie externe du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (HLa-Dr) et du récepteur des lymphocytes T (TCR et sa partie hypervariable Vβ) dont elles induisent une activation massive et non contrôlée aboutissant à la production de médiateurs inflammatoires en grande quantité responsables de cet état de choc (médiateurs vasodilatateurs entre autres). Des formes cliniques de moindre gravité sont aussi la manifestation directe de ces toxines comme la scarlatine staphylococcique liée à TSST-1 ou les intoxications alimentaires liées aux entérotoxines [52].

Il existe de nombreux autres facteurs de virulence dont le rôle clinique est suggéré par leur action *in vitro* et sur des modèles animaux [42,51].

La résistance bactérienne qui est un autre mode de virulence est aussi directement en cause dans la problématique clinique que posent les infections à *S. aureus*, en particulier les souches résistantes à la méticilline qui el sont à la quasi totalité des β-lactamines. Nous avons cité dans le Tableau 3 quelques uns des facteurs de virulence de *S. aureus* et leurs principales cibles moléculaires et cellulaires [42,49,51].

**Tableau 3.** Synthèse des principaux facteurs de virulence de *S. aureus* et de leurs cibles principales.

| Facteurs de virulences | Cible principales | R[1] |
|---|---|---|
| **Cytotoxines formant des pores** | | [58] [59] |
| **α-hémolysine** | Lyse des globules rouges<br>Lyse des lymphocytes<br>Lyse des polynucléaires neutrophiles | |
| **δ-hémolysine** | Lyse des globules rouges<br>Lyse des polynucléaires neutrophiles | |
| **γ-hémolysine**<br>(HlgA + HlgB) | Lyse des polynucléaires neutrophiles<br>Lyse des monocytes macrophages<br>Lyse des lymphocytes T | |
| **LukSF-PV**<br>(LukS-PV + LukF-PV)<br>(Leucocidine de Panton Valentine) | Lyse des polynucléaires neutrophiles<br>Lyse des monocytes macrophages | |
| **LukED**<br>(LukS-E et LukF-D) | Lyse des monocytes macrophages<br>Lyse des polynucléaires neutrophiles<br>Lyse des cellules dendritiques | |
| **HlgCB**<br>(HlgC + HlgB) | Lyse des monocytes macrophages<br>Lyse des polynucléaires neutrophiles<br>Lyse de certains neuronnes | |
| **LukAB**<br>(LukS-A + LukF-B)<br>(LukHG) | Lyse des polynucléaires neutrophiles<br>Lyse des monocytes macrophages<br>Lyse des cellules dendritiques | |
| **LukMF'**<br>(LukM-PV + LukF'-PV like) | Lyse des polynucléaires neutrophiles<br>Lyse des monocytes macrophages | |
| **LukPQ** | Lyse des polynucléaires neutrophiles | |
| | | |
| **Cytotoxines ne formant pas de pores** | | [42] |
| **β-hémolysine** | Lyse des monocytes macrophages<br>Lyse des globules rouges | |
| | | |
| **Protéines d'adhésion**<br>**Liées de manière covalente à la paroi bactérienne** | | [51] |
| **MSCRAMMs** | | |
| **ClfA** (Clumping factor A) | Adhésion au fibrinogène | |
| **ClfB**(Clumping factor B) | Adhésion au fibrinogène | |
| **FnBPA** | Adhésion à la fibronectine | |
| **FnBPB** | Adhésion à la fibronectine | |
| **Vwb** | Adhésion au facteur de von Willebrand | |
| **Cna** | Adhésion au collagène | |
| **Protéines porteuses d'un NEAT** | | |
| **IsdA-B-C-H** | Protéines de capture du fer | |

| | | |
|---|---|---|
| (Iron surface determinant) | Adhésion à a la matrice extracellulaire | |
| **Protéine en faisceau à 3 hélices** | | |
| **Protéine A** | Adhésion au domaine Fc des immunoglobulines<br>Facteur d'adhésion au facteur de von Willebrand | |
| **Protéines à motif G5 répété** | | |
| **AdsA** | Inhibition de la fonction oxydative (pas de propriétés d'adhésion) | |
| **SasX** | Inconnu | |
| **SraP** | Adhésion à la glycoprotéine 340 (gp340)<br>Adhésion aux plaquettes | |
| **SasB-D-F-J-K-L** | Inconnu | |
| **Bap** | Adhésion à la glycoprotéine 96 (gp96) | |
| | | |
| **Toxines superantigénique** | | [52] |
| **TSST-1** | | |
| **SEA à SEE, SEG à SEO, SEQ, SER, SET, SEU** | | |
| | | |
| **Toxines protéolytiques** | | [49] |
| **SspA**<br>(Protéase V8) | Sérine protéase, clive certaines liaisons peptidiques | |
| **ETA-B-D**<br>(Epidermolysines) | Protéases, clivent certaines liaisons peptidiques | |
| **Aur**<br>(Auréolysine) | Métalloprotéase | |
| | | |
| **Echappement du système immunitaire** | | [49]<br>[60] |
| **CHIPS** | Inhibiteur du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles | |
| **SCIN** | Inhibition du complément | |
| **Efb** | Inhibition du complément | |
| **Ecb** | Inhibition du complément | |
| **Eap, EapH1, EapH2** | Inhibiteurs des sérines protéases produites par les polynucléaires neutrophiles | |
| **Staphylokinase** | Inhibition de l'action des peptides antimicrobiens dans le phagosome | |
| **SSL-7** | Inhibition du complément | |

[1] R, références

## 2. Virulence des staphylocoques à coagulase négative

En dehors de *S. lugdunensis*, d'autres SCN sont aussi particulièrement pathogène dans les études cliniques : *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. Il s'agit principalement d'infections nosocomiales, sur matériels bien différentes des infections « toxiniques » à *S. aureus* décrites ci-dessus. Néanmoins, la fréquence et la gravité des infections induites par ces SCN et en particulier *S. epidermidis* à permis l'identification de plusieurs facteurs contribuant probablement à sa virulence. Plusieurs revues de la littérature ont été consacrées à ce sujet et notamment à *S. epidermidis* et les éléments rapportés dans les paragraphes ci-dessous s'y réfèrent [1,8,61,62].

### a) Facteurs d'adhésion et production de biofilm

Il s'agit du principal médiateur de la pathogénicité des SCN, en particulier de *S. epidermidis*, le plus souvent responsable d'infections sur matériel dans un contexte nosocomial : infections sur cathéter vasculaire, sur prothèse vasculaire ou prothèse articulaire. Le biofilm est un agglomérat bactérien au sein d'une structure habituellement polysaccharidique (poly-N-acetylglucosamine) mais parfois protéique, riche en ADN extracellulaire (ADNe) et en nutriments. Cette matrice constitue un espace privilégié de survivance bactérienne où la pénétration des antibiotiques est extrêmement difficile. Les bactéries peuvent s'attacher directement aux matériaux implantés ou à la matrice extracellulaire qui les entoure avant de produire les éléments qui constitueront un biofilm entourant ce matériel. On distingue 3 catégories de facteurs d'adhésion :

- **Protéines non covalentes :** ce sont des protéines fixées de manière non covalent au peptidoglycane. Les autolysines représentent la principale famille protéique et notamment la protéine AtlE de *S. epidermidis*. Ce facteur d'adhésion à la vitronectine est responsable de la production du biofilm et du relargage d'ADNe qui est indispensable à la persistance du biofilm. On peut aussi citer la protéine ClpP qui est nécessaire à la production du biofilm et dont la régulation dépend directement d'un locus *agr* identifié chez *S. epidermidis* et dont le rôle est similaire à celui décrit chez *S. aureus*. D'autres facteurs d'adhésion ont été décrits dans cette famille chez *S. epidermidis* comme Aae, une autolysine ayant des propriétés d'adhésion au fibrinogène, à la fibronectine et la vitronectine ; Embp, une protéine géante de 1100 kDa qui se lie à la fibronectine et permet aussi d'établir des liaisons intercellulaires bactériennes.

**- Protéines covalentes :** il s'agit d'une vaste famille de protéines se liant à la matrice extra cellulaire et attachées au peptidoglycane de manière covalente ou Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs). Ces protéines s'ancrent au peptidoglycane par l'intermédiaire d'une enzyme, la sortase A, localisée sur la membrane plasmique et qui créait une liaison covalente entre une thréonine et le peptidoglycane au niveau d'un motif particulier : LPXTG (Leucine-Proline-X-Thréonine-Glycine où X est un acide aminé quelconque). Ces motifs sont relativement simples à identifier au niveau de la séquence codante et *S. epidermidis* en contient plus d'une dizaine. La protéine la mieux caractérisée est Fbe ou facteur d'adhésion au fibrinogène qui est proche du clumping factor A de *S. aureus*. Les protéines de la famille Sdr ayant un motif sérine-aspartate répété, se lient au collagène

et sont nombreuses chez *S. epidermidis* : SdrF, SdrG, SdrH. SesC est une autre protéine de liaison au fibrinogène décrite chez quasiment toutes les souches de *S. epidermidis*. Bap est une protéine permettant aux souches de *S. aureus* d'adhérer aux surfaces inertes et plusieurs homologues ont pu être mis en évidence chez *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. cohnii*. Enfin, Aap est une protéine d'adhésion intercellulaire décrite chez *S. epidermidis*.

**- Acides téichoïques :** ce sont des polymères de glycérol présents en grand nombre chez les bactéries à gram positif et qui s'enchâssent profondément dans la membrane plasmique, ainsi que dans le peptidoglycane. Ils sont directement impliqués dans l'attachement de la bactérie à la fibronectine.

Ces facteurs d'adhésion permettent donc aux bactéries de s'établir au niveau du secteur extracellulaire et sur des matériaux. De manière concomitante les bactéries peuvent collaborer à l'établissement du biofilm dont la composition est le plus souvent polysaccharidique, mais le biofilm peut aussi comprendre des éléments protéiques qui constituent des facteurs d'adhésion à part entière.

**- Biofilm polysaccharidique :** il s'agit d'un glucosaminoglycane, le poly-N-acteylglucosamine (PNAG) encore appelé adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA). Ce composé dont la charge globale est positive se lie par interactions électrostatiques aux charges négatives portées par les acides téichoïques de la paroi bactérienne. La synthèse de PNAG est sous la dépendance d'un opéron, *icaADBC*, qui est présent chez de nombreux SCN dont *S. epidermidis* et *S. lugdunensis*.

**- Biofilm protéique :** l'accumulation de biofilm est aussi sous la dépendance de facteurs protéiques comme les protéines Bap, Bhp et Aap qui constituent des facteurs d'adhésion aux surfaces inertes (Bap, Bhp) et entre les cellules bactériennes (Aap). Ces facteurs protéiques jouent aussi probablement un rôle dans la synthèse d'un biofilm riche en polysaccharides dont les mécanismes restent à préciser.

**- Détachement du biofilm :** la lyse du biofilm est une étape fondamentale dans la pathogénie bactérienne, car elle permet aux bactéries de se détacher de cet agglomérat et d'essaimer dans l'organisme. Cela passe par l'intervention d'hydrolases (digestion du PNAG), de protéases (digestion des liaisons protéiques) et de nucléases (digestion de l'ADNe), mais aussi de modulines phénol-solubles. GluSE (aussi appelée Esp ou SspA) est une sérine protéase décrite chez *S. epidermidis* qui présente une activité protéolytique. Cette protéine peut directement cliver le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, mais elle peut aussi dégrader les protéines d'adhésion intercellulaire comme FnBPA, FnBPB, Eap et Emp. Plusieurs autres protéases décrites chez *S. epidermidis* sont aussi impliquées dans la dégradation des protéines d'adhésion : SepA (métalloprotéase), Ecp (cystéine protéase) et Eip. Il n'y a pas d'hydrolases décrites chez *S. epidermidis*. Les nucléases dont le rôle est évident dans la lyse du biofilm de *S. aureus* (protéine Nuc) ont probablement une fonction similaire dans le détachement du biofilm en particulier chez *S. epidermidis* qui produit une nucléase, la DNAse I, dont le rôle est probablement plus marqué au sein de biofilms protéiques. Les modulines phénol-solubles sont de petits peptides de 20 à 45 acides aminés produits par de nombreux SCN dont *S. epidermidis* chez qui on distingue à ce jour 7 peptides distincts. Ils existent aussi chez *S. aureus* chez qui leur synthèse est dépendante du locus *agr* (Figure 1). Le

mécanisme d'action de ces peptides amphipathiques n'est pas parfaitement connu mais semble passer par une action de surfactant conduisant à la dispersion du biofilm.

### b) Echappement au système immunitaire

Les SCN peuvent être internalisés par plusieurs cellules n'appartenant pas aux cellules phagocytaires professionnelles et échappant de fait à leur vigilance. C'est le cas par exemple des ostéoclastes et de *S. epidermidis*. Cette persistance intra-cellulaire passe aussi par l'apparition d'une forme métabolique particulière que sont les variants à petites colonies ou small colony variant (SCV). Ces bactéries ont un métabolisme extrêmement ralenti et sont de taille réduite. En culture cet aspect est très caractéristique sur une boite de Pétri où elles forment de petites colonies souvent blanches qui peuvent mettre plusieurs jours à apparaître et requérir certaines conditions de croissance particulière comme la présence de $CO_2$ dans l'atmosphère. Elles échappent alors complètement aux défenses immunitaires et constituent un facteur démontré d'infections persistantes en particulier ostéo-articulaires [63,64].

Le biofilm constitue une véritable barrière physique qui empêche les cellules phagocytaires comme les macrophages d'accéder aux bactéries et déclencher la réponse immunitaire. Plusieurs protéases peuvent aussi dégrader certains médiateurs immunitaires. La protéine Esp est une sérine protéase produite par *S. epidermidis* qui dégrade la fraction C5 du complément. SepA est une métalloprotéase produite par *S. epidermidis* qui peut cliver les peptides antimicrobiens. Les modulines phénol-solubles ont aussi un rôle de stimulateurs du système immunitaire. Elles stimulent la voie NF-κβ chez les macrophages et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires, stimulent la dégranulation des polynucléaires neutrophiles et inhibent leur apoptose. Leur production est étroitement contrôlée par le locus *agr*.

### c) Production de toxines

Les SCN d'une manière générale expriment peu de facteurs de toxines par rapport à *S. aureus*.

**- Toxines cytolytiques :** les modulines phénol-solubles comme chez *S. aureus* possèdent des capacités de lyse des polynucléaires neutrophiles et des érythrocytes, en particulier la PSMγ produite par *S. epidermidis* qui frome des pores dans la membrane de ces cellules. Elle est impliquée dans la colite nécrosante des nouveau-nés et constitue un facteur de virulence au sens clinique du terme, ce qui est exceptionnel chez les SCN.

**- Toxines superantigéniques :** la production d'entérotoxines par *S. epidermidis* a fait l'objet de plusieurs articles parfois contradictoires. Il existe maintenant plusieurs publications convergentes permettant de confirmer la présence de gènes SE-like mais aussi la production d'entérotoxines. Certains de ces gènes ont pu être identifiés sur un îlot de pathogénicité : un variant de *SEC* et *SE-like toxin L*. Il n'y a néanmoins pas de corrélation clinique formelle comme cela est démontré chez *S. aureus*.

**- Production de bactériocines ou lantibiotiques :** ce sont des peptides appartenant au groupe des peptides antimicrobiens [65]. On considère classiquement leurs fonctions

anti microbiennes mais leur activité sur l'écosystème notamment cutané est en fait à l'origine de modifications écologiques permettant à *S. epidermidis* de s'établir durablement au sein d'une véritable niche et contribuent en fait à sa pathogénicité. *S. epidermidis* produit ainsi plusieurs peptides largement décrits dans la littérature : épidermine, Pep5, épilancine K7, épidermicine N101 et l'épicidine 280.

**- Régulation de la pathogénicité :** plusieurs systèmes de régulation sont décrits chez *S. epidermidis* : le système *agr* déjà décrit chez *S. aureus*, le système *luxS*/AI-2, le locus *sar* et d'autres systèmes de régulation moins bien décrits. Ces loci permettent de créer un système de détection du quorum qui adapte et coordonne la réponse d'un ensemble de bactéries aux conditions environnementales et internes. Le locus *agr* a été identifié chez d'autres espèces de SCN comme *S. intermedius*, *S. warneri* mais aussi *S. lugdunensis*. Les mécanismes d'action et de régulation sont beaucoup moins connus que chez *S. aureus*, même chez *S. epidermidis* avec des résultats parfois contradictoires. D'une manière générale chez *S. epidermidis* il semble que ce locus garde une fonction d'inhibition de la production de facteurs d'adhésion et stimule la production de facteurs de destruction du biofilm (protéases, nucléases, lipases) dans la phase de croissance exponentielle bactérienne et cette régulation passe aussi par l'ARNIII.

### 3. Facteurs de virulence de *Staphylococcus lugdunensis*

Contrairement à *S. aureus* il n'existe pas de lien direct entre un facteur de virulence éventuel et un tableau clinique particulier chez *S. lugdunensis*. Pourtant, de nombreuses études ont montré la présence de facteurs de virulences potentiels souvent proches de ceux connus et étudiés chez *S. aureus* avec qui *S. lugdunensis* partage plus de 70% de son génome [66]. Nous avons réalisé une analyse complète de la littérature à la recherche de tous les facteurs de virulence potentiels et noté leur niveau d'identification : génétique, protéique, fonctionnel. Il en résulte un listing important de facteurs de virulence potentiels que l'on peut inclure dans plusieurs catégories fonctionnelles, tout en gardant à l'esprit que certains de ces facteurs n'ont jamais été identifié sur le plan fonctionnel ou protéique mais uniquement sur la base d'homologies de séquences de gènes :

**Facteurs d'adhésion :** Fbl (adhésion au fibrinogène), *vWf* (adhésion au facteur de von Willebrand), *fbpA, sls* (adhésion au fibrinogène), sortase A (protéine d'attachement membranaire),

**Cytotoxines :** δ-like-hémolysine (SLUSH-A SLUSH-B et SLUSH-C), *streptolysine-S-like toxine* (toxine formant des pores)

**Superantigènes :** *EntE, EntG, EntH, EntI*.

**Résistance aux antibiotiques :** β-lactamase

**Régulation de la virulence :** *agr,* RNAIII,

**Biofilm et peptidoglycane :** *icaADBC* (opéron de synthèse du biofilm), atlL (système de renouvellement du peptidoglycane)

**Transport membranaire et métabolisme du fer :** Isd (système de captation du fer), *sst* (système d'internalisation du fer), *esx* (système de transport trans membranaire)

Ces résultats sont détaillés dans le Tableau annexe 2 (paragraphe VII).

Cette étude de la littérature révèle la quantité de facteurs de virulence potentiels décrits chez *S. lugdunensis*. Il faut néanmoins remarquer que peu de facteurs sont décrits à plusieurs niveaux.

On retient de manière synthétique à la lecture de tous ces articles quelques caractéristiques centrales de *S. lugdunensis* :

**- Les propriétés d'adhésion à la matrice extra cellulaire et la sécrétion d'une protéine d'adhésion au fibrinogène**

**- L'existence d'une hémolysine proche de la δ-hémolysine de *S. aureus* mais indépendante du locus *agr* et l'ARNIII.**

**- Un système de transport du fer complexe et très proche de celui de *S. aureus*.**

**- La sécrétion d'un biofilm principalement protéique.**

Il n'y a néanmoins aucune corrélation démontrée avec les manifestations cliniques que nous avons décrites plus haut et dont la gravité interpelle les cliniciens.

## D. Caractéristiques microbiologiques de *Staphylococcus lugdunensis*

L'identification de *S. lugdunensis* a d'abord posé quelques problèmes aux microbiologistes, car certaines souches expriment un facteur d'adhésion au fibrinogène lié (Clumping factor) qui servait historiquement à distinguer *S. aureus* des autres SCN (en association avec la recherche d'une coagulase libre qui a la propriété de coaguler le plasma par la conversion du fibrinogène en fibrine et qui n'est au contraire pas produite par *S. lugdunensis*). Cette problématique a donné lieu à de nombreuses publications faisant état d'erreurs d'identification de *S. lugdunensis* mais aussi des autres SCN porteurs de Clumping factor comme *S. sciuri et S. schlieferi* et de ceux coagulant le plasma comme S*. intermedius*, *S. hyicus, S. delphini* et *S. lutrae*. Ce constat a ouvert le champ d'autres méthodes d'identification comme les méthodes génétiques basées par exemple sur l'ARN ou encore la spectrométrie de masse, basée sur le protéome et qui constitue aujourd'hui la méthode de choix en routine.

### 1. Caractéristiques générales

*S. lugdunensis* est un staphylocoque qui ne présente pas de conditions de cultures particulièrement exigeantes. Il pousse facilement sur milieu gélosé contenant 5% de sang de mouton ou de cheval et forme des colonies blanchâtres, crémeuses, brillantes, régulières et poussant en 18 à 24h en milieu aérobie sans enrichissement en $CO_2$ nécessaire. Rarement, les cultures montrent la présence de variant qui peuvent présenter certaines exigences de culture. Les variants à petites colonies (Small Colony Variant, SCV) correspondent à des souches de *S. lugdunensis* dont le métabolisme est différent de souches dites normales et qui présentent une taille d'environ 1/10$^{ème}$ des colonies habituelles. Le métabolisme est globalement ralenti pour des bactéries qui se

logeront plutôt dans le milieu intracellulaire [63,67]. Le temps de culture de ces variants est prolongé, de 48 à 72h et peut requérir un milieu enrichi en $C0_2$ (jusqu'à 10%). Un autre type de variant est dit rugueux (Rough Colony Variant) et correspond à des bactéries dont le peptidoglycane est altéré et que l'on retrouve surtout chez les bactéries à Gram négatif mais certains staphylocoques présentent cette caractéristique sans que les conséquences pathologiques soient connues contrairement aux variants à petites colonies qui sont impliqués dans les infections ostéoarticulaires. Les variant rugueux poussent dans les mêmes conditions que les souches sauvages mais présentent un aspect de colonies fines, craquelées, à bords irréguliers. La figure 2 représente ces 3 aspects chez *S. lugdunensis* (souches et clichés EA7290).

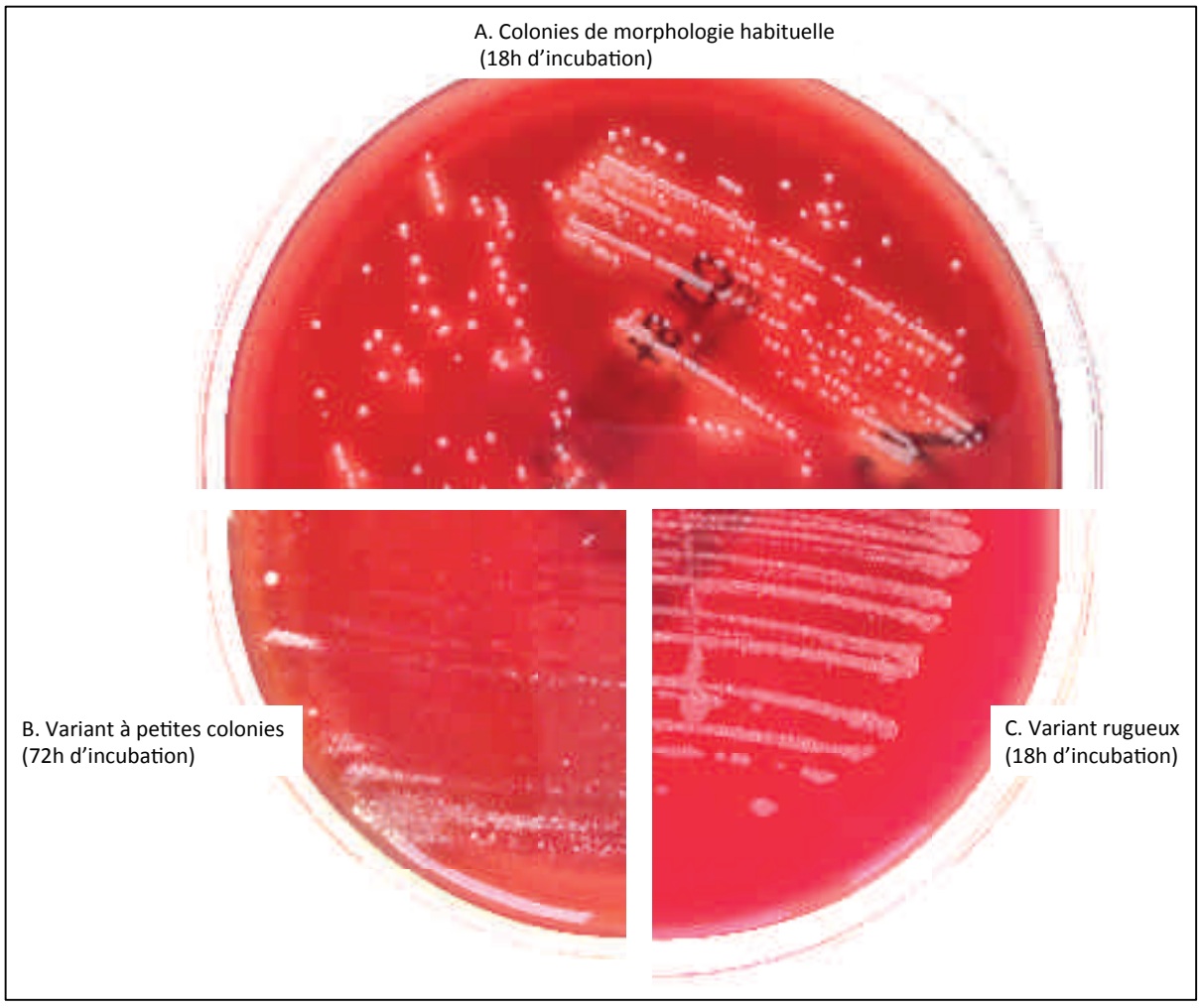



**Figure 2.** Aspects culturaux de *S. lugdunensis* sur gélose au sang de mouton : colonies sauvages (Panel A), variant à petites colonies (Panel B), variant rugueux (Panel C).

Certains prélèvements cliniques nécessitent une étape transitoire avant de pouvoir isoler la bactérie sur un milieu gélosé. Concernant les matériaux la majorité des laboratoires hospitaliers universitaires utilisent désormais les ultrasons pour décrocher

les bactéries souvent enchâssées dans un biofilm résistant et les disperser dans un milieu liquide permettant secondairement d'inoculer des milieux de culture standard. C'est la sonication, une technique particulièrement utile pour l'analyse des matériaux prothétiques articulaires [68]. Concernant les milieux liquides comme les liquides articulaires certains laboratoires inoculent les bactéries dans des flacons d'hémocultures pédiatriques qui permettent de sensibiliser la détection de faibles inoculum bactériens [69].

## 2. Identification par méthodes phénotypiques

*S. lugdunensis* est une bactérie prenant la coloration de gram avec un aspect de cocci violets foncés au microscope optique. Les espèces de SCN ne sont pas différentiables à ce stade. Les galeries d'identification biochimiques ont connu un essor majeur ces 20 dernières années et sont encore utilisées dans les laboratoires. Certaines sont spécifiquement dédiées à l'identification des bactéries à gram positif comme les staphylocoques, par exemple la galerie Vitek-GP (bioMérieux). Le principe est d'identifier l'équipement enzymatique de la bactérie présente en testant ses capacités de transformation de différents substrats. Cette méthodologie constitue un moyen assez simple et efficace pour identifier la majorité des espèces de SCN, car la plupart se différencient nécessairement par une ou plusieurs enzymes. *S. lugdunensis* est une bactérie catalase positive qui se distingue des autres SCN par la présence d'une pyrrolidonyl arylamidase et d'une ornithine décarboxylase. A cela s'ajoute l'aspect général de la colonie mais aussi la recherche d'une coagulase libre et d'un Clumping factor. Ces différentes caractéristiques permettent d'identifier correctement la grande majorité des staphylocoques (Tableau 4).

Cette méthode d'identification n'est pas fiable à 100% et même si les galeries les plus récentes ont amélioré la performance globale le pourcentage d'identification juste reste inférieur à 100%, variant le plus souvent de 70 à 90%. Les SCN les plus fréquents sont généralement bien identifiés comme *S. epidermidis, S. haemolyticus* ou *S. saprophyticus,* mais d'autres SCN posent plus de problèmes comme *S. lugdunensis, S. hominis* et *S. warneri.* Pourtant, leur importance grandissante en pathologie humaine a fait de leur identification un enjeu majeur dans les laboratoires de microbiologie. Les méthodes génétiques ont constitué la première méthode de référence avant l'utilisation de la spectrométrie de masse dans les laboratoires de diagnostic.

**Tableau 4.** Caractéristiques phénotypiques et biochimiques des staphylocoques. (Adapté de Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol 4).

| Espèces[1] | Pigmentation des colonies[2] | Coagulase | Clumping factor[2] | Nucléases résistantes à la chaleur | Phosphatase alcaline | Pyrrolidonile arylamidase[2] | Ornithine décarboxylase | Uréase[2] | β-galactosidase[2] | Production d'acétoine | Résistance à la novobiocine[2] | Résistance à la polymixine B[2] | D-Tréhalose | D-Mannitol | D-Mannose | D-Turanose | D-Xylose | D-Cellobiose | Maltose | Sucrose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***S. aureus ssp. aureus*** | + | + | + | + | + | - | - | D | - | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + |
| ***S. lugdunensis*** | D | - | (+) | - | - | + | + | D | - | + | - | D | + | - | + | (D) | - | - | + | + |
| ***S. epidermidis*** | - | - | - | - | + | - | (D) | + | - | + | - | + | - | - | (+) | (D) | - | - | + | + |
| ***S. haemolyticus*** | D | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | + | D | - | (D) | - | - | + | + |
| ***S. hyicus (vétérinaire)*** | - | D | - | + | + | - | - | D | - | - | - | + | + | - | + | | - | - | - | + |
| ***S. intermedius (vétérinaire)*** | - | + | (D) | + | + | + | - | | + | - | - | - | + | (D) | + | D | - | - | ± | + |
| ***S. pseudointermedius (vétérinaire)*** | - | + | - | ? | +[3] | + | ? | + | + | + | - | + | + | ± | + | ± | - | - | + | + |
| ***S. schleiferi ssp. schleiferi*** | - | - | + | + | + | + | - | - | (+) | + | - | - | D | - | + | - | - | - | - | - |
| ***S. saprophyticus ssp. saprophyticus*** | D | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | D | - | + | - | - | + | + |

[1] Signification des symboles : +, au moins 90% des souches sont positives ; ±, au moins 90% des souches sont faiblement positives ; -, au moins 90% des souches sont négatives ; D, 11 à 98% des souches sont positives ; ?, non déterminé.
[2] Les paramètres du test sont propres aux différentes galeries commercialisées.
[3] Le résultat est positif avec la galerie STAPH-ZYM mais négatif avec la galerie STAPH-API.

### 3. Identification par amplification génique

Le principe est de pouvoir différencier les espèces de SCN par l'analyse de la séquence nucléotidique de gènes très conservés entre les espèces comme : *gyrA* (gyrase), *gap* glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase), *sodA* (superoxyde dismutase), *rpoB* (ARN polymérase sous unité B), *tuf* (facteur d'élongation), *hsp60* (protéine de choc thermique); et/ou de deux ARN ribosomaux : l'ARN 16S, l'ARN 23S et leur région intergénique (code généralement pour des ARNt). Le séquençage de *rpoB* et de l'ARN16S sont probablement les deux approches les plus répandues et sont disponibles sous la forme de kits commercialisés. Ces tests moléculaires restent relativement chers et lourds à mettre en place au niveau du laboratoire en comparaison des tests phénotypiques entièrement automatisés. Plusieurs cibles ont été utilisées avec succès pour l'identification de *S. lugdunensis* : ARN16S et la région intergénique entre l'ARN 16S et l'ARN 23S, les gènes *hsp60, sodA* et *rpoB* [71]. Ces méthodes constituent un véritable gold standard, plus fiable que les tests phénotypiques, car le taux d'erreurs est quasi nul

et le seul moyen de corriger les rares erreurs est un séquençage complet des souches qui ne relève pas, pour le moment, du diagnostic de routine [72,73].

### 4. Identification par spectrométrie de masse

Les méthodes spectrométriques basées sur l'analyse du protéome bactérien ont révolutionné le quotidien des laboratoires mais aussi l'identification des SCN. Alors que les méthodes d'amplification et de séquençage n'ont jamais pu devenir des méthodes de routine véritablement compte tenu de leur coût et des difficultés de mise en place, la spectrométrie de masse a remplacé en 10 ans les autres méthodes d'identification dans les laboratoires hospitaliers. Ces dernières restent utilisées mais de manière complémentaire notamment en cas d'échecs avec l'identification spectrométrique ce qui est rare. Par ailleurs les méthodes d'amplification génique fournissent surtout d'autres informations que l'analyse protéomique ne donne pas (recherche de gènes de résistance, de virulence, analyses de clonalités). La méthodologie de la spectrométrie de masse est décrite dans le paragraphe II. C. 3. a. L'application de la spectrométrie de masse à l'identification des SCN permet l'identification de la quasi-totalité des espèces de SCN et la découverte de nouvelles espèces. *S. lugdunensis* est une espèce parfaitement identifiée par cet outil qui est devenu le « gold standard » compte tenu de sa fiabilité. Plusieurs études ont démontré sa non infériorité par rapport aux analyses géniques et sa supériorité par rapport aux méthodes phénotypiques [73].

### 5. Sensibilité aux antibiotiques

Contrairement aux autres SCN et à *S. aureus*, *S. lugdunensis* est resté remarquablement sensible à la quasi-totalité des antibiotiques. Certaines études montrent des résultats discordants dans le Tableau annexe 1 mais elles ne reflètent probablement pas la réalité qui se dégage des autres publications. La fosfomycine est le seul antibiotique qui montre une sensibilité très variable avec des niveaux de résistance pouvant dépasser 50% des souches selon les études, une résistance habituellement due à l'acquisition par ces souches du gène *fusB* [74]. La production d'une β-lactamase est fréquemment rapportée dans les publications mais sa fréquence réelle est difficile à établir et varie de 0 à 75% des souches (Tableau 1). Cette β-lactamase confère une résistance à la pénicilline comme cela est le cas avec la quasi-totalité des staphylocoques et ne constitue donc pas une caractéristique particulièrement étonnante. Cette enzyme est en fait une pénicillinase de bas niveau qui n'impacte en rien la sensibilité à l'oxacilline et donc à l'ensemble des autres β-lactamines. La recherche du gène *mecA* à l'origine d'une résistance étendue aux β-lactamines et dont la fréquence pose de lourds problèmes thérapeutiques chez *S. aureus*, est presque toujours négative chez *S. lugdunensis* (Tableau annexe 1). En comparaison, la résistance de *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* à l'oxacilline, et donc à l'ensemble des β-lactamines, est beaucoup plus fréquente et concerne 80 à 100% des souches en fonction des études [8].

## E. Autres applications microbiologiques de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse qui est utilisée en routine pour le diagnostic d'espèce bactérienne est apparue dans certaines publications comme un outil permettant

l'identification de facteurs de virulence chez *S. aureus* et comme un outil de classification des espèces ou clustering.

### 1. Recherche de facteurs de virulence

La spectrométrie de masse a été proposée principalement pour l'identification de 2 facteurs de virulence chez *S. aureus* : la leucocidine de Panton Valentine et la δ-hémolysine, une observation particulièrement intéressante dans la mesure ou *S. lugdunensis* est producteur d'une δ-like hémolysine [75].

**- Leucocidine de Panton Valentine :** cette leucocidine est faite de 2 sous unités LukS-PV de 32 kDa et LukF-PV de 35 kDa. Fadi Bittar et ses collaborateurs ont publié en 2009 une étude spectrométrique montrant que la présence d'un pic à 4448 *m/z* sur un spectre de masse de *S. aureus* permettait d'identifier la présence de cette leucocidine avec une sensibilité de 100% [76]. Les auteurs ne précisaient pas quel peptide pouvait correspondre à ce pic probablement pas lié à la protéine elle-même compte tenu de son poids moléculaire. Néanmoins, cette publication a soulevé de grands espoirs compte tenu de la facilité de cette méthode par rapport aux méthodes d'amplification génique qui ne permettent pas de s'assurer que le gène présent soit transcrit et traduit ou aux méthodes d'identification directe de la protéine qui sont difficiles à mettre en place en routine. Malheureusement, 2 équipes ont ensuite infirmé ces résultats en montrant que ce pic spectrométrique était sans lien avec la présence ou pas d'une leucocidine de Panton Valentine [77,78].

**- δ-hémolysine :** cette hémolysine est traduite à partir de l'ARNIII issu du gène *hld* et son poids moléculaire est de 3 kDa. La δ-hémolysine présente l'avantage d'être aussi le reflet de la présence d'un locus *agr* fonctionnel. Julie Gagnaire et ses collaborateurs ont les premiers montré que sa détection était possible en spectrométrie de masse avec la détection d'un pic de *m/z* attendue à 3000 [79]. La relation entre *m/z* et masse moléculaire est directe et détaillée dans le paragraphe II. C. 3. a. Florent Valour et ses collaborateurs ont ensuite appliqué avec succès cette méthode pour caractériser le rôle de la δ-hémolysine dans un modèle d'infection ostéo-articulaire [80].

### 2. Typage bactérien

Les hôpitaux doivent parfois faire face à des épidémies liées à la transmission d'une souche bactérienne particulière. La relation clonale existante entre des souches d'une même espèce mais recueillies chez patients différents doit alors être prouvée. Les méthodes d'amplification géniques basées par exemple sur les gènes ménagers sont les plus éprouvées comme nous l'avons vu par exemple avec l'utilisation du Multi Locus Sequence Typing de *S. lugdunensis*. Certains auteurs ont proposé d'utiliser les tracés obtenus en spectrométrie de masse pour définir les relations existantes entre un panel de souches bactériennes. Cette idée repose sur l'hypothèse que 2 souches bactériennes génétiquement identiques (par exemple transmises d'un patient à un autre dans le cadre d'une épidémie) aient aussi le même protéome. On imagine les limites d'une telle approche dans la mesure où l'expression des gènes bactériens est soumise à un ensemble de facteurs de régulation intrinsèques mais aussi extrinsèques qui modifient nécessairement le protéome. Néanmoins plusieurs études ont montré que la spectrométrie de masse pouvaient être appliquées avec succès au typage des souches

dans le cadre d'épidémie, en particulier à des bacilles à Gram négatif (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*) avec une fiabilité égale à celle du typage moléculaire [81–83]. Les travaux menés au sein du laboratoire par Louardi Moussaoui ont aussi permis de montrer la fiabilité de la spectrométrie de masse pour le typage des bacilles à Gram négatif mais aussi de *S. aureus* [84].

## F. Caractéristiques génétiques de *Staphylococcus lugdunensis*

### 1. Séquençages complets

Le premier séquençage complet de la bactérie a été réalisé par l'équipe de Herman Tse et ses collaborateurs en 2010 qui publient la séquence de la souche HKU09-01 [85]. Ils décrivent alors un génome de 2,6 Mpb avec un contenu en GC de 33.9%. Ils n'identifient aucun plasmide et le génome annoté contient 61 ARNt et 2489 séquences codantes. Ils identifient 8 îlots génomiques potentiels dont un consiste en une paire de régions dupliquées de 32 kb. Simon Heilbronner et ses collaborateurs publient en 2011 un deuxième séquençage complet qui fait cette fois l'objet d'analyses *in silico* beaucoup plus poussées, il s'agit de la souche N920143 [66]. Les caractéristiques générales du génome sont comparables : 2.6 Mpb et un contenu en GC de 33.9%. Il faut néanmoins noter que si le premier génome publié a pu être séquencé entièrement en fermant tous les « trous » de séquence par des PCR additionnelles, ce deuxième génome n'a pas fait l'objet de tels travaux et était initialement constitué de 6 tronçons de séquence, appelés contigs. Les auteurs expliquent que cette décision repose sur l'absence de zones d'intérêt entre ces contigs lorsqu'ils sont alignés sur la séquence princeps publiée par Herman Tse et ses collaborateurs. Ils identifient 56 ARNt, 2447 séquences codantes et l'espèce de staphylocoque la plus proche phylogénétiquement est *S. haemolyticus* avec 78.3% d'homologies au niveau des séquences codantes, devant *S. aureus* (77.8%, souche MRSA252) et *S. epidermidis* (74.7%, souche RP62a). Les génomes de HKU09-01 et N920143 sont conservés à 95.4%. Les auteurs identifient alors tout une série de gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels et déjà détaillés dans le Tableau annexe 2. Ce sont les 2 seuls génomes complets ayant fait l'objet de publications à part entière mais depuis, plusieurs génomes ont été rendus disponibles sur la base de données NCBI et 11 séquences sont désormais disponibles. Cependant, 4 séquences seulement sont abouties, c'est à dire disponible sous la forme d'un chromosome bactérien unique (Tableau 5). Les autres séquences sont faites de morceaux de séquences plus ou moins longs eux mêmes constitués d'assemblages d'unités de rang inférieur (et par conséquent plus petites) que sont les contigs (on parle de scaffolds).

**Tableau 5.** Génomes complets de *S. lugdunensis* disponibles dans la base de données NCBI au 01 avril 2017.

| Souche | Assemblage | Taille (Mpb) | GC% | Réplicons | Scaffolds | Gènes | Protéines | Dates |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HKU09-01 | GCA_000025085.1 | 2.65837 | 33.90 | **chromosome :**NC_013893.1/CP001837.1 | - | 2513 | 2410 | 2010 |
| N920143 | GCA_000270465.1 | 2.59589 | 33.80 | **chromosome**:NC_017353.1/FR870271.1 | - | 2460 | 2359 | 2011 |
| FDAARGOS_141 | GCA_001558775.1 | 2.57183 | 33.80 | **chromosome**:NZ_CP014022.1/CP014022.1 | - | 2440 | 2336 | 2016 |
| FDAARGOS_143 | GCA_001558815.1 | 2.61383 | 33.90 | **chromosome**:NZ_CP014023.1/CP014023.1 | - | 2456 | 2331 | 2016 |
| M23590 | GCA_000185485.1 | 2.52367 | 33.70 | | 8 | 2386 | 2280 | 2010 |
| ACS-027-V-Sch2 | GCA_000316075.2 | 2.61101 | 33.90 | | 4 | 2459 | 2361 | 2012 |
| UCIM6116 | GCA_000542395.1 | 2.55438 | 33.60 | | 47 | 2410 | 2335 | 2014 |
| MJR7738 | GCA_001546615.1 | 2.50183 | 33.70 | | 41 | 2340 | 2275 | 2016 |
| VCU139 | GCA_000247225.2 | 2.52414 | 33.70 | | 69 | 2407 | 2230 | 2012 |
| VCU150 | GCA_000649085.1 | 2.53605 | 33.70 | | 28 | 2377 | 2301 | 2014 |
| VCU148 | GCA_000649125.1 | 2.51451 | 33.70 | | 56 | 2394 | 2239 | 2014 |

Nous avons représenté dans la Figure 3 les relations hiérarchiques entre les génomes de ces souches en utilisant un blast génétique directement à partir du site NCBI et permettant de produire un dendrogramme à l'aide du programme NCBI Tree Viewer (v 1.13.0), basé sur l'alignement des séquences complètes disponibles. Le dendrogramme est représenté sous la forme d'un arbre circulaire et l'unité de mesure des distances est arbitraire. Cet arbre montre la diversité des clusters présents qui ne semblent pas s'agréger en un point unique. Les clusters présents ne regroupent pas non plus les souches en fonction du niveau de finition du génome puisque les 4 génomes aboutis (HKU09_01, N920143, FDAARGOS_141 et FDAARGOS_143) appartiennent à des clusters distincts. Cette analyse très globale des génomes est limitée dans son interprétation. Elle est particulièrement utile pour intégrer plusieurs génomes dans le cadre d'études épidémiologiques. Dans notre cas l'objectif est surtout de nous assurer de l'absence d'agrégation excessive des génomes qui malgré leur proximité doivent garder une certaine divergence.

Il existe de nombreuses méthodes de classification hiérarchiques pour les analyses génétiques et protéiques que nous avons appliquées par exemple à la spectrométrie de masse et donc l'analyse transcriptomique (paragraphe II. C. 3. e.).

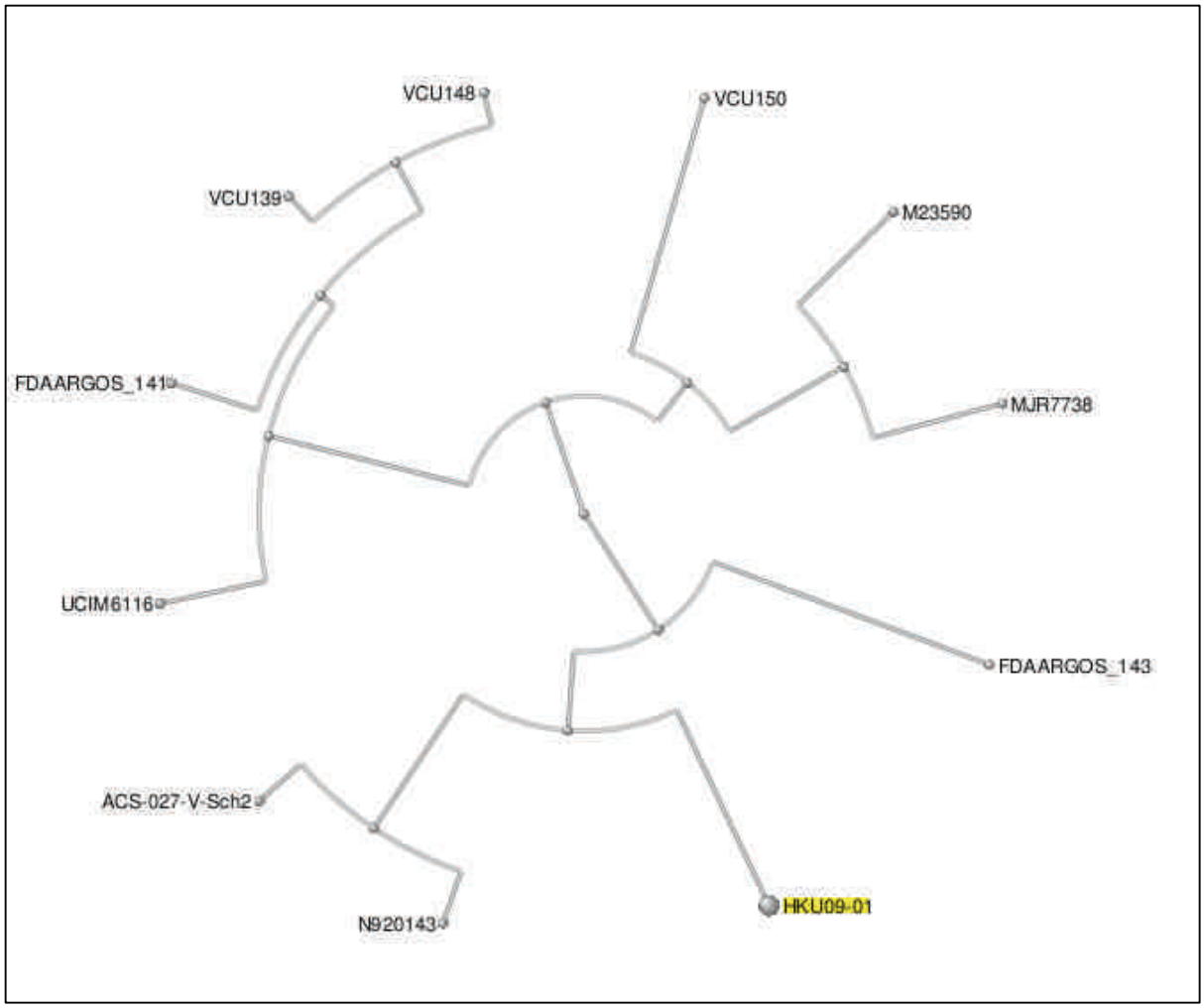



**Figure 3.** Relations phylogénétiques entre tous les génomes des souches de *S. lugdunensis* publiés au 01 avril 2017 (dendrogramme réalisé directement à partir d'un BLAST génétique).

### 2. Séquençage de gènes cibles

Plusieurs publications ont permis le séquençage de certains gènes ciblés (Tableau annexe 2) dans la perspective d'étudier des gènes de virulence potentiels. L'autre objectif du séquençage de certains gènes est aussi de pouvoir établir des relations phylogénétiques entre les souches. Martine Pestel Caron et ses collaborateurs à Rouen ont proposé un schéma de typage des souches de *S. lugdunensis* à partir des gènes ménagers, c'est le Multi Locus Sequence Typing ou MLST [86]. Cette méthode classique de typage au niveau génétique permet d'établir des clusters, c'est à dire des groupes homogènes de bactéries qui se ressemblent en se basant sur les variations des séquences intragéniques de gènes indispensables à la survie bactérienne, et normalement toujours présents, les gènes ménagers. Elle est couramment utilisée pour de nombreuses espèces bactériennes comme *S. aureus* dans le cadre par exemple d'épidémies à la recherche d'un clone particulier [87,88]. Concernant *S. lugdunensis* les

auteurs ont choisi un panel 7 gènes : *aroE, dat, ddl, gmk, ldh, recA et yqiL*. A partir de ces gènes les auteurs ont isolé 4 à 9 allèles en fonction de chaque gène et établis 20 profils de séquence aboutissant à 5 complexes clonaux distincts. Cette équipe a répété ces travaux en utilisant cette fois des gènes de virulence potentiels, mais présents sur toutes les séquences connues : *atl, hlb, isdJ, SLUG_0905, SLUG_16930* et *vwbl* [89]. A partir d'un nouveau panel de souches ils ont répété la même analyse de typage et établis 40 profils de séquence et 6 complexes clonaux. Cette approche permet d'avoir un outil puissant pour l'exploration de cette espèce bactérienne qui d'un côté constitue une bactérie commensale de la peau et d'un autre présente une pathogénicité tout à fait inattendue pour un SCN.

## G. Les éléments génétiques mobiles

Les variations génétiques chez les bactéries constituent un moyen d'adaptation à l'environnement et sont à l'origine de l'émergence de souches parfois pathogènes [90][91][92]. Les mutations spontanées constituent le premier mode de variation mais l'émergence de variants pathogènes repose surtout sur le transfert de matériel génétique. Ces transferts sont faits d'ADN libre, d'éléments génétiques spécialisés (plasmides et transposons) ou peuvent aussi se faire par l'intermédiaire de virus (phages). Il existe en outre 3 principaux moyens de transferts de cette information génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction. Les facteurs de virulence au sens large (comprenant les gènes de résistance aux antibiotiques) sont parfois portés par de tels éléments génétiques mobiles qui deviennent transférables au sein d'une même espèce bactérienne et parfois entre espèces distinctes. Les facteurs de virulence de *S. aureus* ont ainsi la caractéristique d'être presque toujours issus de gènes portés par des éléments génétiques mobiles, échangeables d'une souche à l'autre et parfois issus de SCN alors que le transfert de matériel génétique vers ces derniers n'est pas encore démontré *in vivo* [93–95]. Cette éventualité serait d'une grande importance clinique compte tenu du risque potentiel de voir émerger des SCN hautement pathogènes, virulents. Ces transferts d'information génétiques ont une importance cruciale pour expliquer l'évolution et l'adaptation bactérienne comme celle de *S. aureus* et de ses facteurs de virulence [93,95,96]. Nous allons redéfinir brièvement ces quelques notions. Les mécanismes de transferts d'information génétique sont traités indépendamment des vecteurs de transfert de cette information mais, ils sont en pratique étroitement liés.

### 1. Mode de transferts de l'information génétique

Les différents mécanismes de transferts de l'information génétique chez les bactéries sont illustrés dans la Figure 5.

#### a) La transformation

Il s'agit d'un transfert direct d'ADN libre exogène directement dans le cytoplasme de la cellule bactérienne qui l'intègre ensuite de manière fonctionnelle dans son génome. Ce mécanisme repose sur la capacité d'une bactérie donnée à accepter un tel matériel

étranger, on parle de compétence. La compétence est sélective et repose le plus souvent sur une identité d'espèce. *Haemophilus influenzae* par exemple n'intégrera un ADN exogène libre que s'il est issu d'un autre *Haemophilus influenzae*. Cette sélectivité est médiée par de protéines membranaires reconnaissant une séquence consensuelle propre à une espèce donnée et sans laquelle l'ADN en question ne peut pas pénétrer dans le cytoplasme bactérien. Un tel signal n'est pas indispensable pour d'autres espèces comme *Streptococcus pneumoniae,* mais l'état de compétence sélective repose à ce moment là sur des signaux intercellulaires permettant à la cellule bactérienne de ne devenir compétente que lorsqu'elle est entourée de bactéries de la même espèce. Chez *S. pneumoniae* par exemple, l'ADN fixé à la membrane plasmique est ensuite clivé par une endonucléase en fragments courts de 5 à 15 kb puis dégradé en ADN simple brin qui est transféré dans le cytoplasme puis intégré à l'ADN chromosomique au niveau d'une région homologue. La transformation est naturellement et finalement assez limitée à plusieurs niveaux. Elle ne permet le transfert que de petites séquences d'ADN, son efficacité est modérée (fréquence de transformation habituellement de 0.1 à 1% et au maximum de 20%) et elle n'est possible qu'à certains moments de la croissance bactérienne (souvent en phase exponentielle de croissance) et dans certaines conditions (carences nutritives par exemple). D'un point de vue expérimental, cette propriété a néanmoins permis la manipulation génétique de nombreuses espèces. Certaines bactéries comme *E. coli* sont très facilement transformables *in vitro* par de l'ADN exogène en utilisant des moyens physico chimiques comme l'adjonction d'ions $Ca^{2+}$. Il devient relativement simple de transférer une séquence d'ADN même double brin comme un plasmide par exemple dans le cytoplasme bactérien.

*S. aureus* constitue au contraire une espèce plus difficilement transformable compte tenu de l'existence d'un système de restriction  aux modifications ou Restriction-Modification System (RM system) dont il existe 4 types distincts [97,98]. Ce système repose sur un ensemble de protéines de reconnaissance de l'ADN exogène et de nucléases bloquant l'incorporation d'un ADN exogène étranger issu d'une autre espèce bactérienne. Certaines méthodes permettent parfois de dépasser cette barrière avec l'utilisation de moyens physico-chimiques comme l'électroporation pour permettre à un plasmide de franchir la membrane plasmique.

### b) La conjugaison

Il s'agit d'un transfert unidirectionnel d'ADN d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse et qui nécessite l'intervention d'un plasmide (unité d'ADN cytoplasmique indépendante du chromosome bactérien et autoréplicative) et d'un contact physique entre les 2 bactéries. Ce mode de transfert repose sur l'expression par le plasmide d'un facteur F ou facteur de fertilité. Il s'agit de gènes codant pour des protéines membranaires qui vont reconnaître la cellule receveuse, les *pili* sexuels. Ces protéines permettent la liaison physique des deux cellules bactériennes puis l'établissement d'un pont cytoplasmique (port conjugatif) à travers lequel est ensuite transféré le plasmide ou épisome, en cours de réplication. Une cellule bactérienne portant déjà des *pili* sexuels ne peut pas se lier à une autre bactérie qui en est, elle-même, porteuse et c'est ce qui définit les caractères de bactéries donneuse et receveuse. Une fois le pont formé, l'ADN plasmidique est clivé au niveau d'un site appelé *oriT* ou origine de transfert et l'ADN se

réplique selon un mécanisme particulier dit en cercle roulant. Il aboutit à la synthèse d'un ADN simple brin qui est transféré vers la cellule receveuse à travers le pore conjugatif. L'ADN polymérase III rétablit ensuite l'intégrité de l'ADN plasmidique au sein de chaque cytoplasme en synthétisant le brin complémentaire.

Les plasmides ici considérés peuvent aussi s'intégrer dans le chromosome de l'hôte et portent alors le nom d'épisome dont la taille est importante : 70 à 120 kb. Cette recombinaison entre un plasmide et le chromosome bactérien s'effectue par l'intermédiaire d'homologies de séquence conduisant à l'intégration entrecroisée du plasmide (crossing-over). Le phénomène de conjugaison est toujours possible car l'information génique du plasmide n'a pas changé et va conduire au transfert de matériel chromosomique de la bactérie donneuse. Le chromosome en amont de l'origine de transfert est progressivement transféré. Théoriquement, l'ensemble du chromosome de la cellule donneuse pourrait ainsi être transféré jusqu'à revenir jusqu'à l'origine de transfert mais le pore conjugatif est très instable et ne reste en place que peu de temps ne laissant le plus souvent que pour quelques gènes la possibilité d'être transférés. Une fois dans le cytoplasme de la bactérie receveuse l'ADN transféré est intégré au chromosome bactérien, mais il ne contient pas le plasmide qui n'a pas été transféré compte tenu de l'insertion initiale en crossing-over dans la bactérie donneuse de ses gènes. Par contre, la bactérie receveuse peut ainsi acquérir de nouveaux gènes lui conférant de nouvelles propriétés comme par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques. Il existe au sein de la cellule donneuse de nombreuses séquences d'insertions dans le chromosome bactérien et souvent plusieurs copies du plasmide dont l'insertion est finalement fréquente et simple on parle alors de donneurs à haute fréquence de recombinaison (Hfr).

Les plasmides conjugatifs jouent un rôle central dans le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* [99].

### c) La transduction

Il s'agit d'un transfert d'ADN par l'intermédiaire d'un virus dont la capside va protéger le matériel génétique à transférer. Ce sont les bactériophages. Nous détaillerons la notion de phage dans la partie suivante. Le processus de transduction est lié au fait que l'encapsidation de matériel génétique n'est pas spécifique à l'ADN viral et peut comprendre n'importe quelle partie de l'ADN bactérien dans une certaine limite de taille dépendante de la taille de la capside assemblée. L'absence d'ADN viral conduit à parler de particules virales défectives. Le phage excrété se fixe ensuite sur une cellule cible où il vient injecter l'ADN contenu. Cet ADN ne peut pas se répliquer, mais peut éventuellement s'intégrer au chromosome hôte par recombinaison au niveau d'homologies de séquences. En l'absence d'intégration, on parle de transduction abortive et les caractéristiques génétiques transmises par le phage ne sont pas transmises à la descendance. Le matériel génétique porté par le phage peut concerner des régions spécifiques du génome dont il est issu (transduction spécialisée ou restreinte) ou n'avoir aucune spécificité et porter n'importe quelle partie du génome (transduction généralisée). Les phages constituent une entité fondamentale pour le transfert de matériel génétique chez *S. aureus,* mais aussi chez les SCN et les phages

peuvent transporter des éléments comme des plasmides ou plus généralement des îlots génomiques parfois porteurs de facteurs de virulence, ce sont les îlots de pathogénicité [100]. Chaque bactérie est souvent porteuse de plusieurs séquences codant pour un phage.

### d) Autres mécanismes

D'autres mécanismes ont récemment été décrits pour le transfert horizontal de matériel génétique mais leur caractérisation est encore naissante et ils ne concernent pas les staphylocoques. Citons simplement la recombinaison chromosomique par fusion cellulaire transitoire, les connections cellulaires par nanotubes, la sécrétion d'ADN au sein de vésicules membranaires et les agents de transferts géniques qui sont proches des phages (Gene Transfert Agent, GTA) [91,101].

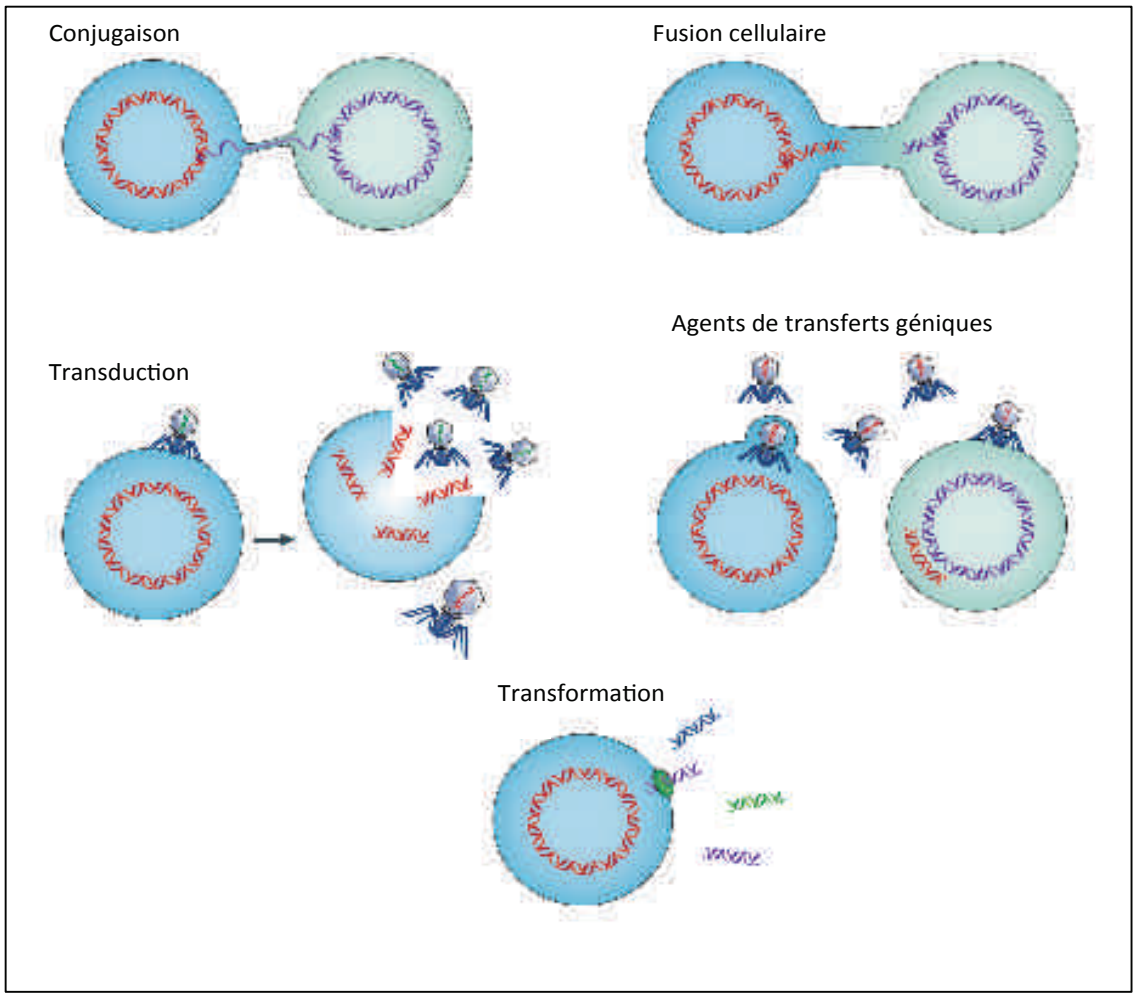



**Figure 4.** Principaux mécanismes de transfert de l'information génétique chez les bactéries. (Reproduit et traduit de Soucy S.M. et coll., 2015).

## 2. Unités de transferts de l'information génétique

Après avoir vu les mécanismes nous allons maintenir décrire les différentes unités mobilisables d'une bactérie à l'autre pour le transfert d'information génétique, on parle d'éléments génétiques mobiles. On distingue les phages, les transposons, les plasmides et d'autres unités de transfert horizontal du matériel génétique dont l'existence est parfois limitée à certains genres bactériens, parfois appelés îlots chromosomiques. La classification de ces éléments mobiles est parfois contradictoire et nous nous sommes basés sur les critères proposés par Richard P. Novick et ses collaborateurs pour la classification des îlots chromosomiques chez les bactéries à Gram positif [102]. Les auteurs proposent de définir à côté des plasmides, phages et transposons les ilots chromosomiques en relation avec un phage (Phage-Related Chromosomal Islands, PRCIs), une famille d'éléments génétiques mobiles incluant les îlots de pathogénicité de *S. aureus*. Cette famille se caractérise par l'absence intrinsèque de tout gène permettant à la séquence d'être mobilisée en dehors du chromosome bactérien et donc par sa dépendance à une séquence codant pour un phage, habituellement localisée à proximité pour permettre sa mobilisation, on parle de phage aidant (helper phage). Les auteurs identifient des PRCIs dans plusieurs espèces bactériennes : *S. aureus*, *S. epidermidis* (SeCI pour *S. epidermidis* Chromosomic Island), *S. haemolyticus* (ShCI) et *S. saprophyticus* (SsCI) entre autres. L'abréviation SaPI pour *S. aureus* (*S. aureus* Pathogenicity Island) est préférée à celle de SaCI qui est plus logique car on constate que les îlots chromosomiques de cette espèce sont toujours porteurs de facteurs de virulence et cela permet de conserver une nomenclature utilisée depuis plusieurs années pour identifier les îlots de *S. aureus*.

Tous ces éléments mobiles sont à l'origine de modifications parfois rapides du génome des souches et constituent une grande partie de ce que l'on appelle le génome accessoire. En effet chaque espèce bactérienne possède un corps de génome (core genome) qui est très bien conservé d'une souche à l'autre et un génome accessoire qui est hautement variable [103].

### a) Les plasmides

Ce paragraphe s'appuie sur la nomenclature proposée par Chris Smillie, Maria Pilar Garcillan-Barcia et leurs collaborateurs qui classent les plasmides en fonction de leurs protéines de mobilisation [104,105]. Masaki Shintani et ses collaborateurs ont par ailleurs publié une revue complète de la littérature sur les plasmides actuellement connus et dont les séquences sont régulièrement actualisées et disponibles sur le site du European Nucleotide Archive [106,107]. Les auteurs rapportent que sur plus de 4602 plasmides de séquence connue, 96% sont d'origine bactérienne, 46.5% sont décrits chez les *Proteobacteria* et 24.6% chez les *Firmicutes*, principalement chez les bactéries à Gram négatif (90%). Les plasmides chez les *Firmicutes* sont habituellement de petite taille et mesurent en moyenne 39 kb avec un contenu en GC moyen de 34.4%. Un seul plasmide a été décrit chez *S. lugdunensis*, pLUG10, un plasmide de résistance au cadmium (référence NCBI : NC_002093.1) [108]. Inversement 90% des souches de *S. aureus* sont porteuses de plasmides. Ce sont des structures nucléotidiques le plus souvent circulaires et autos réplicatives dont l'organisation est modulaire. Les plasmides

sont le plus souvent identifiés par le préfixe « p » suivi d'un identifiant ou par le préfixe « Inc » qui fait référence à la méthode maintenant désuète de classification basée sur l'incompatibilité des plasmides (impossibilité pour certains plasmides de coexister dans la cellule bactérienne).

**- Module de réplication REP :** les gènes *rep* issus de ce module ont longtemps servi et servent encore parfois à définir les familles de plasmides [109]. Ce module détermine directement le nombre de copies du plasmide qui sera produit dans le cytoplasme bactérien. La présence d'un gène *rep* est indispensable pour pouvoir parler de plasmide. La réplication se déroule au niveau d'un site spécifique, l'origine de réplication végétative, *oriV* qui interagit directement avec le produit du gène *rep* présent.

**- Module de Mobilisation MOB :** il repose sur la présence d'une famille de protéines : les relaxases. Elles clivent l'ADN au niveau de l'origine de transfert évoquée dans le paragraphe précédent, *oriT*. Ce module peut aussi contenir des gènes codant pour des protéines indispensables à la mobilisation du plasmide appelées T4CP (Type 4 Pili Coupling Proteins) et qui sont directement impliquées dans le transport de l'ADN à travers le pore conjugatif. Le module MOB peut être classé en 6 groupes distincts : $MOB_C$, $MOB_F$, $MOB_H$, $MOB_P$, $MOB_Q$ et $MOB_V$.

**- Module de conjugaison MPF (Mating Pair Formation) :** le module de conjugaison comprend les gènes codant pour les protéines nécessaires à l'établissement d'un pore conjugatif. Cet ensemble fonctionnel de 12 à 30 protéines est appelé système de sécrétion de type 4 (Type 4 Secretion System, T4SS). Ce système est mal connu chez les procaryotes en dehors de certains genres comme les *Ricketsia,* mais il est bien présent chez les *Firmicutes* et en particulier chez *S. aureus* [110,111]. Le module MPF peut être classé en 4 groupes distincts : $MPF_F$, $MPF_G$, $MPF_I$ et $MPF_T$. Rappelons que les systèmes de sécrétion de type 4 constituent une grande famille de complexes protéiques impliqués dans des processus biologiques indépendants des plasmides comme par exemple le transfert de protéines et que ces classes s'appliquent en fait principalement aux plasmides. Il est toutefois intéressant de rappeler que d'une manière générale, ils sont souvent impliqués dans la virulence et la pathogénie bactérienne [112].

**- Module d'établissement :** il s'agit d'un ensemble de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité du plasmide au sein d'une cellule hôte.

**- Module d'adaptation :** les gènes de ce module sont les moins étudiés et sont impliqués dans les mécanismes d'adaptation et de réaction aux conditions environnementales impactant directement la *fitness* du plasmide.

Les plasmides sont d'une grande variété et certains possèdent l'ensemble de ces modules alors que d'autres sont limités à un module de réplication associé à une relaxase. Sur l'ensemble des plasmides connus chez les procaryotes environ 1/4 possèdent un module MOB et un module MPF, ils sont dits conjugatifs car ils peuvent à eux seuls être transférés par conjugaison à une nouvelle cellule. Un autre quart ne possède pas de module MPF mais un module MOB parfois réduit à la présence d'une relaxase et d'une origine de transfert, ils sont dits mobilisables ou transférables. En effet ils peuvent « profiter » du système de sécrétion d'un plasmide aussi présent dans le cytoplasme pour être transféré par conjugaison selon les mêmes modalités que pour un

plasmide conjugatif. Enfin, la moitié des plasmides ne possède pas de module MOB ou MPF, ils sont dits non transmissibles. Même en présence d'un autre plasmide ayant un module MOB et MPF complet, il ne peut être transféré par conjugaison. Cette dernière catégorie est habituellement constituée d'entités de petites tailles, réduites à quelques kb et quelques gènes comme un gène de réplication et un gène de résistance bactérienne comme chez *S. aureus* chez qui ils représentent environ 2/3 des plasmides décrits [113]. D'autres sont de plus grande taille. L'interprétation de ce constat n'est pas consensuelle. Le maintien de ces plasmides dans la bactérie hôte représente un coût métabolique qui devrait conduire à leur disparition mais il semble que l'avantage sélectif que peuvent conférer les gènes portés par ces plasmides soit suffisant pour expliquer leur persistance au fil des générations [114]. Il semble par ailleurs que ces plasmides non transmissibles par conjugaison soient en réalité transférables par le biais d'autres mécanismes comme la transduction, la transformation ou la cointégration de plasmides ; mais ces mécanismes semblent marginaux. Frances G. O'Brien et ses collaborateurs ont récemment découvert chez *S. aureus* que la présence d'une origine de transfert dans un plasmide non transmissible pouvait être suffisante pour le rendre mobilisable par l'intermédiaire d'une activation *en trans* de la relaxase d'un plasmide conjugatif conjointement présent [99,115]. Ce nouveau mécanisme est peut-être la clé qui permet d'expliquer la persistance et la diffusion de tels plasmides. Ces catégories de plasmides et leur répartition sont représentées dans la Figure 6 [104]. Les plasmides non transmissibles représentent la majorité des plasmides décrits, loin devant les plasmides mobilisables ou conjugatifs et leur taille se situe le plus souvent aux alentours de 5kb et 35 kb. Le type de plasmide n'est pas signalé dans la dénomination de ces derniers mais se déduit des gènes présents et de son organisation modulaire. La taille d'un plasmide n'est pas suffisante pour en déduire sa catégorie.

Le plasmide pLUG10, décrit chez *S. lugdunensis*, est un plasmide de 3117 pb (référence NCBI : NC_002093.1) portant trois séquences codantes potentielles mais aucune relaxase ou système de sécrétion. Il s'agit donc d'un plasmide non transmissible selon la terminologie décrite ci-dessus, même si, comme nous l'avons expliqué pour *S. aureus*, des mécanismes de mobilisation existent peut-être.

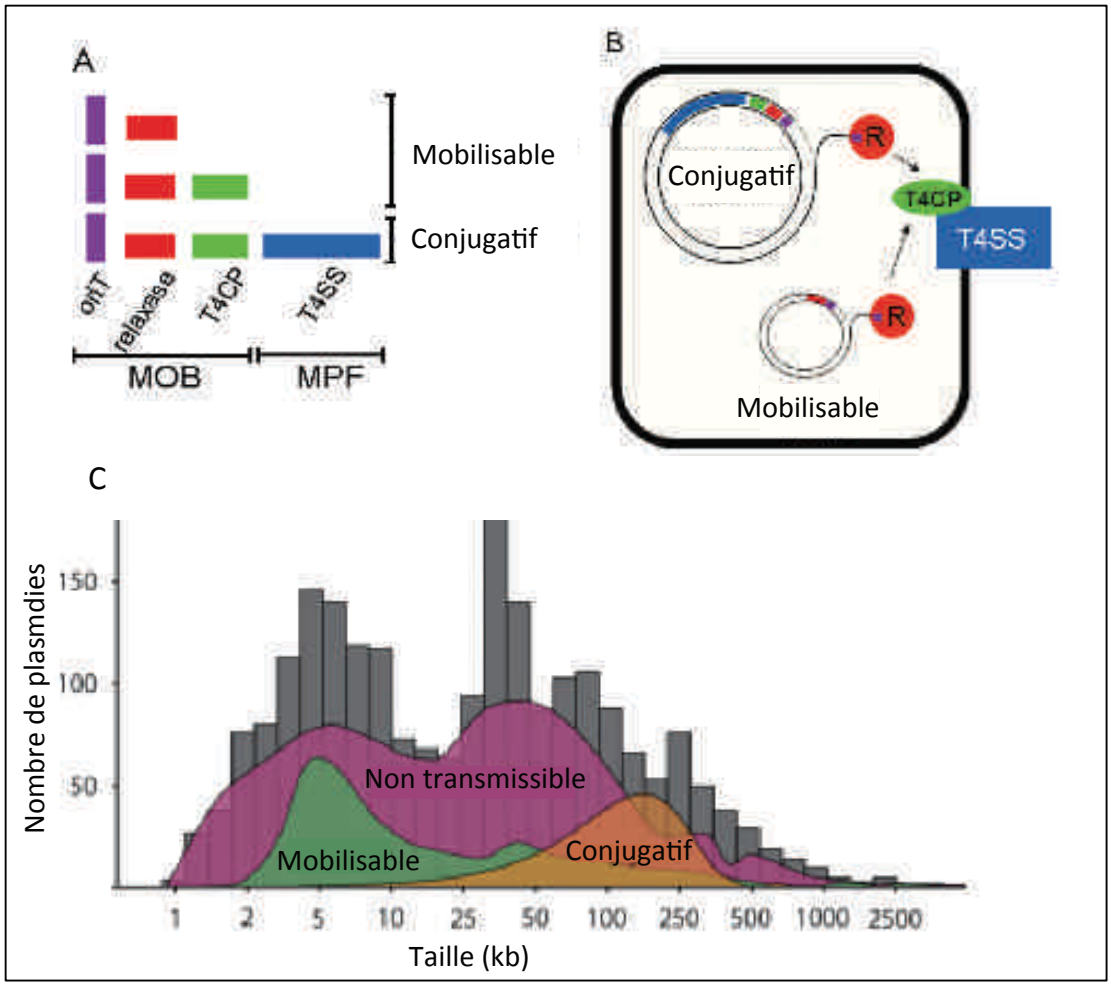



**Figure 5.** Catégories fonctionnelles de plasmides (Panel A et B) et répartition numérique en fonction de leur taille (Panel C). (Reproduit et traduit de Smillie et coll., 2010).

### b) Phages

Ce paragraphe s'appuie sur les éléments taxonomiques proposés par Marie Deghorain et ses collaborateurs dans une revue complète de la littérature ainsi que sur les actualisations fournies par l'organisme de référence pour la taxonomie des virus, l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [116,117]. Plusieurs revues de la littérature ont par ailleurs remis en perspective l'importance et l'actualité de l'étude des phages [118,119]. La quasi-totalité des bactéries sont porteuses de phages dont les séquences codantes peuvent représenter une partie importante du génome bactérien, 10% chez *S. pneumoniae* par exemple. Les phages sont des structures virales qui peuvent porter en leur sein de l'ADN ou de l'ARN issu de la bactérie hôte et le transmettre. Ce sont donc des vecteurs majeurs des transferts génétiques horizontaux. Ils contribuent parfois à la virulence bactérienne, car ils peuvent porter les gènes codant pour des facteurs de virulence comme chez *S. aureus* chez qui ils représentent une part importante du génome accessoire [100]. Tous les génomes de *S. aureus* codent habituellement pour au moins 1 phage, mais de nombreuses souches peuvent être

porteuses de plusieurs phages, jusqu'à 4. Les SCN sont aussi porteurs de phages, mais contrairement à *S. aureus,* ils ne semblent pas porteurs de facteurs de virulence. Ils ont été décrits principalement chez *S. epidermidis* et S. haemolyticus et présentent les mêmes caractéristiques que les phages portés par *S. aureus*. Une séquence codant possiblement pour un phage, ΦSL1, a été identifiée chez *S. lugdunensis* dans le génome de la souche N920143 décrit dans les paragraphes précédents. L'émergence de souches de SCN virulentes et l'identification d'îlots de pathogénicité chez les SCN éclairent d'une nouvelle manière l'intérêt des phages dans ce genre bactérien alors que notre capacité à les repérer a été révolutionnée par les approches *in silico* découlant des données de séquençage.

Le matériel génétique porté par les phages est de taille très variable et peut aller de simples brins d'ARN de 3.5 kb jusqu'à des fragments d'ADN natif de 500 kb. Ce matériel génétique est transporté au sein d'une particule virale qui constitue le phage en tant que tel et dont la structure est le plus souvent constituée d'une tête de symétrie icosaédrique et d'une queue non contractile et ne sont pas enveloppés (*Siphoviridae*). Certains phages peuvent aussi être de structures polymorphe ou filamenteuse. La très grande majorité des phages appartient à l'ordre des *Caudovirales* qui se divisent en 3 familles : les *Siphoviridae*, les *Podoviridae,* les *Myoviridae*. Les phages peuvent présenter 2 évolutions distinctes au sein de son hôte bactérien : un cycle lytique qui aboutit à la multiplication du phage et à la lyse cellulaire, ou un cycle lysogénique qui conduit à la latence du génome du phage dans l'hôte sous la forme d'une structure pseudo-plasmidique ou intégré au chromosome bactérien on parle alors de prophage ou de phage tempéré. Le terme de prophage désigne souvent le génome en tant que tel par exemple intégré au sein du chromosome bactérien (Figure 6) [119]. Ce phage tempéré peut conduire à l'intégration d'un matériel génétique exogène qui, s'il est exprimé (transcrit et traduit), peut changer les caractéristiques de l'hôte qui peut par exemple fabriquer un facteur de virulence (exemple de *Corynebacterium diphteriae* et de la toxine diphtérique issue d'un prophage). Cela s'appelle la conversion lysogénique.

La grande majorité des phages décrits chez *S. aureus* et les quelques phages décrits chez les SCN appartiennent à la famille des *Siphoviridae* et sont le plus souvent des phages tempérés détectés sous la forme de prophages au sein du chromosome bactérien. Les autres phages appartiennent à la famille des *Podoviridae* et des *Myoviridae* Le génome des phages est organisé de façon modulaire avec plusieurs catégories fonctionnelles.

**- Module lysogénique :** il regroupe les gènes impliqués dans l'établissement d'un cycle lysogénique avec notamment une intégrase.

**- Module de métabolisme de l'ADN :** on y retrouve les gènes impliqués dans les fonctions de réplication et de régulation de l'ADN.

- **Module de paquetage et encapsidation de l'ADN :** ce sont les gènes permettant l'encapsidation d'un fragment d'ADN. On retrouve notamment une terminase

**- Module de la queue :** ce sont les gènes dédiés à la synthèse de la queue du phage.

**- Module de lyse :** ce sont les gènes impliqués dans l'établissement d'un cycle lytique comme les endolysines.

**- Module de virulence :** ce sont les gènes qui pourront conférés à l'hôte une virulence particulière comme par exemple les toxines superantigéniques de *S. aureus* comme *sea, seg, sek*, les facteurs d'évasion du système immunitaire comme *chip* et le gène codant pour la leucotoxine de Panton Valentine.

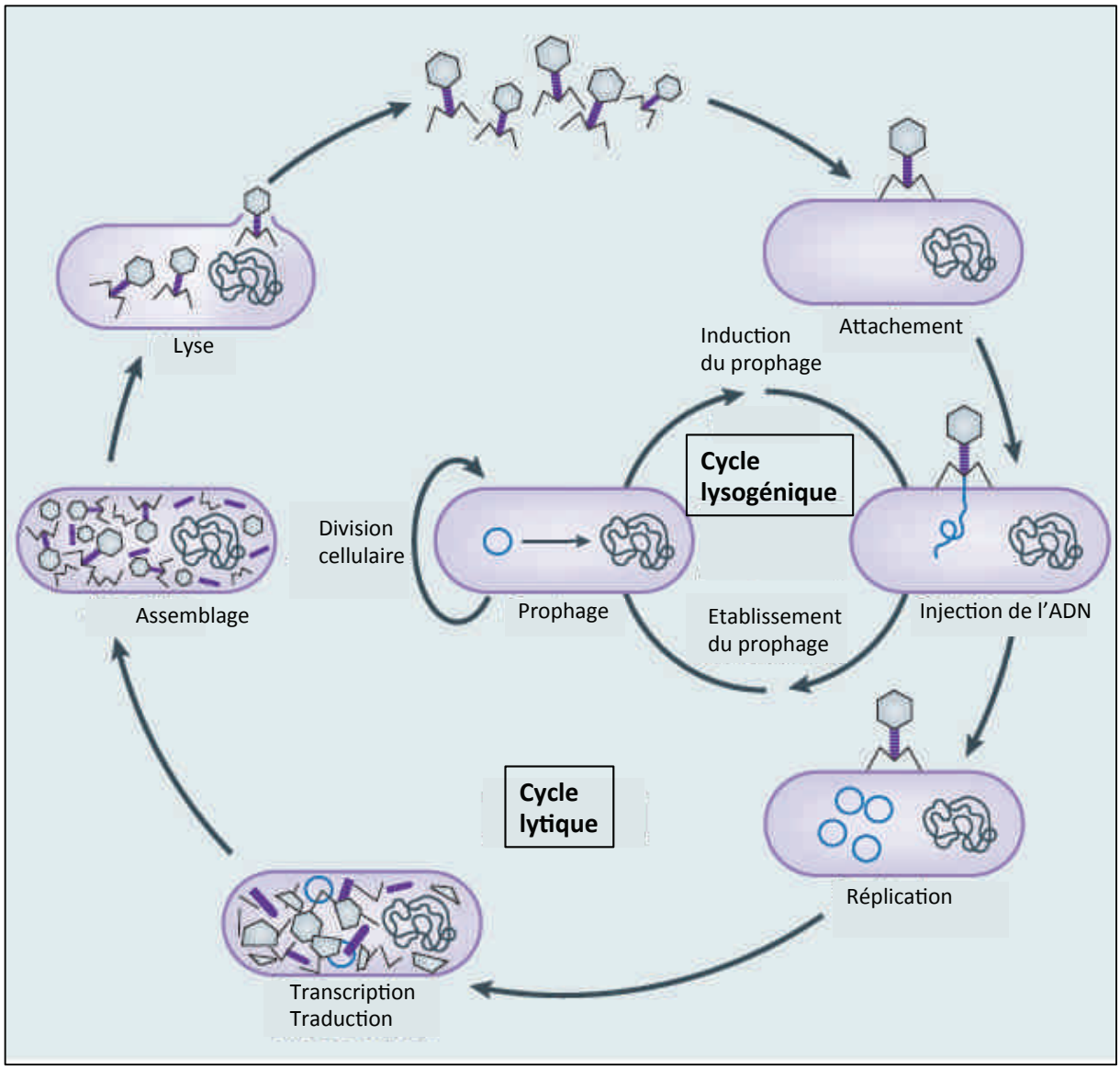
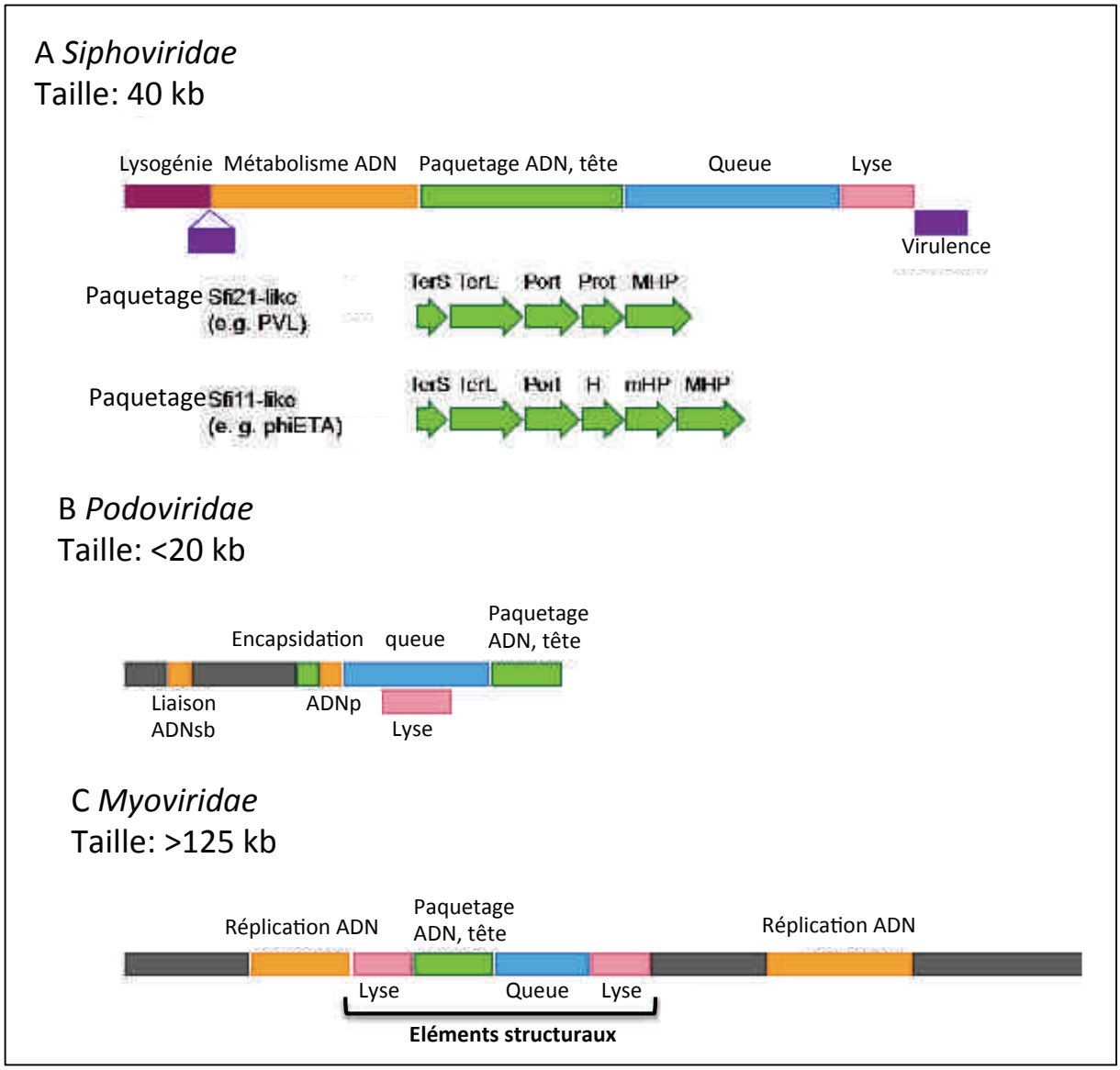



**Figure 6.** Cycle lytique et lysogénique des phages. (Reproduit et traduit de Georges PC Salmond et coll., 2015).

Sur la base des éléments taxonomiques proposés par Marie Deghorain et ses collaborateurs, on peut donc distinguer chez les staphylocoques plusieurs caractéristiques aux 3 familles de phages qui sont rapportées dans la Figure 7 [120].




A. *Siphoviridae*, organisation modulaire. En violet le module lysogénique, en orange le métabolisme de l'ADN, en vert le paquetage de l'ADN et les gènes de synthèse de la tête, en bleue la queue, en rose les gènes du module de lyse et en violet d'éventuels gènes de virulence. Les gènes de virulence sont habituellement situés à la fin du génome ou juste après le module de lysogénie. Le module de paquetage présente une organisation structurale souvent proche de 2 séquences de phage connues : Sfi21 et Sfi11 avec : une terminase (petite sous unité TerS et grande sous unité TerL), une protéine portale (Port), une protéine hypothétique (H) et enfin une protéine de tête (protéine majeur, MHP et parfois mineure, mHP). B. *Podoviridae,* organisation modulaire mais une partie des gènes en gris est sans fonction connue. La séquence débute souvent par un gène de liaison à l'ADN simple brin (ADNsb) alors que l'ADN polymérase est plus distante (ADNp). C. *Myoviridae*, l'organisation est modulaire et l'on retrouve aussi certains gènes de fonction inconnue en gris.

**Figure 7.** Caractéristiques des familles de phages le plus souvent observées chez les staphylocoques. (Reproduit et traduit de Deghorain et coll., 2012).

Les phages constituent un mode de transfert de l'information génétique privilégié compte tenu de leur nombre en particulier chez *S. aureus* chez qui l'échange d'informations génétiques est extrêmement fréquent. On peut observer ainsi une importante variabilité du génome accessoire au sein d'une même flore bactérienne [121]. En dehors de la transduction généralisée ou spécialisée que nous avons décrites dans le paragraphe précédent et qui constituent le modèle de transfert habituel des phages, plusieurs autres mécanismes existent et sont décrits dans la revue de la littérature proposée par George P. C. Salmond et ses collaborateurs [119]. L'un de ces moyens est l'utilisation des phages par des îlots chromosomiques.

### c) Îlots chromosomiques et îlots de pathogénicité.

Comme nous l'avons expliqué plus haut, les îlots de pathogénicité sont bien décrits chez *S. aureus* et appartiennent en fait à une plus large famille d'éléments génétiques mobiles que Richard P. Novick a proposé d'appeler ilots chromosomiques en relation avec un phage (Phage-Related Chromosomal Islands, PRCIs) dans la mesure où ces zones du génome bactérien n'ont pas de gènes de mobilisation, mais peuvent utiliser ceux d'un phage alors appelé phage aidant et qui est le plus souvent un phage tempéré, ou prophage, c'est à dire un phage dont le génome est intégré au génome de l'hôte. Ces phages peuvent passer d'un cycle lysogénique à un cycle lytique en fonction de facteurs de régulation des îlots de pathogénicité et qui profitent de leur cycle lytique pour augmenter le niveau de mobilité et de transmissibilité. Les îlots de pathogénicité de *S. aureus* sont les plus nombreux (la quasi-totalité des souches séquencées en sont porteuses d'au moins 1), les mieux connus, et ils portent de nombreux facteurs de virulence comme des toxines superantigéniques et des leucotoxines. Ces éléments du chromosome bactérien sont donc mobiles et ont fait l'objet de nombreuses recombinaisons. Ils se distinguent du corps du génome de leur hôte à plusieurs niveaux : le contenu en GC, la fréquence d'utilisation de certains codons, la présence de gènes de mobilité. Ces différences sont à la base d'outils bioinformatiques d'identification utilisés à partir des génomes complets et décrits dans les matériels et méthodes (paragraphe II. F. 5. g.). Notons néanmoins que contrairement aux bacilles à Gram négatif comme *E. coli* le contenu en GC des îlots de pathogénicité chez *S. aureus* est souvent proche de celui du coeur du génome, ou core génome, car les recombinaisons se font au sein même de l'espèce contrairement à *E. coli*.

Ils présentent une organisation modulaire assez variable, mais certains éléments sont constants et permettent leur caractérisation. Cette organisation modulaire est généralement décrite selon la même convention que pour les phages, mais on retrouve aussi des éléments communs avec les plasmides comme une protéine de réplication et une origine de réplication. Leur longueur est très variable, mais ils mesurent habituellement 15 kb environ.

**- Module d'intégration :** on y retrouve une intégrase, mais aussi souvent une excisionase.

**- Module de métabolisme de l'ADN :** on y retrouve les gènes impliqués dans les fonctions de réplication et de régulation de l'ADN.

**- Module de réplication :** il contient le gène de réplication *rep* et une primase *pri* ainsi qu'une origine de réplication *ori*.

**- Module d'encapsidation :** ce sont les gènes d'encapsidation du phage aidant.

**- Module de virulence :** les gènes de virulence se situent généralement en début ou en fin de séquence.

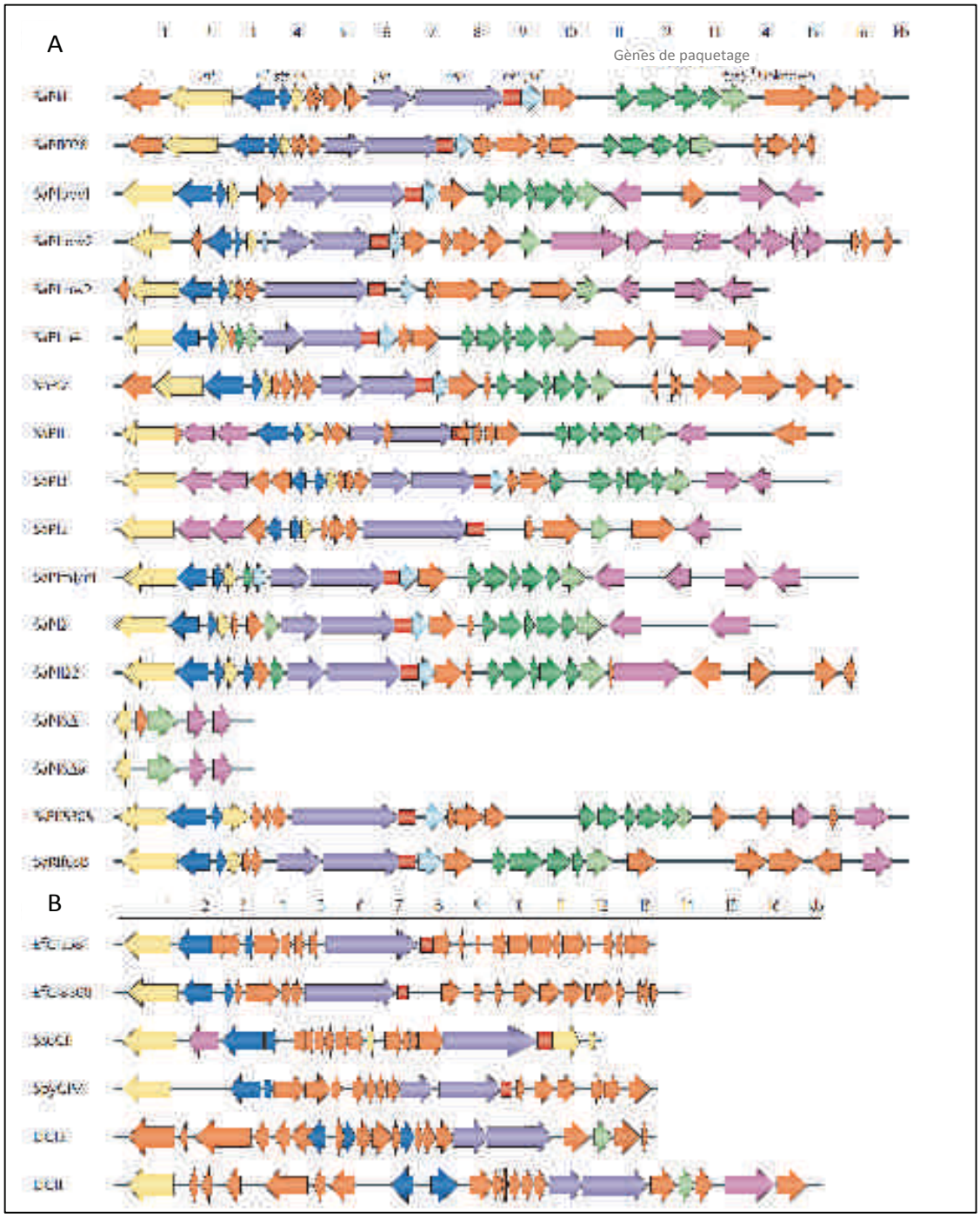
L'organisation des principaux îlots de pathogénicité des staphylocoques est reproduite dans la Figure 8 [102].

### d) Autres unités d'échange de l'information génétique

A côté des plasmides, phages et îlots de pathogénicité on décrit d'autres unités échangeables notamment chez les staphylocoques :

**- Séquences d'insertion [122] :** il s'agit de courtes séquences, mesurant parfois quelques centaines de paires de base et porteuses d'un gène codant pour une transposase. Ces séquences sont en outre reconnaissables par la présence de séquences inversées répétées à leurs extrémités (de 10 à 40 pb). Leur dissémination le long d'un chromosome bactérien et leurs homologies favorisent les épisodes de recombinaisons homologues. Les séquences d'insertion peuvent s'associer entre elles lors des phénomènes de recombinaison et emmener un fragment de génome qui serait présent entre elles. On parle de transposon composite, car cela ressemble à un transposon sans en avoir les caractéristiques, mais leur dénomination *Tn* fait référence à leur similarité avec ces derniers. Les séquences d'insertion codent aussi parfois pour des gènes de régulation impliqués dans l'expression de la transposase, mais aussi dans celle de gènes adjacents. Elles ne codent pas pour des facteurs de virulence ou de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* par exemple mais les transposons composites peuvent en être porteurs. Les séquences d'insertion ne sont pas transférables horizontalement en l'état, mais peuvent s'intégrer aux éléments génétiques mobiles décrits précédemment devenir transférables.

**- Transposons [123] :** il s'agit de séquences nucléotidiques dont l'importance est fondamentale chez les eucaryotes où elles représentent une part importante du génome tout comme chez les procaryotes chez qui elles peuvent porter des éléments de virulence. Chez *S. aureus* par exemple ces séquences portent habituellement les gènes de résistance aux antibiotiques. Les transposons sont par définition porteurs d'un gène codant pour une transposase et leur longueur chez *S. aureus* est variable de 3 à 60 kb. On ne retrouve pas de séquences courtes répétées aux extrémités, mais deux séquences dites terminales (de 35 à 48 pb) qui sont aussi reconnues par la transposase. Ils sont porteurs d'un gène codant pour une résolvase (*TnpR*) qui permet de terminer l'étape de recombinaison. La plupart des souches de *S. aureus* sont porteuses d'un ou deux transposons, mais il en existe plusieurs centaines que l'on identifie habituellement par le préfixe *Tn* suivi d'un numéro d'identification. Ces éléments peuvent se déplacer au sein du génome bactérien, mais ne sont pas transférables sans l'aide des éléments génétiques mobiles décrits précédemment.




A. îlots de pathogénicité de *S. aureus* (SaPIs). B. probables ilots chromosomiques en relation avec un phage (PRCIs) mais non staphylococciques. Les îlots sont colorés selon leur fonction. Jaune : module d'intégration. Bleu foncé : module de métabolisme de l'ADN. Violet : module de réplication. Vert : module d'encapsidation. Rose : facteurs de virulence. Bleu ciel : facteur de modulation *pif*. Protéines hypothétiques : orange.

**Figure 8.** Îlots de pathogénicité des staphylocoques. (Reproduit et traduit de Richard P. Novick et coll., 2010).

**- Eléments conjugatifs et intégratifs (Integrative and Conjugative Elements, ICE) [124,125] :** il est apparu ces dernières années que certains transposons présentent des caractéristiques tout à fait particulières puisqu'ils sont capables d'être extraits du chromosome bactérien, circularisés, transférés à une bactérie par un mécanisme conjugatif avant d'être réintégré au génome de l'hôte et présentent donc des caractéristiques alliant celles d'une transposon, d'un prophage et d'un plasmide. Un temps appelés phages conjugatifs ils sont désormais dénommés Eléments Conjugatifs et Intégratifs et sont particulièrement impliqués dans les phénomènes de dissémination de la résistance bactérienne. On note toutefois dans certaines publications la persistance d'une distinction entre transposons conjugatifs et éléments conjugatifs et intégratifs.

**- Cassettes chromosomiques staphylococciques (Staphyococcal Cassette Chromosome, SCC)** [126–128]**:** il s'agit de portions d'ADN relativement longues mesurant de 3 à 60 kb et insérées au niveau du gène *orfX* (code une méthyl transférase ribosomale) chez les staphylocoques. Elles intègrent toujours un gène *ccr* qui est une sérine recombinase et qui catalyse les réactions d'excision/intégration de cet élément génétique dont la mobilité est finalement relativement faible par rapport aux autres éléments décrits précédemment. On retrouve dans ces cassettes le gène *mec* (*SCCmec*) à l'origine de la résistance des staphylocoques (*S. aureus* et SCN) à la méticilline et par extension à toutes les β lactamines. Le transfert des cassettes d'un staphylocoque à l'autre peut se faire par les différents mécanismes décrits précédemment mais est moins bien connu.

### e) Ilots génomiques

On retrouve dans la littérature le terme d'îlots génomiques dont la définition peut varier au gré des publications. Mario Juhas, Morgan G. I. Langile et leurs collaborateurs ont publié deux revues de la littérature permettant d'avoir une définition relativement consensuelle des îlots génomiques [129,130]. Le flou entretenu par ce terme vient du caractère très générique de ce terme dont on comprend qu'il se réfère à toute partie du chromosome bactérien « indépendante » et c'est souvent le cas des éléments acquis par transferts horizontaux. Les analyses de séquences de génomes entiers permettent parfois d'identifier des séquences d'origine visiblement étrangère à la bactérie (changement du contenu en GC par exemple), sans pour autant retrouver d'éléments permettant de faire rentrer le morceau de séquence dans une des catégories décrites dans ce paragraphe. Il faut attendre parfois plusieurs mois, années pour qu'une équipe démontre finalement que la séquence en question relève en fait d'une catégorie connue (plasmide intégratif par exemple) et l'îlot en question change de dénomination. Il semble ainsi licite de considérer ce terme comme une définition générique de tous les éléments génétiques acquis horizontalement au sein du chromosome bactérien et qui constituent souvent une partie conséquente du génome accessoire de la bactérie et non pas comme une catégorie à part entière. Cela exclut de fait les plasmides extra chromosomiques et les phages mais inclut les prophages et les plasmides intégrés. On retrouve aussi dans la littérature le terme d'ilets pour les îlots de plus petite taille, souvent inférieure à 10 kb. On peut ainsi dégager quelques caractéristiques communes aux îlots génomiques :

- Segments du chromosome bactrien mesurant de 10 à 200 kb.

- Le contenu en GC varie souvent par rapport à celui de la bactérie et son core génome.

- Suivent souvent une séquence codant un ARNt.

- Sont souvent encadrés par des séquences répétées.

- Comprennent souvent des gènes impliqués dans les phénomènes intégratifs et conjugatifs.

- Comprennent souvent des gènes offrant un avantage sélectif à la bactérie (gènes de virulence, gènes de résistance entre autres).

Ces notions appliquées aux éléments génétiques mobiles des staphylocoques sont illustrées dans la Figure 9.

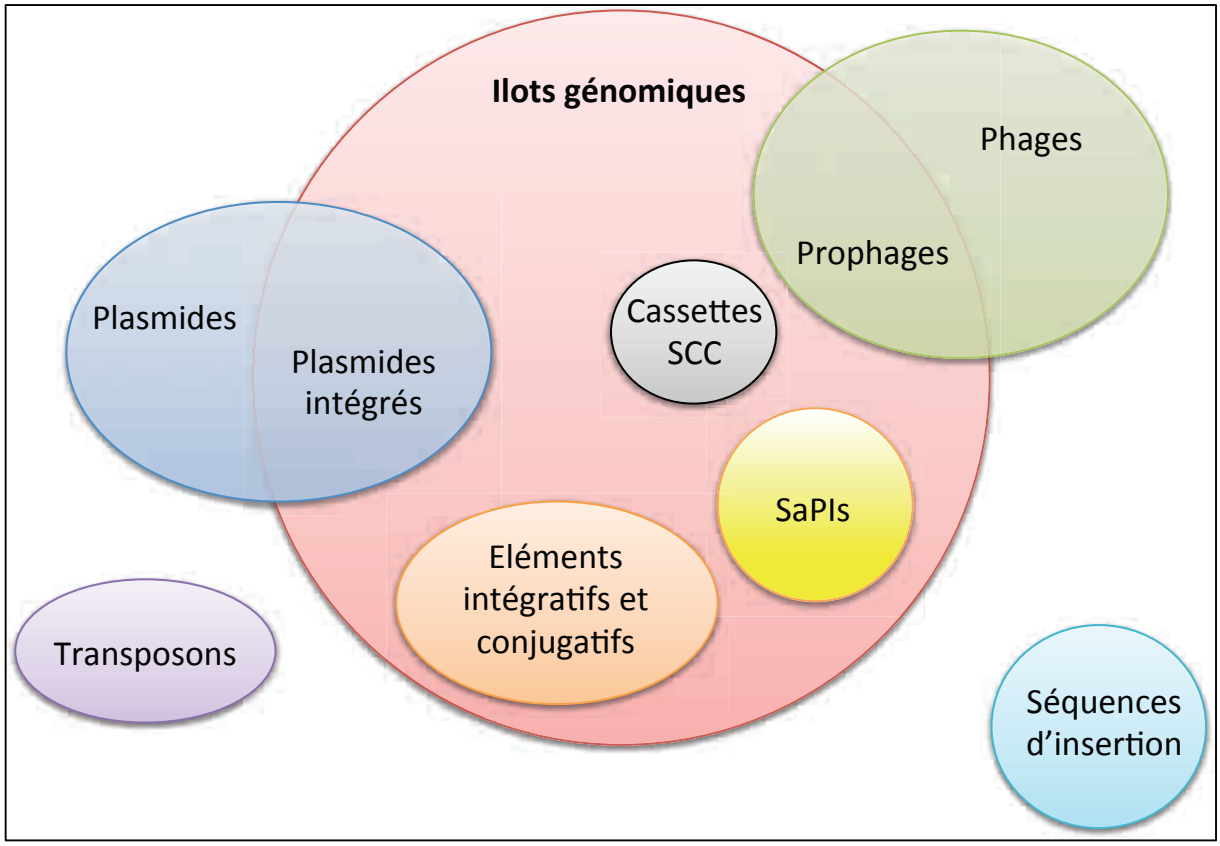



**Figure 9.** Ilots génomiques et intégration des différents éléments génétiques mobiles chez les staphylocoques.

## H. Synthèse et objectifs du travail de thèse

*S. lugdunensis* est donc un agent infectieux, commensal de la peau qui présente des caractéristiques microbiologiques inhabituelles le rapprochant de *S. aureus* mais il constitue surtout pour les cliniciens la cause d'infections particulièrement graves et fréquentes. Ces observations peuvent être mises en parallèle avec la découverte de

plusieurs facteurs de virulence potentiels sur le plan fonctionnel, génétique ou protéique. Pourtant, jusque-là, aucun élément dans la littérature n'a permis d'établir un lien de causalité entre ces facteurs de virulence *in vitro* et la sévérité des infections *in vivo.* Le travail de thèse que nous allons présenter a eu pour objectif d'explorer ce lien entre facteurs de virulence et manifestations cliniques des infections à *S. lugdunensis*.

Nous avons tout d'abord exploré de manière rétrospective la pathogénicité de *S. lugdunensis* aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, mais pour essayer de remplir le plus rigoureusement possible notre objectif nous avons développé une approche translationnelle en menant de front une étude clinique prospective et une analyse de la virulence de *S. lugdunensis* au sein du laboratoire. Nous avons posé l'hypothèse de l'existence d'un facteur de virulence produit par la bactérie et qui serait impliqué dans certaines présentations cliniques particulières (endocardites, infections ostéo-articulaires par exemple). Il s'agit d'un travail exploratoire pour lequel aucune donnée préalable n'était assez forte pour servir de point de départ, autrement dit aucun facteur de virulence décrit *in vitro* n'a jusque-là pu être relié à une manifestation clinique particulière chez l'homme. Par ailleurs, les facteurs de virulence décrits *in vitro* et présents dans la quasi-totalité des souches ne semblaient pas à même de répondre à notre objectif qui est d'identifier un facteur permettant de distinguer les souches entre elles et donc les patients entre eux. C'est pour ces raisons que nous avons décidé de rechercher de nouveaux facteurs de virulence potentiels au niveau du laboratoire tout en essayant de catégoriser le plus rigoureusement possible les patients.

Nous avons donc formulé un objectif principal et plusieurs objectifs secondaires :

**Objectif principal :**

- Rechercher l'existence d'un lien statistiquement significatif entre une manifestation clinique et un facteur de virulence.

**Objectifs secondaires** :

- Décrire les aspects cliniques des infections à *S. lugdunensis*
- Rechercher les facteurs de risque des infections à *S. lugdunensis*
- Etudier les caractéristiques génomiques de *S. lugdunensis* en réalisant un séquençage complet et en recherchant les facteurs possiblement impliqués dans sa virulence

# II. Matériels et méthodes

# A. Etudes préliminaires

## 1. Epidémiologie des staphylocoques aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

La mise en place de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse a radicalement changé le regard des microbiologistes et des cliniciens sur l'épidémiologie bactérienne hospitalière et communautaire. Cet outil qui a rapidement remplacé la majorité des méthodes d'identification biochimiques/phénotypiques bactériennes a été mis en place aux HUS de 2008 à 2010 pour l'identification bactérienne systématique en particulier des SCN issus de prélèvements biologiques. Nous avons mené une étude épidémiologique rétrospective comparant l'épidémiologie des SCN identifiés au laboratoire de microbiologies des HUS pendant la période 2007-2008 (identification phénotypique des SCN) et la période 2011-2012 (identification par spectrométrie de masse). Nous avons secondairement comparé les profils de sensibilité aux antibiotiques de ces souches bactériennes et déterminé la significativité microbiologique d'un échantillon aléatoire de 50 souches.

- **Identification phénotypique des SCN :** pendant cette première période et compte tenu du temps nécessaire à la caractérisation des staphylocoques, seules les souches répondant aux critères de significativité microbiologique recommandés par la Société Française de Microbiologie ont fait l'objet d'analyses ultérieures [131]. La première étape a consisté à rechercher la présence d'une coagulase libre à partir de plasma de lapin reconstitué (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France) et d'une coagulase liée à partir de particules de latex recouvertes de fibrinogène humain, de protéine A et de polysaccharides capsulaires de *S. aureus* (Pastorex Staph-Plus, Bio Rad). Les staphylocoques négatifs pour ces deux tests ont alors été considérés comme SCN (non *aureus*) et fait l'objet d'une identification d'espèce à l'aide de tests biochimiques (Vitek 2, Biomérieux, Craponne, France).

- **Identification par spectrométrie de masse :** pendant cette deuxième période la rapidité et le faible cout d'utilisation de la spectrométrie de masse ont permis l'identification systématique de tous les staphylocoques exceptés ceux isolés de prélèvements de gorges ou vaginaux (recherche de streptocoque β-hémolytiques uniquement) où, sauf exception, ils doivent être considérés comme des colonisants simples. Le spectromètre de masse utilisé au laboratoire de microbiologie est un MALDI-TOF MS : Matrix-Assisted Laser Desorbtion/Ionization-Time of Flight Spectrometry (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) associé à l'algorithme d'identification bactérienne Biotyper (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). La description de cette méthode d'identification des bactéries est détaillée plus loin dans le paragraphe II-C-3. L'identification de chaque SCN a été réalisée selon les recommandations du fabricant à partir d'une colonie bactérienne associée à 1 µl de matrice d'ionisation (donneur d'électrons) : acide α-4-cyano-hydroxy-cinnamique (α-HCCA). La matrice est préparée à la concentration de 3 mg/ml dans une solution à 50% d'acéto-nitrile, 2.5% d'acide tri-fluoro-acétique (TFA) et 47.5% d'eau distillée. Les spectres des masses peptidiques obtenus dans une fenêtre de 2 à 20 kDa sont ensuite analysés par le logiciel Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Pendant la durée d'étude, 3 versions du logiciel ont été successivement utilisées et correspondent à des versions toujours

plus riches en spectres de références : version 3.0.2.0 (3476 spectres dont 132 spectres d'espèces de staphylocoques), version 3.1.1.0 (3740 spectres dont 132 spectres d'espèces de staphylocoques) et la version 3.1.2.0 (3955 spectres dont 139 spectres d'espèces de staphylocoques). Un score d'identification supérieur ou égal à 2 est considéré comme fiable pour l'identification d'espèce, un score entre 1.7 et 1.99 comme intermédiaire et un score strictement inférieur à 1.7 comme insuffisant pour considérer l'identification comme fiable (recommandations du fabricant). Dans cette étude, tous les SCN avec un score d'identification strictement inférieur à 2 ont été exclus.

- **Sensibilité aux antibiotiques :** la sensibilité des SCN aux antibiotiques a été déterminée selon les recommandations de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testings) en vigueur au moment de l'étude à l'aide du VITEK 2 (Biomérieux) ou par la méthode de diffusion en milieu gélosé [132].

- **Significativité microbiologique des prélèvements (Tableau 6) :** la significativité microbiologique des souches isolées était évaluée en sélectionnant de manière aléatoire 50 souches (ou toutes les souches si le nombre total de souches identifiées pour une espèce donnée était inférieure à 50) de chaque espèce de SCN identifiées et en recherchant les critères de significativité recommandés dans l'EMCM (European Microbiology Criteria for Interpretation) [133].

**- Analyses statistiques :** la distribution des différentes espèces de SCN pendant ces deux périodes d'identification a été analysée à l'aide d'un test du $\chi^2$ avec une limite de significativité fixée à 0.05 ($p$<0.05). La distribution des niveaux de significativité microbiologique des 50 souches sélectionnées a aussi été comparée avec la même méthode statistique.

- **Autorisation du comité d'éthique** : selon l'avis du comité d'éthique cette étude ne requérait aucune autorisation particulière en particulier auprès des patients dans la mesure où les souches bactériennes uniquement ont été étudiées après anonymisation et sans recours aux données cliniques. Par ailleurs les souches bactériennes étudiées ont été considérées comme « déchets » biologiques.

**Tableau 6.** Critères microbiologiques de l'EMCM pour déterminer la significativité des prélèvements microbiologiques.

| Echantillon | Culture | Examen direct | Flore associée | Significativité |
|---|---|---|---|---|
| **Hémocultures** | ≥ 2 positives avec la même bactérie | | | Oui |
| | 1 positive/1 faite | | | Non (douteux en oncologie) |
| | 1 positive/2 faites | | | Non |
| **Urine** | ≥ $10^5$ ufc/ml[1] | ≥ $10^4$ leucocytes/ml | | Oui |
| | Autres résultats | | | Non |
| **Cathéter intravasculaire** | >1000 ufc/ml | | | Oui |
| | < 1000 ufc/ml et 1 hémoculture positive avec la même bactérie | | | Oui |
| | Autres résultats | | | Non |
| **Prélèvements superficiels** | ≥ 2 positifs | Cocci Gram + | | Oui |
| | 1 positif/1 réalisé | Cocci Gram + | 1 espèce | Oui |
| | Autres résultats | | | Non |
| **Prélèvements profonds** | ≥ 2 positifs sur 2 réalisés | | | Oui |
| | 1 positif | Cocci Gram + | 1 espèce | Oui |
| | 1 positif | Présence de PNN[2] | | Douteux |
| | Autre résultat | | | Non |

[1] ufc, unité format une colonie
[2] PNN, polynucléaires neutrophiles

### 2. Etude rétrospective de la pathogénicité de *Staphylococcus lugdunensis*

Après la mise en évidence de l'épidémiologie des SCN aux HUS et de la pathogénicité probable de *S. lugdunensis* nous avons voulu tester cette hypothèse dans le cadre d'une étude rétrospective de tous les dossiers des patients ayant présenté un prélèvement positif à *S. lugdunensis* aux HUS entre 2010 et 2014. L'ensemble des souches étant identifié par spectrométrie de masse au laboratoire de microbiologie des HUS.

- **Identification par spectrométrie de masse :** selon les mêmes modalités que celles décrites dans le paragraphe II-A-1.

- **Sensibilité aux antibiotiques :** selon les mêmes modalités que celles décrites dans le paragraphe II-A-1.

- **Significativité clinique des prélèvements (Tableau 7) :** tous les types de prélèvements ont été inclus dans cette étude. La significativité clinique reposait sur une étude du dossier du malade afin de savoir si la présence d'un *S. lugdunensis* dans un prélèvement correspondait à une infection certaine, douteuse ou s'il s'agissait d'une simple colonisation voire d'une contamination du prélèvement. Nous avons donc établi des critères composites à partir des critères de significativité microbiologique de l'EMCM et de critères strictement cliniques. Les critères cliniques sont issus des recommandations de plusieurs sociétés savantes. Les recommandations Européennes (EMCM) pour l'interprétation des hémocultures associées à des critères additionnels établis par David Souvenir et ses collaborateurs qui permettent d'interpréter une seule hémoculture positive à SCN en évaluant globalement l'état septique du patient, l'absence de diagnostic différentiel et la présence d'une porte d'entrée [133][134]. Ces critères de ont déjà été utilisé dans l'étude de bactériémies à *S. lugdunensis* avec une bonne performance diagnostique [135]. Concernant les infections ostéo-articulaires nous avons retenus les critères de la société Américaine d'infectiologie [136]. Enfin, les prélèvements de la peau et des tissus mous ne font pas l'objet de recommandations spécifiques et nous avons établi des critères locaux.

- **Analyses statistiques :** les caractéristiques démographiques et cliniques des patients ont été comparées à l'aide d'un test du $\chi^2$ ou d'un test exact de Fisher avec une limite de significativité fixée à 0.05 ($p$<0.05).

- **Autorisation du comité d'éthique :** cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de la région est (CPP IV est, Strasbourg, France) qui a requis une non opposition orale des patients à l'utilisation de leurs données.

**Tableau 7.** Critères permettant de définir le statut clinique des patients présentant un prélèvement positif à *S. lugdunensis*

| Echantillon | Culture | Clinique | Significativité |
|---|---|---|---|
| **Hémocultures** | ≥ 2 positives | Sepsis | Oui |
| | 1 positive/1 faite | Sepsis | Douteux<br>Oui si critères de Souvenir et col.[134] |
| | 1 positive/2 faites | Pas de sepsis | Non |
| **Prélèvements ostéo-articulaires** | ≥ 2 positifs | Ostéite<br>Arthrite<br>Avec ou sans matériel | Oui |
| | 1 positif/1 fait | Ostéite<br>Arthrite<br>Avec ou sans matériel | Douteux |
| | 1 positif | Pas de signes d'infection | Non |
| **Peau et tissus mous** | 1 positif en culture pure | Signes infectieux locaux | Oui |
| | 1 positif polymicrobien | Signes infectieux locaux | Douteux |
| | 1 positif | Pas de signes infectieux | Non |

## B. Etude prospective de la virulence de *Staphylococcus lugdunensis* dans les infections sévères : étude VISLISI

### 1. Design de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective monocentrique aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg regroupant plusieurs hôpitaux : l'hôpital civil, le nouvel hôpital civil, l'hôpital de Hautepierre, le centre de chirurgie orthopédique et de la main d'Illkirch (CCOM) et le centre médico-chirurgical d'obstétrique de Schiltigheim. Les HUS regroupaient en 2016, 2428 lits d'hospitalisation et toutes les spécialités médicales et chirurgicales sont représentées.

#### a) Investigateurs et équipes associées

La liste des investigateurs cliniques est résumée dans le Tableau 8. La liste des laboratoires et équipes scientifiques associées est résumée dans le Tableau 9.

**Tableau 8.** Investigateurs cliniques de l'étude VISLISI

| Qualité | Titre | Nom | Service Hospitalier |
|---|---|---|---|
| **Investigateur Principal** | PU-PH | Yves Hansmann | Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Nouvel Hôpital Civil |
| **Investigateur Associé** | PHU | Xavier Argemi | Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Nouvel Hôpital Civil |
| **Investigateur Associé** | PH | Nicolas Lefebvre | Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Nouvel Hôpital Civil |
| **Investigateur Associé** | PH | Kilifa Meghit | Service d'Immunologie Clinique, Nouvel Hôpital Civil |
| **Investigateur Associé** | CCA | Nawal Douiri | Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Nouvel Hôpital Civil |
| **Investigateur associé** | CCA | Marion Baldeyrou | Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Nouvel Hôpital Civil |
| **Investigateur associé** | CCA | Cécile Ronde-Oustau | CCOM, illkirch |

**Tableau 9.** Laboratoires et équipes scientifiques associées à l'étude clinique VISLISI

| Laboratoire associé | Directeur du laboratoire | Equipe impliquée |
|---|---|---|
| **Virulence Bactérienne Précoce – EA 7290 - Faculté de Médecine de Strasbourg** | Dr Gilles Prévost | Daniel Keller (ingénieur de recherche)<br>Dr Philippe Riegel (médecin, microbiologiste) |
| **Immunologie Rhumatologie Moléculaire - INSERM U1109 – Université de Strasbourg** | Pr Seiamak Bahram | Paul Nicodème (ingénieur de recherche) |
| **Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique – UMR 71-78 (CNRS-UdS) - Institut pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg** | Pr Sarah Cianférani | Jean-Marc Strub (ingénieur de recherche) |
| **Laboratoire de Santé Publique – Hôpitaux Universitaires de Strasbourg** | Pr Nicolas Meyer | Mickael Schaeffer (ingénieur de recherche) |

b) Promoteur

L'étude VISLISI est promue par les HUS et fait l'objet d'un Projet de Recherche Interne (PRI 2013 – HUS n° 5616).

c) Financement

L'étude VISLISI est financée par les fonds propres de l'EA 7290 et par l'obtention par l'obtention de la bourse « Jeune chercheur » du Collège des Enseignants de Maladies Infectieuses et Tropicales (20 000 euros).

d) Objectifs de l'étude

**- Objectif principal :**

- Rechercher la présence de facteurs de virulence dans les infections sévères à *S. lugdunensis.*

**- Objectifs secondaires :**

- Etablir les caractéristiques cliniques des infections à *S. lugdunensis*.

- Analyser les facteurs de risque associés aux infections sévères sur le plan clinique (antécédents et comorbidités, traitements immunosuppresseurs), immunologiques (réponse inflammatoire, acteurs du système immunitaire).
- Etablir les caractéristiques spectrométriques de *S. lugdunensis*.
- Etudier les caractéristiques génétiques de *S. lugdunensis*.

e) Critères d'inclusion et d'exclusion

**- Critères d'inclusion :** ils ont été basés sur l'identification de patients qui présentaient des infections certaines à *S. lugdunensis* et répondant à certains critères sociodémographiques :

- Hommes ou femmes volontaires âgés de 18 ans ou plus (exclusion des mineurs compte tenu du caractère exploratoire de cette étude interventionnelle et de l'absence de bénéfice attendu à leur inclusion, préconisation du comité d'éthique).
- Patients affiliés à un régime de sécurité sociale.
- Sujet ayant été informé des résultats de la visite médicale préalable.
- Consentement éclairé daté et signé par l'investigateur et le participant avant le début de toute procédure liée à l'essai.
- Infection à *S. lugdunensis* établie selon des critères stricts et détaillés dans le Tableau 10.

Les critères d'infection détaillés dans le Tableau 10 sont le résultat des 2 études préliminaires décrites dans les paragraphes précédents qui nous ont permis d'affiner les éléments permettant de poser le diagnostic d'infection à *S. lugdunensis*.

**- Critères d'exclusions :** les critères retenus ont été les suivant :

- Sujet présentant un prélèvement positif à *S. lugdunensis,* mais ne remplissant pas les critères d'infection sus cités.
- Sujet en situation d'urgence.
- Sujet privé de liberté ou sous sauvegarde de justice.
- Sujet sous tutelle.
- Sujet sous curatelle.
- Sujet en période d'exclusion dans un autre protocole.

**Tableau 10.** Critères permettant de définir lune infection certaine à *S. lugdunensis* dans le cadre de l'étude VISLISI.

| Echantillon | Culture | Clinique | Flore associée | Significativité |
|---|---|---|---|---|
| **Hémocultures** | ≥ 2 positives | Sepsis | Oui ou non | Oui |
| | 1 positive/1 faite | Sepsis | Non | Oui si remplit les critères de Souvenir et col.[1] [134] |
| | 1 positive/2 faites | Pas de sepsis | Peu importe | Non |
| **Prélèvements ostéo-articulaires** | ≥ 2 positifs | Ostéite<br>Arthrite<br>Avec ou sans matériel | Oui ou non | Oui |
| | 1 positif/1 fait | Ostéite<br>Arthrite<br>Avec ou sans matériel | Non | Oui si le prélèvement ne vient pas d'une niche connue [2] |
| | 1 positif | Pas de signes d'infection | Peu importe | Non |
| **Peau et tissus mous** | 1 positif/1 fait | Signes infectieux locaux | Non | Oui |
| | ≥ 2 positifs | Signes infectieux locaux | Peu importe | Oui |
| | 1 ou plusieurs positif | Signes infectieux locaux | Oui | non |
| | 1 ou plusieurs positifs | Pas de signes infectieux | Peu importe | Non |
| **Urines** | Bactériurie ≥ $10^5$/ml<br>Leucocyturie ≥ $10^4$/ml | Signes d'infection urinaire haute | Non | Oui |
| | Toute autre | | | Non |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | situation | | |
| **Cathéter central** | Comptage ≥ 1000 UFC/ml[3] | Signes infectieux locaux | Oui |
| | Toute autre situation | | Non |

[1] critères de Souvenir et coll., ils sont détaillés dans la publication indiquée en référence.
[2] niche connue, il s'agit des niches où il a été démontré que *S. lugdunensis* faisait partie de la flore résidente : le nez, les creux axillaires et les plis inguinaux [37][36][38].
[3] comptage pathologique selon la méthode de Cléri modifiée par Brun et Buisson [137][138].

### f) Critères d'évaluation

**- Critères d'évaluation principaux :** l'objectif étant de recherche des facteurs de virulence dans les infections sévères à *S. lugdunensis* nous avons défini 8 groupes de patients sur la base de caractéristiques qui feraient évoquer la présence de facteurs de virulence potentiels :

- Sepsis *VS* pas de sepsis.
- Infection profonde *VS* infection superficielle.
- Présence de matériel *VS* pas de matériel.
- Présence d'une collection *VS* pas de collection.
- Localisations septiques secondaires *VS* pas de localisations septiques secondaires.
- Porte d'entrée présente *VS* absence de porte d'entrée.
- Bactériémie *VS* pas de bactériémie.
- Présence d'un déficit immunitaire connu acquis ou congénital *VS* pas de déficit immunitaire.

Parallèlement, nous avons mis en place une recherche systématique de facteurs de virulence au sein du laboratoire

- Facteurs de virulence recherchés sur le plan fonctionnel : entérotoxines, TSST-1, leucotoxine staphylococcique, épidermolysines, β-hémolysine.
- Recherche antigénique : entérotoxines staphylococciques A, B, C, D, E, G, H, I, TSST-1, LukS-PV, LukF-PV, HlgA-B-C, LukE, LukD.
- Purification de certaines protéines en cas d'identification fonctionnelle ou antigénique (leucotoxines, épidermolysines et entérotoxines).

**- Critères d'évaluation secondaires :** les critères retenus ont été les suivant :

- Caractéristiques cliniques des infections à *S. lugdunensis* : antécédents et comorbidités (score de Charlson), histoire de la maladie, manifestations cliniques, paramètres biologiques biochimiques, hématologiques, inflammatoires, résultats des examens complémentaires menés dans le cadre de leur prise en charge, réponse au traitement, morbi-mortalité [139].

- Facteurs de risque associés aux infections sévères sur le plan clinique (antécédents et comorbidités), immunologiques (réponse inflammatoire, phénotypage lymphocytaire, dosage du complément, dosage des immunoglobulines).

- Caractéristiques spectrométriques de *S. lugdunensis* : analyse du profil spectrométrique des extractions protéiques issues des souches bactériennes.

- Caractéristiques génétiques de *S. lugdunensis* : séquençage *de novo* de 10 souches.

g) Plan expérimental

Chaque patient éligible a été vu en consultation pour l'inclusion et le recueil des données para-cliniques et une deuxième consultation a été systématiquement organisée à 1 mois de l'inclusion pour évaluer la guérison et réaliser un bilan sanguin de contrôle. Ce deuxième prélèvement sanguin propre à l'étude a aussi permis d'établir une « échantillothèque » avec conservation du sang total et sur tube EDTA. Ces éléments sont résumés dans le Tableau 11.

**Tableau 11.** Plan expérimental de l'étude VISLISI.

| | **Présélection** | **Inclusion** | **Suivi** |
|---|---|---|---|
| | J0– J2 | J0-J2 | J30 |
| **Information du sujet** | X | | |
| **Consentement éclairé signé** | | X | |
| **- Evaluation clinique** | | X | |
| **- Prélèvement sanguin :** Hémogramme, bilan rénal, bilan hépatique, bilan inflammatoire | | X | |
| **- Evaluation clinique** | | | X |
| **- Prélèvement sanguin** Hémogramme, phénotypage lymphocytaire, dosage du complément, dosage pondéral des immunoglobulines | | | X |

### h) Autorisation du comité d'éthique

La recherche a été menée en conformité avec les principes de la déclaration d'Helsinki et les bonnes pratiques cliniques. Chaque sujet éligible a reçu une information complète et éclairée sur l'étude, oralement et par l'intermédiaire d'un document écrit. Le consentement signé a été recueilli secondairement après un délai de réflexion propre à chaque patient.

Les données à caractère personnel ont été traitées dans les conditions définies par la loi n°78-17 du 06 janvier 1978 relative à l'informatique et aux libertés modifiée par la loi n°2004-801 du 06 aout 2004 et des textes réglementaires pris pour son application. Conformément à l'article R.5121.13 du Code de la Santé Publique, les investigateurs et toutes les personnes appelées à collaborer à l'essai sont tenus au secret professionnel. Tout rapport, communication orale ou écrite occasionnée par cette étude est transmise au promoteur et publiée conformément à la charte de publication des HUS.

L'étude VISLISI a reçu un avis favorable du comité de protection des personnes est IV (CPP IV) et est enregistré sous le numéro ID-CRB 2013-A01057-38.

## 2. Méthodologie statistique

La méthodologie statistique a été construite avec la collaboration du laboratoire de Santé Publique des HUS.

**Calcul du nombre de sujets nécessaires :** il s'agit d'une étude exploratoire, prospective dont l'objectif est de mettre en évidence le rôle d'un éventuel facteur de virulence dans les infections à *S. lugdunensis*. Les patients seront classés en 8 groupes détaillés dans les critères d'évaluation principaux et comparés en fonction de la présence d'éventuelles toxines (facteurs de virulences). La taille de l'échantillon a été estimée en fonction des paramètres suivant : une significativité globale de 5% et une puissance de 80%. L'ampleur de l'effet clinique d'une éventuelle toxine devra-t-être large, au moins 60%. Compte tenu du nombre de tests statistiques qui seront potentiellement réalisés, la significativité individuelle de chaque test est fixée à un risque alpha de 0,00037. A partir de la formule de Casagrande et Pike, on peut évaluer que le nombre de sujets nécessaire pour rejeter l'hypothèse nulle est de 82 si les proportions respectives dans chaque groupe sont de 25 et 75% et que la taille des groupes est identique. Pour une différence plus importante, par exemple 20 *vs.* 80%, 58 sujets sont nécessaires. Ces calculs donnent donc une idée approximative du nombre de sujets nécessaires dans la mesure où le nombre de sujets dans chaque groupe ne peut être prévu à l'avance. En conclusion, l'inclusion de 82 patients est nécessaire dans cette étude exploratoire.

**Analyse des résultats :** les variables continues sont exprimées par leurs moyennes et leur déviation standard et les variables catégorielles par leur fréquence et leur pourcentage. Les analyses statistiques inférentielles ont été menées selon l'approche bayésienne. Les relations entre les facteurs de virulence potentiels et les groupes de patients ont été analysés à l'aide de régressions logistiques. Les caractéristiques cliniques et para-cliniques ont été évaluées à l'inclusion et à la visite de suivi. Les

résultats sont présentés sous la forme d'odds ratio (OR) avec leur intervalle de crédibilité à 95% à posteriori, mais aussi avec la probabilité *Pr* que cet OR soit strictement supérieur à 1 : *Pr*=Pr(OR>1). Lorsque cette valeur *Pr* est proche de 1, cela indique une probabilité forte que l'OR soit supérieur à 1. Lorsque cette valeur *Pr* est proche de 0, cela indique une probabilité forte que l'OR soit inférieur à 1. Une probabilité *Pr* proche de 0,5 indique qu'il y a peu de chances que l'OR soit significatif, autrement dit il y a peu de chance que les 2 éléments considérés aient une association statistiquement significative, positive ou négative. Rappelons que les méthodes Bayésiennes n'utilisent pas la *p-valeur* utilisée dans le cadre fréquentiste et que la valeur *Pr* ici indiquée ne doit pas être confondue avec cette *p-valeur*. La distribution a priori du *log(OR)* est une distribution gaussienne modérément informative ((N (m=0, s2=2.33)), ce qui implique qu'a priori, l'OR a 95% de chances d'être dans l'intervalle [1/20 ; 20]. Suivant les principes de la théorie bayésienne, l'inférence statistique est basée sur la distribution a posteriori de l'OR. Les analyses bayésiennes ont été réalisées avec les logiciels JAGS (v 4.2.0) et R (v 3.2.0). Pour chaque analyse, après une période de chauffe de 5000 itérations, 100000 itérations ont été réalisées et la convergence a été vérifiée en utilisant des graphiques de type séries chronologiques pour suivre la chaine MCMC sur chaque itération. La convergence a été constatée dans tous les cas.

## 3. Mise en place de l'étude

### a) Recueil des données cliniques

Toutes les données de l'étude clinique ont été saisies par l'intermédiaire du logiciel CleanWeb (v 164, Télémédecine Technologies, Boulogne-Billancourt, France). Les données cliniques ont toutes été contrôlées en fin d'étude afin de vérifier les critères d'inclusion/exclusion, l'exactitude des paramètres recueillis et la catégorisation des malades. Un technicien de recherche clinique a aussi contrôlé la qualité du recueil informatique par la recherche d'anomalies sur le logiciel CleanWeb : valeurs erronées, données manquantes.

### b) Recueil des souches bactériennes

Tous les prélèvements positifs à *S. lugdunensis* ont été identifiés dans les 24h à partir du laboratoire de microbiologie à l'aide du logiciel Glims (v 8.10.11). Les souches issues de patients inclus ont été identifiées en fonction du numéro d'inclusion de VISLISI_1 à VISLISI_82. Les souches issues de prélèvements contaminés ou de simples colonisations ont aussi été conservées et identifiées en fonction de leur ordre de recueil : C_1, C_2 … etc. Les souches issues d'infections, mais en l'absence d'inclusion du malade dans le protocole clinique, ont été identifiées en fonction de leur ordre de recueil : I_1, I_2… etc.

c) Conservation des souches bactériennes

Toutes les souches bactériennes recueillies ont été repiquées afin de confirmer l'identification bactérienne et congelées à -82°C à l'EA7290. Toutes les souches princeps ont fait l'objet de plusieurs aliquotes pour les utilisations ultérieures et afin d'éviter toutes mises en cultures itératives qui pourraient impacter le phénotype bactérien. Le milieu de congélation utilisé associe un bouillon cœur cervelle (milieu Brain Heart Infusion, BHI) stérilisé et 10% de glycérol.

BHI : extrait de cervelle de veau 12.5 g/l, extrait de cœur de bœuf 5 g/l, protéines de lait 10 g/l, glucose 2 g/l, NaCl 5 g/l, $Na_2HPO_4$ 2.5 g/l.

## C. Analyses bactériologiques

### 1. Identification des souches bactériennes

L'identification des souches bactériennes a été réalisée par spectrométrie de masse selon la méthodologie décrite au paragraphe II-A-1.

### 2. Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés selon la méthodologie décrite au paragraphe II-A-1.

### 3. Analyse des profils en spectrométrie de masse

a) Rappels méthodologiques

La spectrométrie de masse est utilisée dans un grand nombre de domaines dont la protéomique bactérienne [140][141]. Cette technique d'analyse structurale d'un composé s'adresse à des substances placées en phase gazeuse, ionisées puis analysées. On retrouve de manière centrale et constante un échantillon (source d'ions), un analyseur et un détecteur. L'analyseur mesure le rapport entre la masse ($m$) et la charge ($q$) de chaque espèce ionique. De façon conventionnelle ce n'est pas la charge $q$ qui est mesurée mais sa valeur absolue $z$. Chaque ion est donc caractérisé par une valeur $m/z$ qui lui est propre. Le détecteur mesure en fonction des différentes valeurs de $m/z$ l'intensité du signal correspondant. Le spectre correspond donc à la variation du courant ionique en fonction de $m/z$. Dans le cadre de la microbiologie on utilise le plus souvent des spectromètres de masse à temps de vol, l'échantillon excité par un LASER est associé à une matrice d'ionisation, l'ensemble est analysé avant représentation graphique des différents pics de $m/z$ présents dans l'échantillon (Figure 10) [140].

**Ionisation de l'échantillon :** les échantillons en protéomique bactérienne sont fragiles et de grande taille. Ce sont des molécules polaires, peu volatiles et sensibles à la chaleur. Leur vaporisation nécessite un transfert rapide et bref d'énergie pour éviter toute dégradation thermique. Il faut dans le même temps pouvoir ioniser ces molécules. Cette double exigence est respectée avec l'utilisation d'une part d'une source énergétique comme les photons d'un laser et d'autre part par l'utilisation d'un vecteur d'ionisation

appelée matrice qui protège la source d'une ionisation directe. Ce phénomène d'évaporation et d'ionisation simultanée est appelé désorption. Le choix d'une matrice est fondamental en fonction de l'objectif recherché et de l'échantillon analysé. La matrice en spectrométrie de masse est un composé aromatique cristallisable déposé toujours en excès par rapport à l'échantillon ($10^4$ molécules de matrice pour une d'échantillon). Une fois l'échantillon séché sur une plaque, la matrice choisie est déposée sous la forme d'une solution saturée et l'évaporation du solvant utilisé va permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon. La source énergétique choisie ionise directement la matrice qui secondairement ionise les molécules de l'échantillon par transfert de protons. L'énergie fournie par la source permet dans le même temps l'évaporation de l'échantillon déposé. Le passage en phase gazeuse des molécules ionisées permet ensuite leur transfert vers l'analyseur. Le type d'ionisation dépend du type d'échantillon. Dans le cas des peptides il s'agit d'une ionisation positive par l'intermédiaire de groupements accepteurs de charges positives :

$R\text{-}NH_2 + H^+ \rightarrow R\text{-}NH_3^+$

Il existe de nombreuses matrices possibles dont certaines sont détaillées dans le Tableau 12.

Il existe plusieurs méthodes d'ionisation indirecte de l'échantillon dont :

- l'électrospray : il consiste à appliquer un champ électrique fort à travers un capillaire sur un liquide contenant l'échantillon. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide en sortie de capillaire formant un nébulisât hautement chargé. L'évaporation du solvant permet progressivement de réduire la taille des gouttelettes formées jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant provoquant leur désorption.

- le LASER : les photons qu'il produit fournissent l'énergie nécessaire à l'ionisation de la matrice et à la vaporisation de l'échantillon. En protéomique bactérienne le LASER UV à $N_2$ est le plus souvent utilisé. Sa longueur d'onde est de 337 nm et chaque photon apporte une énergie de 3.7 eV.

Il existe actuellement d'autres méthodes d'ionisation que nous ne détaillerons pas ici : l'impact électronique, la photoionisation à pression atmosphérique, le Fast Atom Bombardment et l'ionisation chimique.

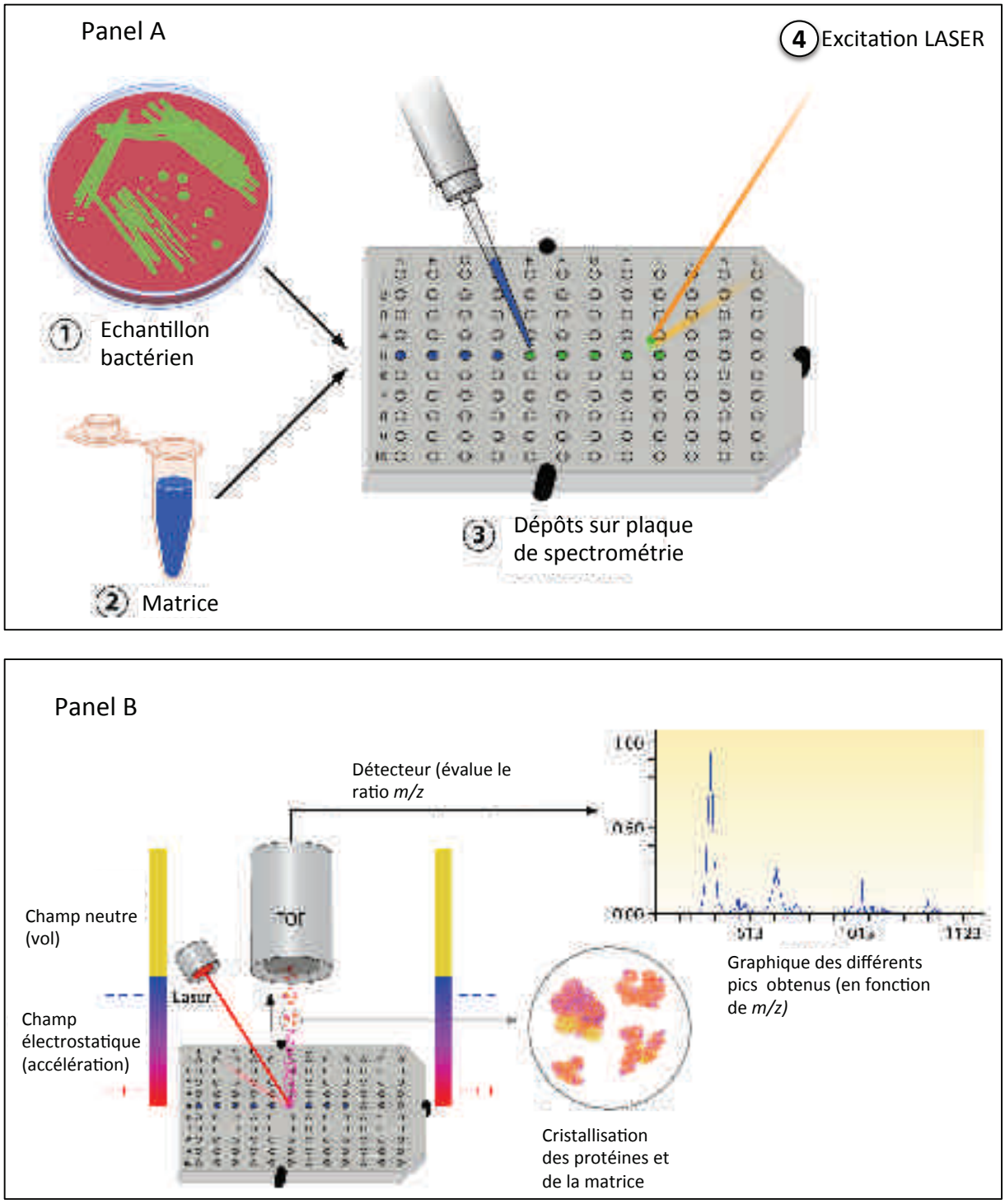



**Figure 10.** Représentation schématique de la spectrométrie de masse : dépôt de l'échantillon (Panel A) et calcul du temps de vol (Panel B). (Reproduit et traduit de Andrew E. Clarck et coll., 2013).

**Tableau 12.** Matrices les plus souvent utilisées en spectrométrie de masse lorsqu'une ionisation indirecte des échantillons est nécessaire.

| Composé | Abréviation | Analyte |
|---|---|---|
| acide α-cyano-4-hydroxy-cinnamique | α-HCCA | Peptides de 0.7 à 10 KDa<br>Hydrates de carbone |
| Acide sinapique | SA | Peptides de 10 à 150 KDa<br>Dendrimères |
| Acide 2,5-dihydroxybenzoique | 2,5-DHB | Peptides<br>Hydrates de carbone |
| 2,5-dihydroxyacétophénone | 2,5-DHAP | Glycoprotéines de 8 à 100 KDa |
| Acide hydroxy 3-piconilique | 3-HAP | Oligonéucléotides de 1 à 30 KDa |

**- Analyse de l'échantillon :** l'analyseur a pour objectif de séparer les ions produits en fonction de leur rapport *m/z*, que ce soient les ions issus de l'échantillon mais aussi des ions issus de la matrice dans le cadre par exemple du MALDI. L'analyseur procède par l'application de champs électriques ou magnétiques sur le faisceau de particules ionisées produites qui vont être déviées secondairement. L'analyseur à temps de vol est le plus simple dans son principe et le plus souvent utilisé en protéomique bactérienne en particulier dans les laboratoires de microbiologie, on parle d'analyseur de type Time Of Flight (TOF). Il repose sur l'analyse du temps de vol de chaque molécule ionisée dans un tube de longueur connue et après application à la source d'ions d'une différence de potentiel constante $V_0$. Cette tension confère une énergie cinétique ($Ec=1/2mv^2$) homogénéisée à la valeur $zV_0$ ($z$ étant la charge de l'ion analysé).

$$Ec= zV_0=1/2mv^2 =1/2m(d^2/t^2)$$

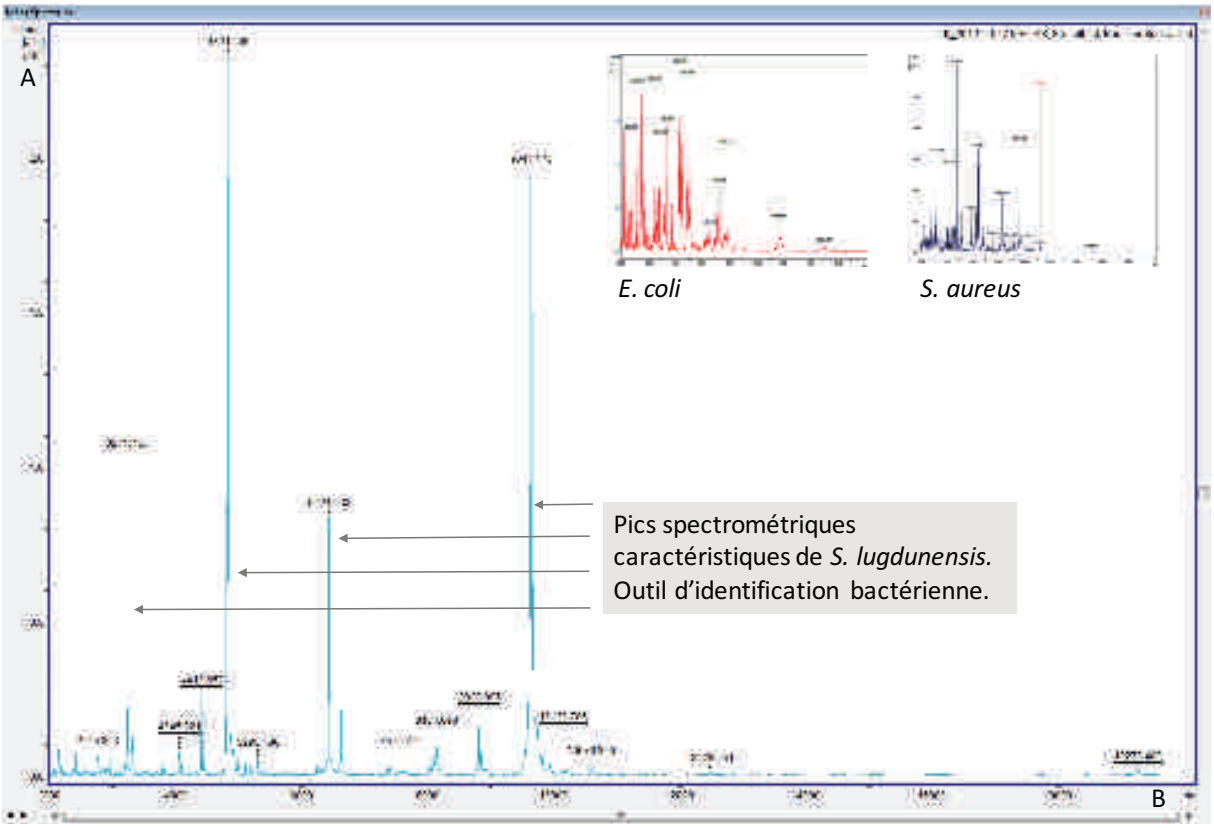
Cette égalité contient le rapport *m/z* que l'on peut déduire directement de la vitesse *v*, c'est à dire du temps *t* que met un ion donné à franchir la distance *d*.

$$m/z = 2V_0(t2/d^2)$$

Le rapport *m/*z est donc directement dépendant du temps de vol car $V_0$ et *d* sont connus. Autrement dit, après l'accélération initiale induite par $V_0$ les ions volent d'autant plus vite qu'ils sont plus légers et l'analyseur mesure le temps que met l'ion à parvenir au détecteur. En mode linéaire un analyseur possède une faible capacité de discrimination des ions, car la longueur du tube est limitée par son encombrement. Pour y pallier les analyseurs actuels utilisent 2 méthodes : l'allongement « artificiel » du tube par des miroirs appelés réflectrons, et par l'homogénéisation des énergies cinétiques dans la source avant leur injection dans l'analyseur (extraction retardée). D'autres analyseurs peuvent être utilisés et nous ne détaillerons pas leur fonctionnement ici : le spectromètre de masse à transformation de Fournier, l'Orbitrap, le piège ionique, le triple quadripôle et le secteur magnétique.

**- Détection :** il existe différents types de détecteurs mais les plus souvent utilisés sont des détecteurs multiplicateurs d'électrons. Le principe de base repose sur la production d'électrons lorsque le courant ionique rencontre un solide (conversion ions-électrons) de manière à avoir un signal mesurable électriquement. Les ions ayant terminé leur

trajet dans l'analyseur viennent percuter en fin de parcours une électrode et émettent des électrons qui sont à leur tour accélérés pour venir frapper un multiplicateur d'où sera émis une nouvelle quantité d'électrons déterminée par la quantité initiale, et ainsi de suite, cette électrode multiplicatrice d'électrons est appelée dynode. Ce processus permet de produire des courants mesurables puisqu'un ion peut générer $10^6$ à $10^7$ électrons. Ces courants sont finalement interprétés sous la forme d'un graphique représentant en fonction de l'intensité du signal la masse de l'ion considéré, prenant la forme d'un pic comme dans l'exemple de la Figure 11.




A. intensité des pics en unités arbitraires (u.a.)
B. poids moléculaire correspondant au pic représenté en Daltons.

**Figure 11.** Exemple de représentation d'un profil spectrométrique d'une souche de *S. lugdunensis* obtenu par MALDI TOF/MS et comparaison en fenêtre à deux tracés de *S. aureus* et *E. coli*.

### b) Objectifs du travail en spectrométrie de masse

Plusieurs publications ont montré la capacité de la spectrométrie de masse et notamment du MALDI TOF/MS de réaliser des typages de souche dans le cadre par exemple d'épidémies hospitalières à la recherche d'un clone [81][82][83]. D'autres publications suggèrent sa capacité à identifier des pics d'intérêt comme celui de la delta hémolysine de *S. aureus* (une toxine produite par *S. aureus*) aux alentours de 3 kDa, c'est

à dire dans une fenêtre d'identification compatible avec le spectromètre de masse utilisé au laboratoire de microbiologie de Strasbourg [79][78]. L'objectif a donc été double :

- Rechercher de pics permettant de discriminer les souches en fonction de leur provenance clinique.

- Rechercher des clusters.

Les mesures spectrométriques de masse ont été réalisées pour ce travail sur un spectromètre de masse à temps de vol, Microflex LT (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) avec un LASER à $N_2$ à 337 nm avec une fréquence de répétition des tirs de 60 Hz, une durée de 3 ns par tir (Figure 12). Le laser est contrôlé par le logiciel FlexControl (v 3.4, Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Après désorption les ions sont accélérés par une tension de 20 kV appliquée sur la plaque puis par une 2ème grille successive mises sous tension à 20 kV. Le nombre de tirs est fixé à 140 par dépôt afin d'obtenir un spectre optimal. A titre d'exemple, 40 à 80 tirs sont généralement suffisants pour obtenir un spectre suffisamment représentatif, permettant d'identifier *S. lugdunensis*. Mais l'objectif est ici d'obtenir le plus grand nombre possible de pics dans le spectre.

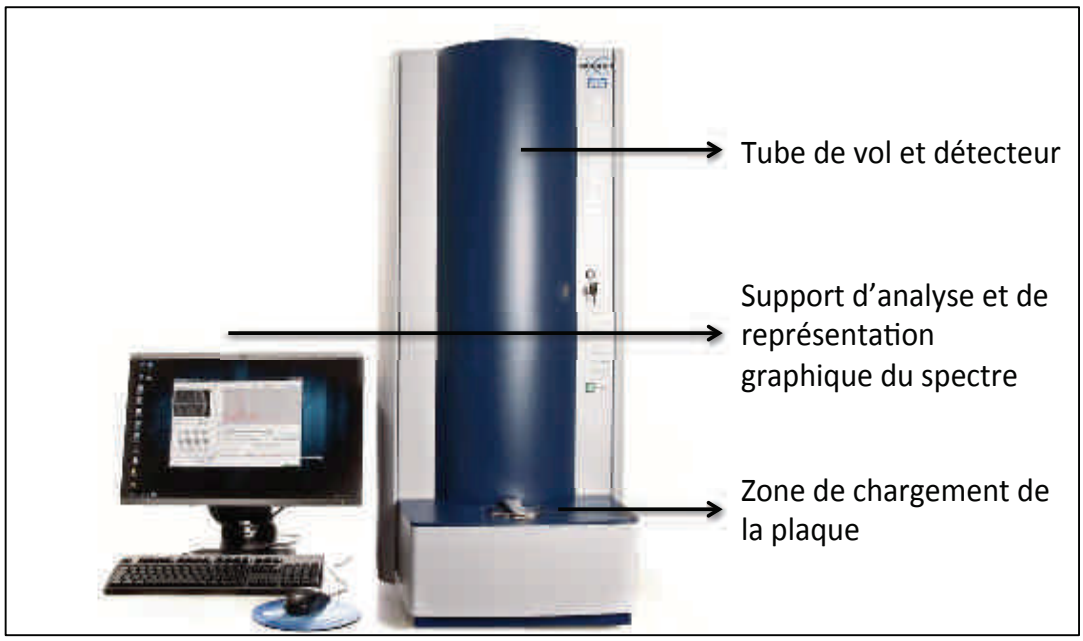



**Figure 12.** Spectromètre de masse utilisé au laboratoire de Microbiologie de Strasbourg et dans le cadre de cette étude (MALDI-TOF MS, Microflex LT, Bruker Daltonics).

### c) Caractérisation des profils spectrométriques

Les profils spectrométriques pour une souche bactérienne donnée ont été produits dans plusieurs conditions et à partir de plusieurs échantillons :

- Dépôts direct d'une colonie bactérienne : à 12h, 24h ou 72h de mise en culture.

- Dépôt d'extractions protéiques : protéines extraites le jour même ou congelées et protéines extraites selon 2 protocoles différents.

**- Souches utilisées :** nous avons inclus dans cette partie du travail l'ensemble des souches issues de l'étude VISLISI mais nous avons aussi utilisé des souches issues de prélèvements contaminés ou de simples colonisations puisque l'étude VISLISI a consisté pour chaque souche identifiée au laboratoire de microbiologie à établir chez les patients et de manière prospective s'il s'agissait d'une infection certaine ou pas.

**- Culture bactérienne et extraction protéique :** les souches bactériennes sont cultivées sur milieux gélosés au sang de mouton 24h à 37°C. Cinq colonies (soit 5 à 10 mg de culture bactérienne) sont prélevées et mises en suspension dans 300 µL d'eau stérile, mises en agitation avant l'addition de 900 µL d'éthanol pur. La suspension est homogénéisée avant centrifugation à 10000 x *g* pendant 2 min et élimination du surnageant. Le culot bactérien est alors remis en suspension par l'ajout de 50 µL d'acide formique 70% (v/v) suivi d'un vortexage et de l'ajout de 50 µL d'acétonitrile avant homogénéisation délicate. Le mélange est centrifugé 2 min à 10000 x *g* et le surnageant transféré dans un tube Eppendorf. Il s'agit des protéines cytoplasmiques solubilisées.

**- Choix et préparation de la matrice :** La matrice d'α-HCCA est la plus adaptée aux analyses protéomiques de *S. lugdunensis*. La préparation est identique à celle détaillée dans le paragraphe II. A. 1.

**- Dépôt des échantillons :** nous réalisons pour chaque échantillon 10 dépôts de 1 µL chacun. Après séchage à l'air libre (environ 10 minutes), nous ajoutons 1 µL de matrice avant nouveau séchage à l'air libre ce qui va permettre la co-cristallisation de l'échantillon. Une fois les dépôts terminés la plaque est chargée dans le spectromètre de masse.

**- Identification microbiologique :** chaque souche a fait l'objet d'une nouvelle identification avant toute autre analyse à l'aide du logiciel Maldi Biotyper Compass Explorer (v 4.1.40, Bruker Daltonics) selon les instructions du fabricant (paramètres détaillés dans le paragraphe II. A. 1.). Seules les souches avec un score d'identification fiable (≥2) ont été analysées. En cas de doute la souche princeps a fait l'objet d'un repiquage et d'une ré-identification complète.

### d) Recherche de pics discriminants

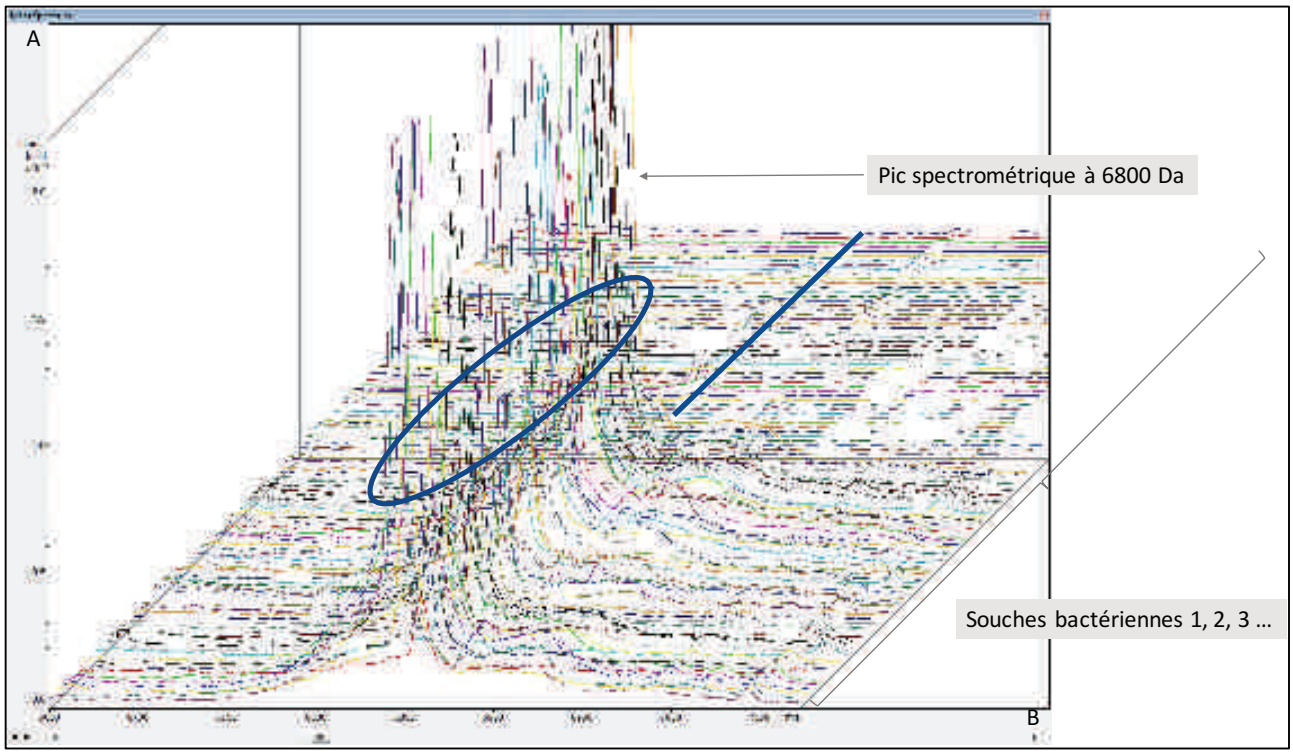
La recherche de pics discriminants a été réalisée à l'aide du logiciel FlexAnalysis (v 3.4, Bruker Daltonics). Ce logiciel permet la visualisation des spectres, des changements d'échelle et des alignements de spectre. Nous avons donc dans chacune des conditions expérimentales décrites ci-dessus aligné les spectres en fonction de la provenance de la souche :

- Spectres des souches VISLISI et spectres de souches issues de contamination/colonisations

- Spectres issus de VISLISI en fonction des catégories de patients

- Sepsis *VS* pas de sepsis
- Infection profonde *VS* infection superficielle
- Présence de matériel *VS* pas de matériel
- Présence d'une collection *VS* pas de collection
- Localisations septiques secondaires *VS* pas de localisations septiques secondaires
- Porte d'entrée présente *VS* absence de porte d'entrée
- Bactériémie *VS* pas de bactériémie

La Figure 13 montre un exemple de fenêtre de visualisation des spectres avec le logiciel FlexAnalysis par lequel nous avons essayé d'objectiver la présence de pics discriminants.




A. intensité des pics en unités arbitraires (u.a.)
B. poids moléculaire correspondant au pic représenté en Daltons.

**Figure 13.** Analyse d'un alignement de spectres de souches de S. lugdunensis centrés sur une échelle de taille à l'aide du logiciel d'analyse FlexAnalysis (v 3.4, Bruker Daltonics) et montrant un spectre discrimant la moitié des souches à 6800 Da.

### e) Classification hiérarchique et clustering des souches

La recherche d'une relation hiérarchique entre les souches et de clusters à partir des spectres protéiques est un moyen simple pour rechercher d'éventuelles relations phylogénétiques, ces dernières n'étant que suggérées par de telles analyses qui ne les démontrent en rien. Les paramètres de ce type d'analyse ont été particulièrement

étudiés par Louardi Moussaoui dans notre laboratoire dans le cadre d'un travail de thèse [84]

Nous avons réalisé deux types d'analyse :

**- Classification hiérarchique (dendrogrammes) à partir des spectres principaux :** nous avons tout d'abord réalisé un spectre commun à chaque souche puisqu'elles ont toutes fait l'objet de 10 dépôts. L'objectif étant d'obtenir un spectre le plus représentatif possible. En effet la présence d'un pic sur un dépôt qui ne serait retrouvé sur aucun autre doit faire envisager qu'il s'agit d'un « contaminant », qui ne correspond pas à une protéine de la bactérie. Nous avons donc établi un spectre commun à chaque souche avec les paramètres suivants :
Fréquence minimale des pics : 75%
Nombre de pic maximal désiré par souche : 70
Nous avons ensuite généré un dendrogramme dont l'objectif est d'évaluer la proximité du spectre commun de chaque souche. De nombreux paramètres sont ajustables et dépendent de l'objectif recherché. Dans notre étude, nous voulons comparer des souches de même espèce et donc probablement très proche, l'objectif est de réussir à mettre en évidence des différences même légères entre ces spectres. Nous avons fixé les paramètres d'analyse suivants :
Mesure de la distance : méthode euclidienne
Indice d'agrégation : moyenne, la distance entre 2 classes est calculée comme la moyenne des distances entre tous les objets appartenant à l'une des deux classes

- **Clustering à partir d'une analyse en composants principaux :** il s'agit d'une méthode complexe qui décompose les variables, ici les spectres des souches, en variables décorrélées et calcule leurs coordonnées dans un nouvel espace à 2 ou 3 dimensions. Ces tableaux représentent ainsi les liaisons linéaires de ces variables et peut permettre de visualiser des relations qui seraient passées inaperçues sans cette transformation des données. Ces relations dans notre exemple sont des groupes de souches que l'on identifie à ce moment sous la forme de nuages de points où un point est une souche. Il faut déterminer plusieurs paramètres préalables :
Méthode : quantum (méthode mathématique d'analyse des données décorélées recommandée pour ce type d'analyses [142])
Paramètre Q : 2.4
Distance minimale entre 2 points : 0.1 (paramètre par défaut)
Itérations : 4 (paramètre par défaut)
Etapes pour chaque itération : 20 (paramètre par défaut)

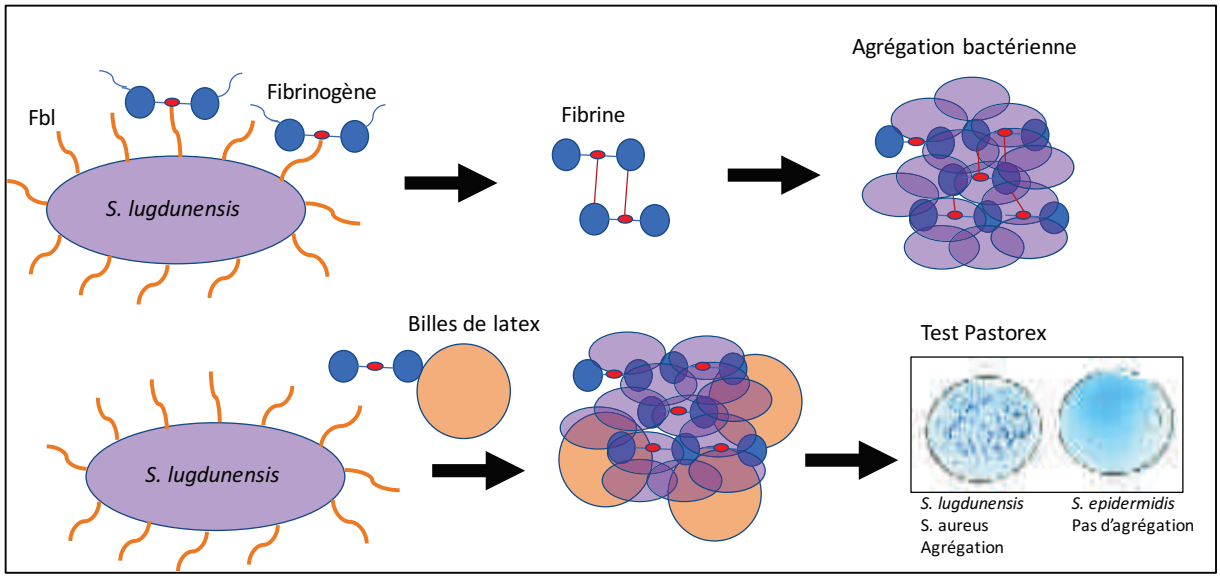
## D. Recherche de facteurs de virulence

### 1. Recherche d'un facteur d'adhésion au fibrinogène

Les capacités d'adhésion au fibrinogène de *S. lugdunensis* ont été identifiées dès les premières années suivant son individualisation et il s'agit d'un des facteurs de virulence potentiel les mieux étudiés chez cette bactérie au niveau fonctionnel, protéique et génétique (protéine de membrane codée par le gène *fbl*). Cette protéine est à l'origine

des problèmes d'identification récurrents de ce pathogène avant l'ère de la spectrométrie de masse puisqu'il s'agit normalement d'une caractéristique propre à *S. aureus* que l'on distingue des autres staphylocoques en parlant de staphylocoques à coagulase négative et de *S. aureus*, sous-entendu à coagulase positive. Par contre contrairement à *S. aureus*, *S. lugdunensis* ne sécrète pas de facteur d'adhésion au fibrinogène et les surnageants de culture ne coagulent pas le plasma. Le facteur d'adhésion au fibrinogène a été décrit dans des modèles animaux d'endocardite comme un potentiel facteur de virulence qui précipite une cascade d'adhésion puis de coagulation sur l'endocarde rapidement destructrice et compliquant la pénétration des antibiotiques [5][143]. Nous avons donc recherché ce facteur d'adhésion sur l'ensemble de nos souches.

**- Test d'agglutination :** Nous avons réalisé un test d'agglutination rapide avec le kit Pastorex Staph Plus (Bio-rad, Marnes la Coquette, France). Il s'agit d'un test d'agglutination de billes de latex recouvertes de fibrinogène permettant de mettre en évidence le clumping factor, des immunoglobulines G permettant de révéler la présence de la protéine A (protéine membranaire spécifique de *S. aureus* et reconnaissant le fragment cristallisable des immunoglobulines) et d'anticorps spécifique des polysaccharides de la capsule de *S. aureus*. Nous avons donc considéré qu'un test d'agglutination positif évoquait la présence d'un facteur d'adhésion au fibrinogène puisque *S. lugdunensis* n'est pas porteur de protéine A ni d'une capsule polysaccharidique. Certaines souches produisent une capsule mais faite d'acide glutamique [144]. Nous avons suivi les instructions du fabricant. Le témoin positif est une souche de *S. aureus* V8 et le témoins négatif une souche de *S. epidermidis* B206. Une à 3 colonies de *S. lugdunensis* sont mises en suspension avec une goutte de réactif à l'aide d'un bâtonnet pendant 10 secondes. Le support est ensuite mis en mouvement délicatement pendant 30 secondes, afin d'homogénéiser l'ensemble. La présence d'agglutinats à 30 secondes est considérée comme une réaction positive. Les analyses sont toutes réalisées en double exemplaire et avec une double lecture indépendante des résultats par 2 opérateurs. Nous avons aussi réalisé une lecture à 1 min sans pour autant retenir la réaction comme positive mais à titre informatif. Une synthèse du principe de ce test est représentée dans la Figure 14.




Fbl, facteur d'adhésion au fibroinogène de *S. lugdunensis.*

**Figure 14.** Utilisation du test Pastorex Staph Plus pour la détection du facteur d'adhésion au fibrinogène (clumping factor) de *S. lugdunensis*.

### 2. Recherche d'une béta hémolysine

La béta-hémolysine est une toxine produite par *S. aureus*. Il s'agit d'une sphingomyélinase de 35 KDa codée par le gène *hlb* qui, à la différence des toxines formant des pores membranaires (alpha, gamma et delta hémolysines), hydrolyse les sphingolipides membranaires, précipitant la lyse cellulaire [42]. Son action sur les globules rouge reste moindre que pour d'autres toxines hémolytiques et elle est responsable d'une hémolyse partielle que l'on distingue sur géloses au sang de mouton, par exemple. Cette hémolyse partielle a pour caractéristiques d'être majorée en présence de protéines de streptocoques du groupe B réalisant un aspect de synergie hémolytique lorsque 2 colonies de chaque espèce sont mises à proximité l'une de l'autre sur une glose au sang, il s'agit du CAMP test. Il s'agit d'une méthode de caractérisation des streptocoques mais que nous avons souhaité détourner pour identifier une béta hémolysine chez *S. lugdunensis* car certaines publications ont permis l'identification chez la majorité des souches d'un locus codant pour une possible béta hémolysine (locus *SLGD_0006*), et que certaines souches entrainent une hémolyse partielle sur sang de mouton [145]. Certaines publications ont par ailleurs montré que la réalisation d'un CAMP test classique est négative lorsqu'on utilise un streptocoque du groupe B, mais devient positive avec le dépôt central de souches de *Staphylococcus intermedius* [146]. Cette observation n'est probablement pas liée à la présence d'une synergie hémolytique dans le cadre de la production d'une béta-hémolysine, mais probablement due à la production d'une autre hémolysine par *S. lugdunensis*, la delta-like hémolysine. Il s'agit d'une hémolysine codée par le locus *SLUSH* (3 gènes *SLUSH A*, *B* et *C*) qui présente des homologies de séquence et de fonction avec la delta hémolysine de *S. aureus* (gène *hld*) [75][147]. Elle est à la base de l'hémolyse synergique observée avec d'autres souches de staphylocoques, comme *S. intermedius*.

**- Réalisation du CAMP test :** Nous avons donc réalisé un CAMP test selon la méthodologie décrite précédemment sur l'ensemble des souches. Une strie centrale de streptocoque B est déposée au centre d'une gélose au sang de mouton et les souches testées sont déposées autour sous la forme de stries perpendiculaires s'arrêtant à 5 mm de la strie centrale de streptocoque. Puis, la boite de Pétri est mise en incubation 24h en aérobiose à 37°C avant lecture visuelle à la recherche d'un croissant d'hémolyse entre les 2 stries testées, témoignant d'une hémolyse synergique (Figure 15). Nous avons répété l'analyse en utilisant ensuite une souche de *S. intermedius* à la recherche d'une hémolyse synergique, témoignant plutôt de la présence d'une delta-like hémolysine. Nous avons utilisé comme témoin positif *S. aureus* P83, une souche productrice de béta hémolysine, et comme témoins négatifs *S. epidermidis* et *S. aureus* V8, 2 souches non productrices de béta hémolysine.

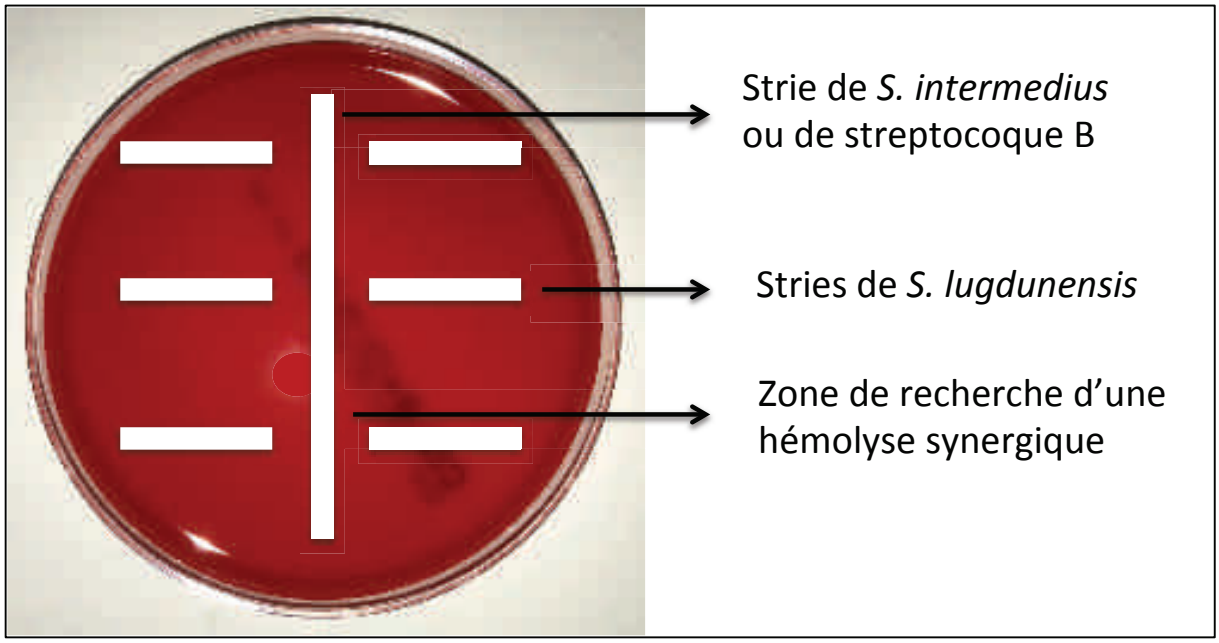



**Figure 15.** Réalisation schématique du CAMP test avec *S. lugdunensis* à la recherche d'une hémolyse synergique.

### 3. Tests d'hémolyse sur globule rouge humain et de lapin

L'activité hémolytique de certaines souches de *S. lugdunensis* a conduit à mesurer cette hémolyse de manière quantitative sur globules rouges humains et de lapins. Nous avons pour cela utilisé les surnageants de culture puisque les hémolysines sont des toxines normalement sécrétées. Deux milieux de culture ont été testées : milieu BHI et un milieu YCP élaborés localement. Nous utilisons dans ces manipulations un tampon phosphate salin de type PBS.

**Milieu de culture YCP :** acide pyruvique 16 g/l, extraits de levure 30 g/l, acides aminés issus de la caséine 20 g/l, $Na_2HPO_4$ 2.5 g/l, $KH_2PO_4$ 0.41 g/l.

**Tampon PBS:** $Na_2HPO_4$ 10 mM, $KH_2PO_4$ 1.8 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 140 mM, pH 7.3-7.4.

Le sang humain est issu de déchets sanguins non utilisés du laboratoire de microbiologie de Strasbourg. Le sang de lapin est issu de l'espèce « argenté de Champagne ».

**- Recherche d'une activité hémolytique :** La méthodologie est la même sur globules rouges humains ou de lapins. Un culot (environ 1 ml) est lavé 3 fois avec 10 ml de PBS puis centrifugé 10 min à 1200 x *g*. Les GR sont mis en suspension dans 0.4% de PBS et la concentration ajustée à une densité optique de 8 à 414 nm (dilution au 20$^{ème}$ dans de l'eau distillée). Les surnageants de culture sont obtenus par l'inoculation d'une colonie issue d'un milieu gélosé dans un puits additionné de 500 µl de BHI ou YCP mis en agitation douce 24h à 37°C en aérobiose. Les cultures sont ensuite centrifugées 5 minutes à 10000 x *g* pour éliminer le culot bactérien. Le surnageant à tester est disposé dans une plaque 96 puits par dilutions successives de 2 en 2 dans du PBS avec un volume final de 200 µl. On ajoute ensuite 100 µl de suspension de globules rouges avant incubation 45 min à 37°C. La plaque est ensuite centrifugée 3 minutes à 300 x *g*. La lecture de l'hémolyse se fait par spectrophotométrie à l'aide d'un spectromètre Multiskan MC (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) lisant la densité optique à 414 nm de 100 µl de surnageant. Le blanc est effectué contre l'air. Le témoin positif est une suspension de globules rouges et de saponine à 1%. La saponine est un hydrocarbure naturellement hémolytique. Le témoin négatif est une suspension de PBS et de globules rouges seuls. L'hémolyse est exprimée en pourcentage par la formule suivante :

$$\% \text{ hémolyse} = (DO_{414} - m T_{nég}) / (m T_{pos} - m T_{neg}) * 100$$

DO : densité optique
$mT_{neg}$ : moyenne des DO du témoins négatif
$mT_{pos}$: moyenne du témoins positif

Le titre d'hémolyse est donné par l'inverse de la dilution donnant au moins 50% d'hémolyse.

### 4. Tests de leucotoxicité

La leucotoxicité des staphylocoques est une caractéristique importante expliquant la virulence de *S. aureus* qui fabrique de nombreuses toxines ayant une activité leucotoxique que ce sont les leucotoxines proprement dites comme la leucocidine de Panton Valentine, ou encore les hémolysines comme la delta hémolysine. L'existence d'une delta-like hémolysine chez *S. lugdunensis* nous a donc amené à tester son activité sur des polynucléaires humains. Nous avons pour cela utilisé les propriétés du bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant de l'ADN. Ce composé aromatique devient fluorescent lorsqu'il est exposé aux ultraviolets et il prend une couleur rouge orangée. Il a par ailleurs la propriété de se fixer aux acides nucléiques ce qui augmente d'un facteur 20 l'intensité de sa fluorescence après excitation. Il permet donc de mesurer dans une suspension de polynucléaires neutrophiles le niveau de lyse cellulaire qui entraine un relargage de l'ADN qui n'est pas accessible au BET quand les cellules sont intactes.

**- Préparation des polynucléaires humains :** nous avons utilisé des poches de concentrés cellulaires recueillies à l'Etablissement Français du Sang. La technique de

recueil des globules blanc est habituelle et fait appel à l'utilisation d'un milieu de séparation permettant de séparer les globules blancs des globules rouges. Le sang recueilli est dilué dans un soluté salé à 140 mM de NaCl (40 ml de sang et 80 ml de NaCl) dans un tube Falcon de 50 ml additionné de milieu de séparation des lymphocytes (MSL Eurobio). Cette concentration de sel est retenue dans la suite du paragraphe pour le milieu « NaCl ». Le tube est centrifugé 20 minutes à 800 x *g*. Nous recueillons le culot riche en globules rouges et polynucléaires. Ce dernier est repris dans 30 ml de NaCl et 10 ml de dextran à 6% puis le tube est verticalisé 30 minutes. Trente ml de surnageant riche en polynucléaires neutrophiles sont récupérés et centrifugés 6 minutes à 1600 x *g*, le surnageant est éliminé puis le culot remis en suspension dans 0.5 ml de NaCl. Les hématies résiduelles sont lysées par l'ajout de 18 ml d'eau distillée puis l'équilibre est rétabli au bout de 40 secondes par l'ajout de 2 ml de NaCl. Une nouvelle centrifugation permet de récupérer les polynucléaires qui sont remis en suspension dans un tampon : NaCl 140 mM, KCl 5 mM, glucose 10 mM, Hepes 10 mM ; à raison de $10^7$ cellules/ml. Le pH est ajusté à 7.3 à l'aide de tris. Les traces éventuelles de calcium sont chélatées par de l'EGTA à 0.1 M.

**- Préparation des surnageants de culture de *S. lugdunensis* :** les surnageants sont préparés en milieu BHI selon la même méthodologie qu'au paragraphe II-D-3.

**- Tests de leucotoxicité :** nous préparons d'abord 500 µl d'une suspension de polynucléaires neutrophiles à $10^6$ cellules/ml avec 1 µg/ml de BET. Nous rajoutons ensuite 500 µl de surnageant de culture bactérienne et l'ensemble de la solution homogénéisée est transféré dans des cuves de lecture d'un spectrofluoromètre Scan 1 (Photon Technology Internaitonal, Longjumeau, France). Le témoin positif est une leucotoxine de Panton Valentine à 50 nM et le témoin négatif un tampon EGTA. Les mesures de fluorescence sont effectuées à 0 et 30 min. La fluorescence est recueillie après excitation par le spectrofluoromètre à 310 et 600 nm. L'intensité de fluorescence est comparée au témoin négatif en utilisant le ratio de fluorescence à 0 et 30 min.

### 5. Recherche de leucotoxines et toxines superantigéniques par Dot Blot et Western Blot

Compte tenu des éléments de virulence clinique décrits en introduction, de la capacité de *S. lugdunensis* à lyser les globules rouges mais aussi les globules blancs, et enfin de sa proximité génomique avec *S. aureus* par rapport aux autres SCN nous avons voulu rechercher des facteurs de virulence connus chez *S. aureus* que sont les leucotoxines et les toxines superantigéniques.

Les leucotoxines sont pour la plupart des toxines formant des pores dans la membrane des cellules cibles et se répartissent en deux groupes principaux, les toxines alpha (pores formés par une hélice alpha hydrophobe) comme la delta hémolysine, et les toxines béta (pores formés par de brins béta s'assemblant en tonneaux) comme les toxines à deux composés [43]. Ces dernières constituent le groupe le plus étudié avec notamment la leucocidine de Panton Valentine (association de 2 sous unités, LukS-PV et LukF-PV) impliquée dans divers tableaux cliniques plus ou moins sévères (furonculose, pneumopathies nécrosantes, ostéomyélites) ou encore la gamma-hémolysine (association de 2 sous unités, HlgA ou HlgB et HlgC) [43].

Les toxines superantigéniques sont nombreuses chez *S. aureus* et leur mode d'action est par définition commun. Ces protéines se lient comme la majorité des antigènes étrangers aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) exprimées par les cellules présentatrices d'antigène (lymphocytes B, macrophages, cellules dendritiques notamment). Mais cette liaison ne se fait pas au niveau de la niche antigénique habituelle au sein du CMH II mais au niveau du domaine HLA-DR. Ainsi présenté aux lymphocytes T $CD4^+$, le superantigène va se lier avec certaines régions constantes de la chaine V-bêta du récepteur des lymphocytes T $CD4^+$, une chaine externe au site de reconnaissance spécifique des antigènes permettant habituellement une reconnaissance spécifique par les lymphocytes T $CD4^+$ d'un antigène présenté par le CMH II. L'activation lymphocytaire T qui en résulte est alors massive et aspécifique, polyclonale. Un superantigène donné peut lier 5 à 10% des lymphocytes T $CD4^+$ chez un individu. La production de cytokines qui en résulte est aussi massive (TNF-α, Il-1, Il-2 et IFN-α) et cette réaction inflammatoire se traduit par une vasodilatation massive jusqu'à un état de choc. On décrit ainsi chez *S. aureus* la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), les entérotoxines A à E, G et I à U.

Nous avons donc mis en place une recherche systématique d'entérotoxines (A à I), de TSST-1 et de LukS-PV, LukF-PV, HlgA, HlgB et HlgC. Deux techniques ont été utilisées : le Dot Blot et le Western Blot, le laboratoire disposant de toxines purifiées et de leurs anticorps spécifiques dans le cadre de son activité d'étude de *S. aureus*.

**- Détermination de la concentration protéique des surnageant de culture :** Nous avons tout d'abord déterminé la concentration protéique des surnageant de culture préparés en milieu BHI. La méthode de Bradford permet d'étalonner les concentrations par rapport à une protéine de concentration connue l'albumine de bovin (Bovin Serum Albumin, BSA) à 250 µg/l [148]. Le réactif utilisé est produit par Bio Rad. L'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan MC (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Le pigment utilisé est le bleu de Coomassie qui réagit avec l'arginine, la lysine et l'histidine et sa liaison ces acides aminés modifie sa structure et donc son absorbance maximale qui se déplace de 465 à 595 nm. On établit ainsi une courbe étalon en comparant l'absorbance d'une gamme étalon de BSA aux échantillons. Nous avons ensuite homogénéisé tous les surnageant de manière à obtenir une concentration protéique finale de 300 µg/ml en diluant avec du PBS.

Réactif Bio rad : $H_3PO_4$ 50%, méthanol pur 25%, eau distillée 25%.

**Le Dot Blot :** nous déposons 1 µl de chaque surnageant à la concentration protéique de 300 µg/ml sur une plaque de nitrocellulose préalablement découpée. La membrane est ensuite saturée par du lait écrémé qui est retiré par aspiration avant ajout de 20 ml de tampon PBS-Tween 20 à 0.1%. On ajoute ensuite 10 ml du même tampon avec du lait écrémé à 1% et des anticorps primaires à 1 µg/ml. L'ensemble est incubé à 10°C avant 5 lavages au PBS-Tween 20 et ajout d'anticorps secondaires diluée au $1/2000^{ème}$ (anti IgG de lapin couplés à de la peroxydase issue de chèvre). L'ensemble est laissé 1 h à température ambiante avant révélation, grâce à la peroxydase sur un film photosensible (chimiluminescence).

**Le Western Blot :** certains surnageant apparaissent comme positifs au Dot Blot et nous avons secondairement réalisé un Western Blot pour déterminer plus précisément cette

positivité après migration du surnageant sur gel SDS-PAGE. Nous réalisons d'abord une migration des surnageant sur gel SDS-PAGE 10% dans un tampon de migration TBE (Tris, Borate et EDTA à pH 8.5). On dépose 10 µl de chaque surnageant dans les puits avant migration en deux temps : 200 V et 98 mA puis 200 V et 45 mA pendant 52 min. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose par migration de gel à membrane (dépôt des gels en sandwich) 1h à 30 V. La membrane est ensuite saturée dans un bain de tampon PBS-Tween 20 à 0.1% avec 5% de lait écrémé. Les anticorps primaires, secondaires te la révélation sont ensuite réalisés comme pour le Dot Blot.

### 6. Recherche d'une activité protéolytique

Les différentes recherches menées ci-dessus nous ont amené à constater la présence de profils très variables en électrophorèse sur gel SDS PAGE et à suspecter une activité protéolytique forte. La protéolyse peut être le résultat de nombreux facteurs, notamment expérimentaux indépendants de la bactérie testée. Mais elle peut aussi résulter de l'action de protéases. Les protéases sont des enzymes protéolytiques appartenant à de nombreuses familles et à l'origine de fonctions biologiques variées. *S. aureus* sécrète des toxines à activité protéolytiques comme la sérine protéase SspA, les épidermolysines, une cystine protéase SspB et l'auréolysine qui est une métalloprotéase [43][42]. Chaque protéase hydrolyse les liaisons peptidiques en fonction de l'affinité de son site catalytique, certaines étant assez spécifiques alors que d'autres hydrolysent de multiples liaisons peptidiques comme l'auréolysine par exemple qui est une thermolysine de la famille M4 des métalloprotéases et dont le rôle dans les infections ostéo-articulaires est suspecté [149][150][151]. Partant de ce constat nous avons donc évalué l'activité protéolytique des surnageants de culture des 82 souches à l'aide d'un substrat disponible commercialement l'azocaséine. L'azocaséine est une protéine couplée à une amine aromatique. Lorsque cette liaison est digérée par une protéase la protéine libère alors ce groupe d'atomes chromophoriques, soluble dans l'acide trichloroacétique, auquel il donne une couleur rouge orangée. L'intensité de cette couleur évaluée par la densité optique à 440 nm est fonction de la quantité d'azocaséine libérée c'est à dire de l'intensité de la protéolyse. Cette méthode d'évaluation qualitative et quantitative de la protéolyse est simple à mettre en œuvre et fiable [152].

**- Mesure de la protéolyse sur l'azocaséine :** les surnageants de culture en milieu BHI sont filtrés à 0.22 µm. Deux cents µl de surnageant sont prélevés et ajoutés à 600 µl de tampon MES (0.1 mM, $CaCl_2$ 3 mM, pH 6) et 200 µl d'azocaséine à 25 g/l (Sigma-Aldrich). L'ensemble est incubé 18 heures à 37°C avant l'ajout de 200 µl d'acide trichloroacétique pur et centrifugation 5 min à 10000 x *g*. Un ml de surnageant est ensuite prélevé et transféré dans une cuve avec 200 µl de NaOH à 7.5 M. L'absorbance à 440 nm est obtenue par spectrophotomètrie (Multiskan MC, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Cette densité optique est lue contre de l'eau pure qui constitue le blanc et permet au final d'évaluer l'activité protéolytique du surnageant testé.

Nous avons dans ces conditions expérimentales évalué le pH optimum d'activité de la protéase, mesuré l'effet d'inhibiteurs potentiels comme l'EDTA (chélateur du calcium) et la phénantrholine (chélateur du zinc) et enfin évalué les concentrations optimales de calcium et de zinc.

**- Etude du pH optimum :** L'activité a été testée sur un intervalle de pH de 5.5 à 9 en utilisant 2 systèmes de tampons ayant des pH optimums distincts en respectant la règle chimique d'avoir un pH de solution tampon à moins d'1 unité de pH de son pKa. Le pKa étant le pH permettant d'avoir 50% des molécules sous forme acide et 50% sous forme basique :
- tampon MES (pKa=6.1) et tampon MOPS (pKa=7.2) : pH de 5.5 à 7.5
- tampon HEPES (pKa=7.5) et tampon Bicine (pka=8.3) : pH de 7 à 9
Le pH est ajusté à l'aide de NaOH à 10 M.

**- Etude des inhibiteurs :** Nous avons testé le pouvoir inhibiteur de la phénanthroline et de l'EDTA.
- Phénanthroline 1-10 : la phénantroline 1-10 a été testé dans les conditions expérimentales princeps (MES 0.1 mM, $CaCl_2$ 3mM, pH 6) à des concentrations de 0 à 100, 75, 50, 25, 10 et zéro µM. Nous avons ensuite testé la restauration d'activité par l'ajout de zinc à 400 µM après utilisation de la phénanthroline à 100 µM.
- EDTA : l'EDTA a été testé dans les conditions expérimentales princeps (MES 0.1 mM, $CaCl_2$ 3mM, pH 6) à 10, 1, 0.1 et zéro M.

**- Etude des cofacteurs :** l'activité a été évaluée en fonction de différentes concentrations de zinc et de calcium.
- Zinc : nous avons préparé une solution de $ZnSO_4$ à 0.1 M dans de l'eau distillée et mesuré l'activité protéasique dans les conditions expérimentales princeps (MES 0.1 mM, $CaCl_2$ 3mM, pH 6) à des concentrations de $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-7}$ et zéro M.
- Calcium : nous avons préparé une solution de $CaCl_2$ à 1 M dans de l'eau distillée et mesuré l'activité protéasique dans des conditions expérimentales modifiées (MES 0.1 mM, pH 6) avec addition de $CaCl_2$ à $10^{-2}$, $2.10^{-3}$, $2.10^{-4}$ et $2.10^{-5}$ M.

**- Etude des températures :** plusieurs températures ont été testées dans les conditions expérimentales princeps (MES 0.1 mM, $CaCl_2$ 3mM, pH 6) : 27, 32, 37, 42, 47, 52, 57 et 62°C.

## E. Identification d'une nouvelle protéase

### 1. Purification de la protéase

#### a) Rappels méthodologiques

La mise en évidence d'une activité protéasique chez certaines souches de *S. lugdunensis* est apparue comme facteur de virulence potentiel et nous avons mis en place un protocole de purification de cette protéase par chromatographie sur colonne.

Il existe 4 types principaux de chromatographie sur colonne dont les principes sont résumés dans le Tableau 13.

**Tableau 13.** Chromatographies sur colonne utilisées pour la purification de protéines.

| Type de chromatographie | Séparation des protéines | Liaison des protéines | Elution |
|---|---|---|---|
| **Affinité** | Interaction spécifique | Pas de ligand de compétition | Ligand de compétition (spécifique) ou des conditions rompant les interactions protéine/protéine (non spécifique) |
| **Echange d'ions** | Charge de surface | Force ionique faible | Force ionique élevée, modifications de pH |
| **Interactions hydrophobes** | Hydrophobicité | Force ionique forte | Force ionique faible |
| **Exclusion de taille** | Radius hydrodynamique | | |

Le principe de la chromatographie sur colonne est de disposer d'une matrice inerte qui va retenir les protéines d'un échantillon par l'intermédiaire d'un groupe fonctionnel de cet échantillon avant élution à l'aide d'un solvant permettant le décrochage progressif des protéines de cette masse inerte et que l'on recueille progressivement dans le temps. L'analyse de ces fractions d'élution se fait d'abord par leur densité optique à 260 et 280 nm puisque l'absorbance des protéines est maximale à 280 nm et plus faible à 260 nm à l'inverse de l'ADN. Le choix des tampons, du pH, de la colonne est directement dépendant de la protéine que l'on souhaite purifier. Nous résumons ici le principe général de 2 méthodes de chromatographies utilisées dans ce travail.

**- La chromatographie par échange d'ions :** elle sépare les protéines en fonction de leur charge nette. Une phase stationnaire chargée positivement lie les protéines chargées négativement et inversement. La charge nette des protéines dépend de leur composition en acides aminés dont la charge varie en fonction du solvant utilisé qui échange des ions hydrogènes en fonction du pH. On détermine ainsi le point isoélectrique pHi d'une protéine donnée qui est le pH auquel la moitié est chargée négativement, l'autre moitié positivement et la charge globale est donc neutre. Ainsi en fonction du pH et du solvant utilisé une protéine pourra se fixer à une matrice échangeuse d'anions ou de cations. Le calcul du pHi est possible pour une protéine connue mais dans un contexte exploratoire ou la protéine n'est pas connue il faut tester plusieurs solvants et plusieurs conditions de pH. Les groupes fonctionnels chargés les plus souvent utilisés sur la matrice de la phase stationnaire sont :
- Ammonium quaternaire, échangeur d'anions fort
- Diéthylaminoéthyle, échangeur d'anions faible
- Méthyl sulfonate : échangeur de cations fort
- Carboxy méthyl, échangeur de cations faible

La colonne de chromatographie doit être équilibrée avant son utilisation habituellement avec un tampon de faible force ionique identique au tampon utilisé pour l'échantillon à analyser. Une fois l'échantillon chargé à une vitesse variable la colonne est lavée avec un tampon de force ionique plus élevé. La dernière étape est celle d'élution qui consiste à

décrocher les protéines liées à la matrice en utilisant des contre-ions comme les ions $Na^+$ pour les cations et les ions $Cl^-$ pour les anions. L'utilisation d'un gradient de concentration de l'éluant entraine alors un décrochage séquentiel des protéines qui sont récupérées en sortie sous la forme de fractions qui passent devant le lecteur de densité optique. L'objectif est d'évaluer l'absorbance à 260 et 280 nm et déterminer la nature de la molécule décrochée à un instant T.

**- La chromatographie d'interaction hydrophobe :** elle sépare les protéines en fonction de leur caractère hydrophobe. Elle peut être employée en tant que phase initiale de purification d'une protéine ou en phase finale d'une chromatographie de purification pour éliminer des traces d'impuretés dans l'échantillon. La phase stationnaire est constituée d'une matrice liée à des molécules hydrophobes, apolaires, portant le plus souvent un groupe fonctionnel alkyle (souvent un groupe butyle ou octyle) ou aryle (souvent un groupe phényle). La colonne de chromatographie doit être équilibrée avec un tampon de force ionique élevée ayant une forte concentration en sels come le sulfate d'ammonium, identique au tampon utilisé pour l'échantillon à analyser. L'objectif étant de trouver la concentration en sels la plus faible possible dans le tampon car au delà d'une certaine concentration ils entrainent la précipitation des protéines dans un échantillon. Les molécules d'eau de l'enveloppe d'hydratation des protéines sont mobilisées pour hydrater les anions et actions provenant de la dissociant du sel et cela entraine un changement de la conformation de la protéine révélant des zones superficielles non polaires, hydrophobes se fixant par affinité à la phase stationnaire. La phase d'élution s'obtient en diminuant la concentration saline, par exemple de sulfate d'ammonium, permettant à la protéine de reprendre sa conformation originelle ce qui masque les zones d'interaction d'hydrophobe et décroche la protéine.

### b) Purification de la protéase par chromatographie

Dans le cadre de notre travail nous avons donc de mettre au point un protocole de purification en essayant plusieurs conditions expérimentales et nous rapportons ici les conditions finales ayant finalement permis de purifier au mieux la protéase. Nous avons procédé à une purification en deux temps à partir à partir du surnageant de culture de la souche VISLISI_22 ayant une activité protéolytique forte (mesurée avec l'azocaséine). Nous avons réalisé une première étape de capture de la protéase par chromatographie d'interactions hydrophobes, puis une phase de purification par chromatographie par échange d'ions. L'ensemble des manipulations a été effectué sur un appareil de chromatographie ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare, Strasbourg, France).

**- Préparation du surnageant de culture :** le surnageant de culture a été préparé à partir d'une colonie dans 10 ml de BHI mise culture 6h à 37°C puis 1 ml de cette suspension est de nouveau incubée dans 200 ml de BHI associé à du $Ca^{2+}$ à 2 mM pendant 18h à 37°C en agitation à 200 tours/min. La culture est ensuite centrifugée 15 minutes à 7000 g à 4°C. Le surnageant est alors filtré à 0.45 µm et nous vérifions ensuite son activité protéolytique sur l'azocaséine selon le protocole décrit au paragraphe II-D-6. L'échantillon est ensuite mélangé à un tampon Tris avec du sulfate d'ammonium et de manière à obtenir un pH à 8 : Tris 20 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 3 M.

**- Etape 1, capture de la protéase par chromatographie d'interaction hydrophobe :** nous avons utilisé une colonne PHE source 15 (GE Healthcare Life Science) de 16 ml, porteuse d'un groupe fonctionnel phényl destiné à immobiliser les protéines du surnageant par interactions hydrophobes. Après équilibration de la colonne l'échantillon est injecté à 4 ml/min puis lavé avec le tampon suivant : Tris 20 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 1.2 M, pH=8. L'élution est ensuite lancée par un gradient décroissant de 1200 mM à zéro mM de $(NH_4)_2SO_4$ à pH8 en 144 ml et avec 2 mM de $CaCl_2$. Les fractions gardant une activité protéolytique sont ensuite purifiées par chromatographie par échange d'ions.

**- Etape 2, chromatographie par échange d'ions :** nous avons utilisé une colonne MonoQ 1 ml (GE Healthcare, Strasbourg, France) qui porte une matrice échangeuse d'anions forts recouverte d'un ammonium quaternaire : O-CH2-CHOH-CH2-O-CH2-CHOH-CH2-N+(CH3)3. Après équilibration de la colonne l'échantillon 2 est injecté puis lavé avec le tampon suivant : Tris 50 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH=8. L'élution est ensuite lancée par un gradient croissant de 0 à 300 mM de NaCl à pH 8 en 137 ml et avec 2 mM de $CaCl_2$. Les fractions gardant une activité protéolytique sont ensuite analysées par électrophorèse.

**- Etape 3, électrophorèse des fractions protéolytiques :** les différentes fractions éluées à l'issue des étapes 1 et 2 ont été analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Nous avons utilisé un gel Mini Protean TGX à 12% sans ß-mercaptoéthanol et une coloration au bleu de Coomassie en suivant les instructions du fabricant. La migration est effectuée à 200 V après dépôt de 10 µl d'échantillon dénaturé par chauffage à 95°C pendant 5 min (tampon du fabricant de type Tris HCl, Laemmli Sample Buffer™). Le gel est ensuite coloré par un bain de 30 min à 60°C avec une solution de coloration de bleu de Coomassie R_250 (0.1%), eau distillée (49.9%), méthanol (40%), acide acétique (10%). Le gel est ensuite décoloré par 3 bains successifs à 60°C d'une solution d'eau distillée (50%), méthanol (40%) et acide acétique (10%).

## 2. Séquençage peptidique de la protéase

### a) Rappels méthodologiques

La séquence peptidique de la protéine purifiée a pu être obtenue avec l'utilisation d'une méthode de chromatographie liquide à haute pression associée à une analyse par spectrométrie de masse. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec la plateforme de protéomique de Strasbourg Grand-Est, LSMBO, UMR 7178, IPHC.

Le principe est donc de fragmenter la protéine purifiée à l'aide d'enzymes comme la pepsine qui va produire un ensemble complexe de peptides. La trypsine est une protéase stable qui clive de manière spécifique les protéines du côté C-terminal des résidus de lysine et d'arginine. Ainsi, à partir d'une base de données de séquences protéiques, on peut prédire la liste des masses d'une protéine donnée après digestion par la trypsine (on parle d'empreinte peptidique massique). Et donc en comparant les masses obtenues par spectrométrie de masse des peptides digérés on peut retrouver la séquence peptidique de la protéine faisant l'objet de l'étude. Cette approche ayant des limites pratiques liées en particulier à la pureté de la protéine testée, une approche

complémentaire a révolutionné l'identification des protéines, la spectrométrie de masse en tandem. Le principe repose sur la réalisation d'une deuxième analyse de masse par spectrométrie après fragmentation d'un peptide analysé par un premier spectromètre. Cette fragmentation est obtenue par la mise en collision du peptide avec un gaz inerte comme l'argon dont l'énergie cinétique est transformée en énergie vibrationnelle ce qui fragmente le peptide au niveau de la liaison amide des acides aminés. Ces fragments sont analysés par un deuxième spectromètre de masse et la liste des différentes séries d'ions peptidiques générés est limitée permettant de déduire la séquence en acides aminés.

En pratique, les peptides digérés sont ainsi séparés par chromatographie liquide en phase inverse sur une colonne C18 qui sépare les peptides en fonction de leur taille et de leur hydrophobicité. Le solvant d'élution permet de diriger les peptides à des temps distincts (appelé temps de rétention) vers un spectromètre de masse de type Electrospray. L'appareil effectue alors une analyse standard de masse (phase MS du travail, les données de MS ne sont pas exploitées) puis sélectionne les 3 peptides les plus abondants qui sont à nouveau fractionnés par collision avec de l'argon. L'appareil analyse alors les masses de ces fractions (phase MS/MS du travail, ces données sont exploitées) et à l'aide d'un logiciel d'analyses reconstitue la séquence peptidique probable qui a pu donner naissance à ces peptides. Cette méthode d'analyse est donc appelée nanoLC-MS/MS.

### b) Séquençage peptidique de la protéase

Dans le cadre de ce travail nous avons donc analysé les deux fractions protéolytiques issues de la chromatographie par échange d'ions et identifiées sur le gel SDS-PAGE. Les analyses ont été faites à partir de la découpe de ce gel.

- **Préparation de l'échantillon** : le gel est lavé dans 50 µl de $NH_4HCO_3$ et 50 µl d'actéonitrile et déshydraté dans 100 µl d'acétonitrile avant réduction du gel (DTT 10 mM, $NH_4HCO_3$ 25 mM, 1h à 57°C) et alkylation (iodoacétamide 55 mM, $NH_4HCO_3$ 25 mM). Le gel est ensuite mis en suspension dans une solution de trypsine à 12.5 ng/µl et dilué dans une solution de $NH_4HCO_3$ à 25 mM avant incubation 12 h à 37°C. Les peptides digérés sont extraits du gel dans une solution contenant 65% d'actétonitrile, 34.9% d'$H_2O$ et 0.1% d'HCOOH avant exploitation chromatographique.

- **Chromatographie liquide à haute pression :** les colonnes utilisées sont apolaires et piège les peptides par interactions hydrophobes et en fonction de leur taille (chromatographie en phase inverse). Les analyses sont réalisées sur un appareil nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters, Milford, USA). Les échantillons sont d'abord piégés dans une pré-colonne Symetry C18 de 5 µm (Waters Corporation) qui dessale et concentre l'échantillon puis séparés dans une colonne ACQUITY UPLC BEH130 C18 de 1.7 µm (Waters, Milford, USA). L'élution est réalisée à 300 nL/min dans un gradient de 1 à 40% d'un solvant (acide formique 0.1% dans l'acétonitrile) sur 35 minutes à 50°C puis pendant 5 min à 65% du même solvant.

- **Analyses MS et MS/MS :** les analyses ont été effectuées sur un spectromètre de masse à temps de vol SYNAPT (Waters, Milford, USA) associé à une source ionique de type

électrospray. Le voltage du capillaire est fixé à 3.2 KV et le voltage du cône à 40 V. Le passage du mode MS à MS/MS est automatique et précalibré. Un cycle MS est fixé à O.5 seconde par scan sur une échelle de 250 à 1700 *m/z*. Un cycle MS/MS est fixé à 0.7 secondes par scan sur une échelle de 50 à 2000 *m/z*. Seuls les 3 peptides les plus abondants, préférentiellement doublement et triplement chargés ($[M+2H]^{2+}$ et $[M+3H]^{3+}$), sont fragmentés par l'argon et font l'objet d'une analyse MS/MS sous contrôle du programme MassLynx 4.1 (SCN 566, Waters). Pour un peptide sortant de la colonne de chromatographie un cycle MS et 3 MS/MS dure environ 6 secondes. Un peptide donné est habituellement fragmenté en 50 à 400 composés (pas tous exploitables en termes de signature spectrométrique). L'information MS n'est pas exploitée, seule l'information des 3 cycles MS/MS est exploitée, chaque spectre est caractérisé par la masse de l'ion parent, son temps de rétention et les masses des fragments. Les données brutes sous converties sous la forme d'une liste de pics par le programme ProteinLynx Browser (v 2.5).

- **Interprétation des données :** la liste des pics est comparée à la base de données Swiss Prot à l'aide du logiciel Mascot (v 2.4.1, Matrix Science).

### 3. Séquençage du gène codant pour la protéase

Le gène codant pour la protéase identifiée a fait l'objet d'un séquençage inclus dans les analyses de génome entier décrites au paragraphe II-F. Nous avons extrait la séquence complète du gène codant pour la protéase à partir du génome de VISLISI_22 à l'aide du logiciel Artemis (v 16.0.0).

### 4. Recherche du gène codant pour la protéase sur l'ensemble des souches de *S. lugdunensis*

Après avoir obtenu la séquence du gène codant pour la protéase, nous avons tout d'abord vérifié la correspondance entre cette séquence nucléotidique et la séquence peptidique obtenue par nano LC-MS/MS. Nous avons choisi de réaliser une Polymerase Chain Reaction avec une polymérase de type *Taq* incluse dans le kit Taq PCR Kit E5000S (BioLabs). La PCR a été réalisée selon les bonnes pratiques, dans 2 salles distinctes pour les étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN avec un nettoyage systématique des paillasses à chaque étape par de la RNAse/DNAse. Les différentes étapes de cette PCR sont les suivant :

- **Design des amorces :** nous avons choisi des amorces respectant les critères requis pour une PCR avec la *Taq* polymérase : longueur de 20 à 30 nucléotides, 40 à 60% de GC, des températures de fusion théoriques supérieures à 45°C et à moins de 5°C d'écart pour les 2 amorces et une concentration finale entre 0.05 et 1 µM. Les amorces ont été fabriquées par GATC Biotech AG (Konstanz, Germany).

- **Extraction de l'ADN :** l'ADN a été extrait et quantifié selon les mêmes modalités qu'au paragraphe II. F. 4.

- **Préparation du mix d'amplification :** le mix d'amplification a été préparé en salle « propre » avec pour chaque souche à amplifier : 5 µl de tampon du fabricant (*Taq* Reaction Buffer™), 1 µl de désoxyribonucléotides à 10 mM, 1 µl de chaque amorce sens

(forward, F) et anti-sens (R, reverse), 0.25 µl de *Taq* et 40.75 µl d'eau distillée stérile. Après passage en salle « contaminée » nous ajoutons 1 µl d'ADN.

- **Amplification :** les amplifications ont été réalisé sur un thermocycleur TC-3000 TECHNE (Bibby Scientifiq, Cole Parmer, Roissy, France) avec les cycles suivant : 1 cycle de dénaturation (30 secondes à 95°C), 30 cycles d'amplification (dénaturation 30 secondes à 95°C, hybridation 30 secondes à 45°C, élongation 1 min à 68°C), 1 cycle de terminaison (5 minutes à 72°C). Les échantillons sont maintenus à 4°C à partir de là et nous ajoutons un tampon de charge.

- **Révélation :** nous avons tout d'abord fait migrer l'ADN amplifié par une électrophorèse sur gel d''agarose à 1.5% additionné de BET (0.5 µg/ml). Nous déposons 10 µl de l'échantillon amplifié dans chaque puits avant migration d'1h30 à 6 Watts dans un tampon TBE. Le gel est enfin révélé aux ultra-violets.

### 5. Etude de la séquence nucléotidique du gène de la protéase

La détection du gène codant pour la protéase ne peut suffire pour conclure qu'il est nécessairement exprimé dans la bactérie, sa traduction en ARN messager nécessite la présence de plusieurs domaines en amont et en aval du gène. L'ARN polymérase doit d'abord reconnaître une séquence en amont du gène afin de se fixer, c'est la région promotrice habituellement décomposée en deux courtes séquences nucléotidiques situées 10 et 35 paires de bases en amont du codon initiateur de la protéine, on parle de boites. L'ARN polymérase est un complexe protéique de 5 sous unités ($\alpha_2$, β, β', ω, c'est l'enzyme coeur) qui recrute secondairement une sous unité σ indispensable à la reconnaissance du promoteur chez les bactéries, cette sous unité appartient le plus souvent à la famille des facteurs sigma $\sigma^{70}$ et se détache dès le processus de transcription entamé [153]. La deuxième séquence nécessaire est un site d'attachement du ribosome. Rappelons que la transcription et la traduction des gènes puis des ARN messagers est simultanée chez la bactérie en l'absence de noyaux. Ce site d'attachement du ribosome est une courte séquence nucléotidique généralement située 5 à 8 paires de base en amont d'un codon initiateur. On observe classiquement une séquence de 9 nucléotides : AGGAGGUAA, décrite par John Shine et Lynn Dalgarno et qui porte leur nom : séquence de Shine Dalgarno [154]. Elle est souvent incomplète mais reste fonctionnelle. Enfin l'ARN polymérase se dissocie à la fin du gène soit en rencontrant un site de terminaison soit par l'intermédiaire d'une protéine de terminaison. La protéine de terminaison rho constitue un facteur extrinsèque de terminaison et on parle de terminaison rho dépendante. La terminaison rho indépendante est basée sur la présence de séquences nucléotidiques palindromiques, particulièrement riches en GC et se terminant par un segment de bases répétées, 6 à 8 adénines [155]. La séquence palindromique provoque la formation d'une structure en boucle de l'ARN messager met l'ARN polymérase en attente, alors que la fin de la séquence n'est plus que constituée de liaisons adénine-uracile faibles en énergie, le brin se détache de l'ADN et la transcription s'arrête.

Nous avons donc recherché ces 3 éléments sur les séquences nucléotidiques en amont et en aval du gène codant pour la protéase à l'aide d'outils bioinformatiques. La séquence a été extraite des données de séquençage complet décrites dans le paragraphe suivant. Nous avons aussi recherché un peptide signal dans la mesure où la protéase identifiée

est présente dans les surnageants de culture et est donc sécrétée. Ces travaux sont toujours basés sur la séquence issue du génome de VISLISI_22, une souche fortement protéolytique. Nous avons aussi dans un deuxième temps établi les relations phylogénétiques existantes entre la protéase de *S. lugdunensis* et les protéines qui en sont les plus proches.

**- Recherche d'un promoteur :** nous avons utilisé l'outil en ligne BPROM accessible sur la plateforme Softberry. Il s'agit d'un logiciel de screening des séquences nucléotidiques reconnaissant l'ARN polymérase $\sigma^{70}$ et il s'agit du cas le plus fréquent chez *S. aureus* [156]. Le résultat est rendu sous la forme de zones promotrices potentielles avec un score de probabilité qui est fonction de la séquence nucléotidique et de sa position. Le promoteur n'est pas systématiquement situé 10 et 35 nucléotides en amont du codon initiateur mais on le retrouve presque toujours dans les 150 nucléotides d'amont.

**- Recherche d'un site d'attachement du ribosome et terminateur :** nous avons utilisé le serveur en ligne Reg RNA 2.0, c'est une suite de programmes qui fournit de très nombreux paramètres sur la séquence nucléotidique soumise [157]. Il permet l'identification de sites d'attachement du ribosome mais aussi modélise les potentiels terminateurs rho indépendants.

**- Recherche d'un peptide signal :** nous avons utilisé le serveur SignalP 4.1. il s'agit d'un programme accessible en ligne qui identifie sur une séquence nucléotidique les zones de clivage peptidiques possibles correspondant à la partie de signalisation des protéines excrétées [158]. Les résultats sont fournis sous la forme d'une identification de portion de séquence avec une certaine probabilité de clivage.

- **Etude phylogénétique :** nous avons déduit la séquence en acides aminés du gène codant pour la protéase et réalisé une analyse phylogénétique en se basant sur les 21 protéines les plus proches en utilisant l'outil d'analyse de séquences BLAST (Basic Local Alignement Tool) avec les paramètres suivant :
Web BLAST : protein Blast
Database : séquences protéiques non redondantes
Algorithme : Blastp
Nous avons ensuite sélectionné les 21 protéines avec le score d'homologie le plus grand et sans redondance d'espèce bactérienne et établi un arbre phylogénétique à partir de BLAST avec les paramètres suivant :
Méthode : neighbour joining
Différence maximale : 0.9

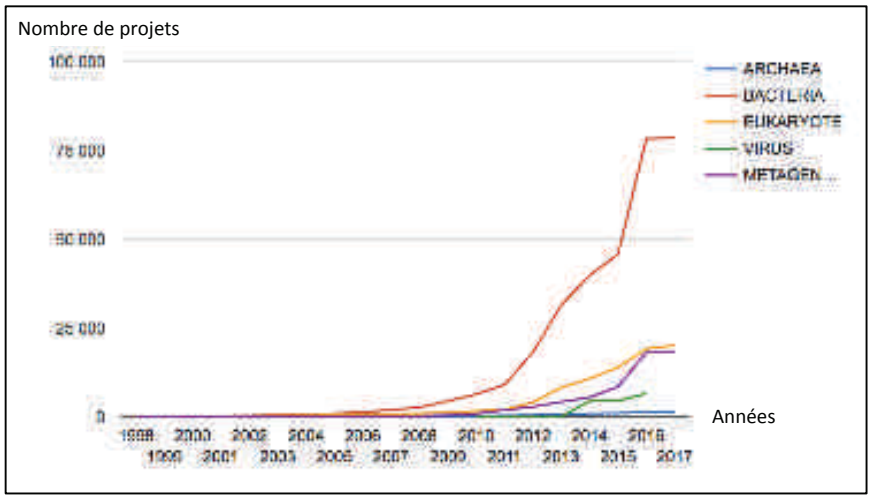
## F. Séquençage de novo et analyse des génomes

### 1. Séquençage de nouvelle génération

Les nouvelles techniques de séquençage de l'ADN qui sont en fait en place depuis bientôt 10 ans ont complètement révolutionné l'approche des génomes en particulier bactériens. Les couts ont diminué de manière drastique à partir de 2007, date de la mise à disposition de techniques de remplacement de la méthode Sanger utilisée initialement pour le séquençage génomique. Un suivi régulier de ce cout par séquence est disponible

au lien suivant : www.genome.gov/sequencingcostsdata et illustre bien la rapidité des progrès technologiques dans ce domaine. Les bactéries, particulièrement les protéobactéries, font l'objet du plus grand nombre de projets de séquençage, devant le séquençage eucaryote (Figure 16).

Panel A




Panel B

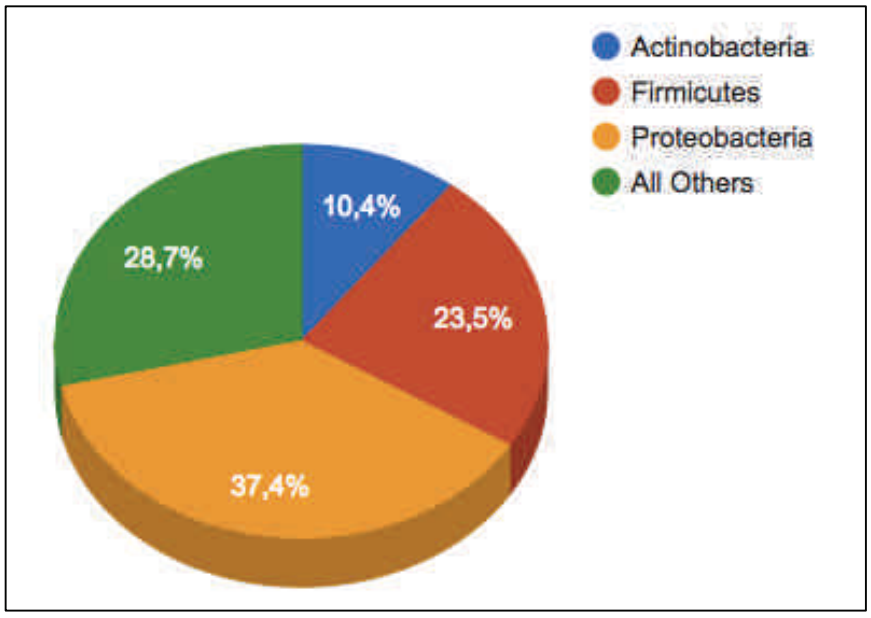



**Figure 16.** Nombre de nouveaux projets de séquençage par année (panel A) et répartition de ces projets en fonction du phylum des *Bacteria* (Panel B). (Adapté et traduit du Joint Genome Institute, https://gold.jgi.doe.gov/statistics , accès le 17 janvier 2017).

Une revue de la littérature publiée en 2016 a fait la synthèse de toutes les méthodes de séquençage disponibles, leurs avantages, leurs inconvénients et le cout approximatif de chacune [159]. Nous ne reviendrons pas en détail sur cette revue exhaustive mais on

distingue aujourd'hui 3 méthodes principales de séquençage : le séquençage Sanger (méthode historique, séquençage dit de première génération), le séquençage de courtes séquences nucléotidiques en de multiples exemplaires (séquençage dit de 2ème génération) et le séquençage de larges portions de génomes en un seul exemplaire (séquençage dit de 3ème génération), cette approche étant la plus récente et disponible sur le marché depuis 2010 mais effective commercialement depuis 2014. La différence réside donc dans la longueur des fragments séquencés ou reads et du nombre de séquences nécessaires permettant d'obtenir la séquence définitive du génome étudié. Le taux d'erreur par base est un paramètre fondamental dans le choix d'une de ces méthodes. Le Tableau 14 résume les propriétés des principales plateformes de séquençage disponibles actuellement.

**Tableau 14.** Exemple de 2 plateformes de séquençage disponible en 2017 : Illumina (2ème génération) et Oxford Nanopore (3ème génération).

| **Plateforme** | Longueur des reads (paires de bases, pb) | Débit maximum (giga bases, Gb) | Nombre de reads maximum par séquence | Durée de séquençage (heures, h) | Taux d'erreur par base | Cout |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Illumina HiSeq 2500 v2** | 36 (SE[1]) | 9-11 Gb | 300 Millions | 7 h | 0.1% (substitution) | 230$ |
| | 50 (PE[2]) | 25-30 Gb | 600 Millions | 16 h | | 90$ |
| | 100 (PE) | 50-60 Gb | | 27 h | | 52$ |
| | 150 (PE) | 75-90 Gb | | 40 h | | 45$ |
| | 250 (PE) | 125-150 Gb | | 60 h | | 40$ |
| **Oxford nanopore MK-1 MinION** | Jusqu'à 200 kb | Jusqu'à 1.5 Gb | > 100.000 | 48 h | 12% (insertions, délétions) | 750$ |

[1]PE, Paired End, séquençage par paires
[2]SE, Single End, séquençage non pairé

La majorité des génomes publiés vient de séquençage de 2ème génération. Le principe de ces séquenceurs à haut débit est toujours le même :

**- Construction d'une banque d'ADN :** l'ADN à analyser est fragmenté de manière aléatoire puis traité avec un fragment de Klenow. Il s'agit d'un fragment issu de l'ADN polymérase qui conserve une activité polymérase 5'→3' et exonucléase 3'→5' mais a perdu son activité exonucléase 5'→3' (dégradation de l'ADN néosynthétisé). Ce traitement permet d'obtenir des fragments d'ADN compatibles avec deux ligands fixés aux extrémités 5' et 3' de l'ADN par une ligase, on parle d'adaptateurs (appelés adaptateur A et B). L'un des deux ligands est biotinylé (adaptateur A) et se fixe sur un support solide (billes ou plaques) couverte de streptavidine qui a une forte affinité pour

la biotine. L'autre adaptateur (adaptateur B) servira plus tard d'amorce pour l'amplification à venir.

**- Amplification des fragments d'ADN :** deux techniques différentes sont habituellement utilisées pour amplifier ces fragments d'ADN fixés : une PCR en émulsion pour les fragments liés à des billes (technologie SOLiD et Ion Torrent, Thermo Fisher) ou une PCR par formation de ponts à partir de fragments fixés à un support solide (technologie Illumina, Illumina Inc.).

**- Le séquençage :** il repose sur la détection séquentielle de signaux luminescents ou fluorescents qui sont analysés et convertis en séquence nucléotidique.

Le séquençage Illumina est une technologie très repandue en microbiologie compte tenu des nombreuses plateformes existantes, de sa rapidité, de sa fiabilité, de son cout et de sa bonne adéquation avec la majorité des génomes notamment bactériens. Nous ne détaillerons pas les autres techniques de séquençage dans le paragraphe suivant.

### 2. Séquençage Illumina

Il s'agit d'une technique de séquençage de deuxième génération la plus repandue dans les laboratoires travaillant sur les génomes bactériens. Le séquençage Illumina est basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents identifiés par lecture optique. Cette technologie a beaucoup évolué au fil des années et les séquenceurs les plus récents comme le séquenceur Illumina HiSeqX produisent des séquences avec des débits massifs (800 à 900 Gb), une quantité de reads extrême (2.6 à 3 milliards), en peu de temps (moins de 3 jours) et avec un taux d'erreur toujours minime (<0.1%, principalement des substitutions) [159]. Le principe reste néanmoins le même (Figure 17).

**Banque de fragments d'ADN :** les fragments d'ADN sont préparés comme nous l'avons expliqué ci-dessus, puis sont fixés par l'intermédiaire de l'adaptateur A biotynilé à une surface solide ou flow-cell recouverte de streptavidine.

**Amplification :** la plaque est recouverte d'oligonucléotides complémentaires des adaptateurs fixés précédemment mais seul l'adaptateur A permet la fixation initiale des fragments. Le fragment fixé est ensuite dénaturé puis suivi d'un cycle de PCR (ADN polymérase associée à des oligonucléotides) permettant d'amplifier les fragments fixés. Le fragment vient ensuite se fixer en pont sur le deuxième oligonucléotide complémentaire de son adaptateur libre (adaptateur B) formant un pont qui est suivi d'un cycle de PCR, amplifiant ainsi le fragment sous forme d'un pont qui est ensuite dénaturé et aboutit à 2 ADN monobrins complémentaires fixés par 2 oligonucléotides différents. Ce procédé est répété plusieurs fois aboutissant à une amplification clonale des fragments d'ADN. Puis, avant le séquençage proprement dit, les fragments complémentaires liés par l'adaptateur B sur le deuxième oligonucléotide sont clivés, ne laissant sur la plaque qu'un ensemble de fragments liés par l'adaptateur A et correspondant dans chaque zone géographique de la plaque à un brin d'ADN identique amplifié de nombreuses fois (cluster) permettant finalement son séquençage.

**Séquençage du fragment amplifié :** la plaque est mise en contact avec une mixture d'ADN polymérase, d'oligonucléotides bloqués en 3' et marqués par un fluorophore

clivable propre à chaque base. A chaque cycle d'amplification PCR un seul nucléotide est incorporé sur le fragment fixé (car bloqué en 3'), la surface est lavée puis excitée par 4 lasers permettant de détecter la fluorescence propre à chaque zone d'immobilisation d'un fragment et donc le nucléotide incorporé. Le fluorophore est ensuite clivé et l'extrémité 3'OH régénérée à l'aide d'un agent réducteur. Un nouveau cycle permet d'identifier le nucléotide suivant. Le séquençage en parallèle des clusters aboutit à une banque de fragments de séquences brutes qui font finalement l'objet d'analyses bioinformatiques pour nettoyer les séquences, reconstruire des fragments plus longs d'ADN ou encore les alignés sur un autre ADN à la recherche de similarités.

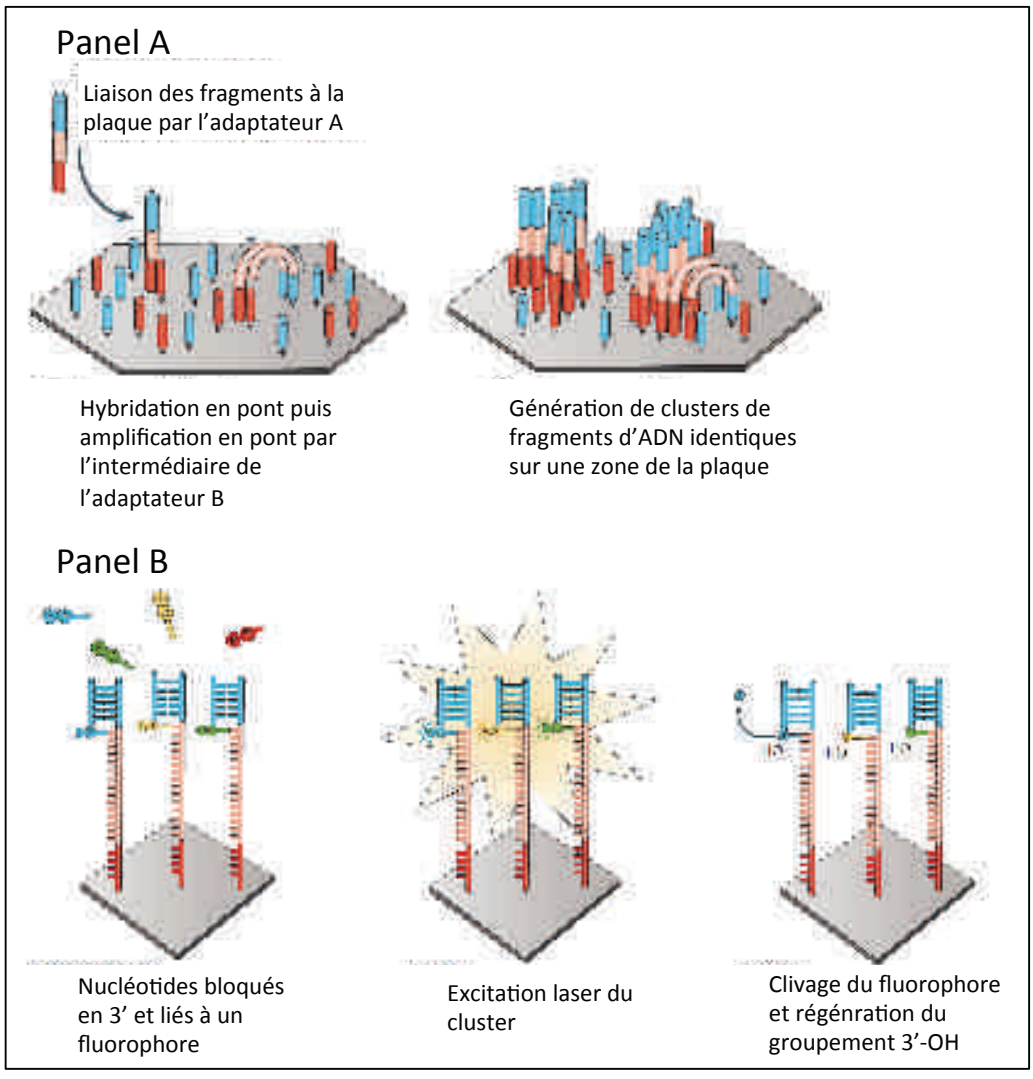



**Figure 17.** Principes du séquençage Illumina avec une étape d'amplification (Panel A) puis une étape de séquençage (panel B). (Adapté et traduit de Sara Goodwin et coll., 2016).

### *3.* Choix d'une méthode de séquençage pour *Staphylococcus lugdunensis*

Le choix de la technologie et des paramètres de séquençage de *S. lugdunensis* a été fait en fonction des questions auxquelles nous souhaitions répondre et en tenant compte du faible nombre de génomes complets disponibles :

- Quelles sont les caractéristiques générales du génome ?
- Retrouve-ton des gènes de virulence, notamment ceux décrits dans la littérature
- Existe-t-il des éléments génétiques mobiles ?

Pour répondre à ces questions il a fallu envisager un séquençage complet et une annotation *de novo* ainsi et pas un simple alignement de morceaux de séquences sur des séquences connues ou un transfert d'annotations existantes.

Plusieurs autres éléments ont aussi été décisifs :

- Le génome de *S. lugdunensis* est de petite taille à priori (2.6 Mb dans la littérature).
- Il s'agit d'un génome bactérien avec probablement peu de séquences répétées.
- Par définition, il n'y a pas d'intron.
- Nous souhaitons des séquences les plus fiables possibles.

Pour répondre à ces contraintes nous avons décidé de faire appel à la technologie de séquençage Illumina avec les paramètres suivant :

- Séquençage par pair : elle est préférable pour permettre un assemblage *de novo* de bonne qualité
- Fragments longs : 125 pb
- Profondeur de séquençage supérieure à 150

Nous avons ainsi pris contact avec l'entreprise GATC qui a produit les séquences brutes (paires de fragments de 125 pb) à l'aide d'un séquenceur Illumina HiSeq 2500 (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany). Les séquences brutes ont ensuite fait l'objet d'analyses qualitatives avant l'assemblage.

Nous avons séquencé 10 souches issues d'infections distinctes et de colonisations certaines :

**VISLISI_21 :** bactériémie récidivante sur cathéter veineux central
**VISLISI_22 :** endocardite destructrice sur valve native avec emboles septiques multiples
**VISLISI_25 :** arthrite du genou sur prothèse totale
**VISLISI_27 :** arthrite du genou sur prothèse totale
**VISLISI_33 :** abcès hépatique spontané
**VISLISI_37 :** endocardite sur valve native
**VISLISI_38 :** arthrite de hanche sur prothèse totale
**C_33 :** frottis cutané nasal systématique
**C_34 :** liquide gastrique
**C_47 :** frottis de cathéter veineux central (comptage de Bruin-Buisson <1000 ufc/ml)

### 4. Extraction de l'ADN

Les souches bactériennes sont cultivées à partir de la souche princeps sur milieu gélosé au sang de mouton 24H à 37°C. Une colonie est ensuite mise en culture en milieu liquide BHI selon le protocole décrit au paragraphe II. D. 3. Une nouvelle culture sur gélose au sang de mouton est faite à partir de cette suspension bactérienne parallèlement pour identification par spectrométrie de masse directement à partir d'une colonie et selon le protocole décrit au paragraphe II. A. 1. L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide du MasterPure DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, USA). Un ml de la suspension bactérienne est centrifugé pour récupérer le culot bactérien (5 min à 2500 x *g*). Le culot bactérien est remis en suspension dans 150 µl de tampon (Tris HCl à 10 mM, EDTA à 1mM, pH=7.5) avant l'ajout de 1µl de Ready-Lyse Lysosyme™ et incubation de 30 minutes à 37°C. On ajoute ensuite 150 µl de tampon Gram Positive Lysis Solution™ avec 1 µl de protéinase K à 50 µg/µl avant incubation de 15 min à 65-70°C et réalisation d'un mélange rapide toutes les 5 min. Le tube est alors laissé en air ambiant jusqu'à atteindre 37°C puis mis sur glace pour procéder à la précipitation de l'ADN à partir de 300 µl de ce mélange. On ajoute 175 µl de MPC Protein Precipitation Regent™ et après agitation douce l'ensemble est centrifugé 10 minutes à 10000 x *g* à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube Ependorff avec 1 µl de RNAse A à 5 µg/µl, l'ensemble est agité vigoureusement puis incubé 30 min à 37°C. On ajoute enfin 500 µl d'isopropanol pur en inversant le tube 30 fois permettant la précipitation finale de l'ADN qui est récupéré après nettoyage du culot à l'éthanol 70% par élimination du surnageant et évaporation finale sous hôte à flux laminaire. L'ADN est remis en suspension dans 35 µl de tampon (Tris HCl à 10 mM, EDTA à 1mM, pH=7.5).

Chaque échantillon d'ADN est ensuite analysé à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientifiq) pour évaluer la quantité d'ADN et mesurer son absorbance permettant ainsi de l'évaluer sur le plan qualitatif. L'objectif fixé est un ratio d'absorbance 260/280 nm ≥ 1.8 et un ratio 260/230 ≥ 1.9. Nous avons enfin réalisé une électrophorèse de ces ADN sur un gel d'agarose à 0.8% mélangé à 0.5 µg/ml de BET pour s'assurer de l'absence de dégradation. Un µl d'ADN est préparé à partir des concentrations mesurées précédemment pour chaque échantillon et déposé sur le gel avant migration de 1h dans un tampon TBE et révélation aux ultraviolets.

### 5. Assemblage des génomes

La suite des travaux sur les séquences repose sur la mise en place d'un certain nombre d'outils bioinformatiques :

- par l'utilisation directe de lignes de commandes sur un système Linux avec lequel sont compatibles la quasi-totalité des outils d'analyse bio informatique.

- par l'utilisation d'une plateforme Galaxy qui fournit une interface simple accessible en ligne pour certains outils bioinformatiques parfois complexes [160]. Nous avons utilisé la plateforme MIGALE de l'Institut National de Recherches *Agr*onomiques (INRA) qui donne accès à une instance Galaxy. La version des programmes utilisés par cet intermédiaire sont donc rappelés dans leur version Galaxy : FastQC (Galaxy v 0.10.0) par exemple.

### a) Contrôle qualité des séquences brutes

Les séquences brutes produites par le séquenceur prennent la forme de fichiers Fastq, les adaptateurs sont préalablement retirés par le prestataire GATC. Ce format contient toutes les séquences obtenues sous la forme de séquences courtes issues d'un seul amplicon, ou reads, de 125 pb environ dans notre travail. Le séquençage étant établi par paires nous disposons alors pour chaque souche d'un fichier FastQ1 et d'un fichier FastQ2 où chaque read est identifié de manière à pouvoir être ensuite associé à son read pair. Par ailleurs ce format FastQ donne pour chaque base un score de qualité basé sur la probabilité d'erreur du nucléotide fournit, il donne une idée de la qualité de la séquence consensus obtenue puisqu'il existe un taux d'erreur incompressible lors du séquençage. Il s'agit d'un score « phred » (du nom du programme d'origine, Phred, lui ayant donné naissance dans le cadre des contrôles qualités des premiers séquençages). Il est traduit par un code normalisé Américain pour l'échange d'informations, l'ASCII. Cette évaluation qualitative de chaque nucléotide et de chaque read est fondamentale avant leur utilisation. Des programmes sont disponibles afin d'effectuer l'ensemble des contrôles sur ces séquences à partir de ces scores, comme le programme FastQC (Galaxy v 0.10.0). Cet outil permet plusieurs mesures :

- Score de qualité par positions de bases : doit être en moyenne supérieur à 30 pour être suffisant.
- Contenu en GC par positions de bases : doit être normalement constant.
- Contenu en GC global : doit correspondre à ce qui est attendu pour la bactérie si des séquences sont déjà connues, 33.8% pour *S. lugdunensis*.
- Distribution des tailles des séquences : permet de s'assurer que l'objectif de reads de 125 pb est bien rempli.
- Nombre de séquences dupliquées
- Surreprésentation de motifs : permet notamment de rechercher des contaminants résiduels comme les adaptateurs.

### b) Assemblage des séquences brutes

L'assemblage des séquences brutes nécessite l'utilisation de programmes menant des opérations mathématiques complexes. Le processus central consiste à retrouver pour tous les reads des zones de recouvrement suffisamment significatives pour considérer qu'elles proviennent de la même zone d'ADN et que la séquence qui en résulte est la bonne, on parle de séquence consensus (Figure 18).

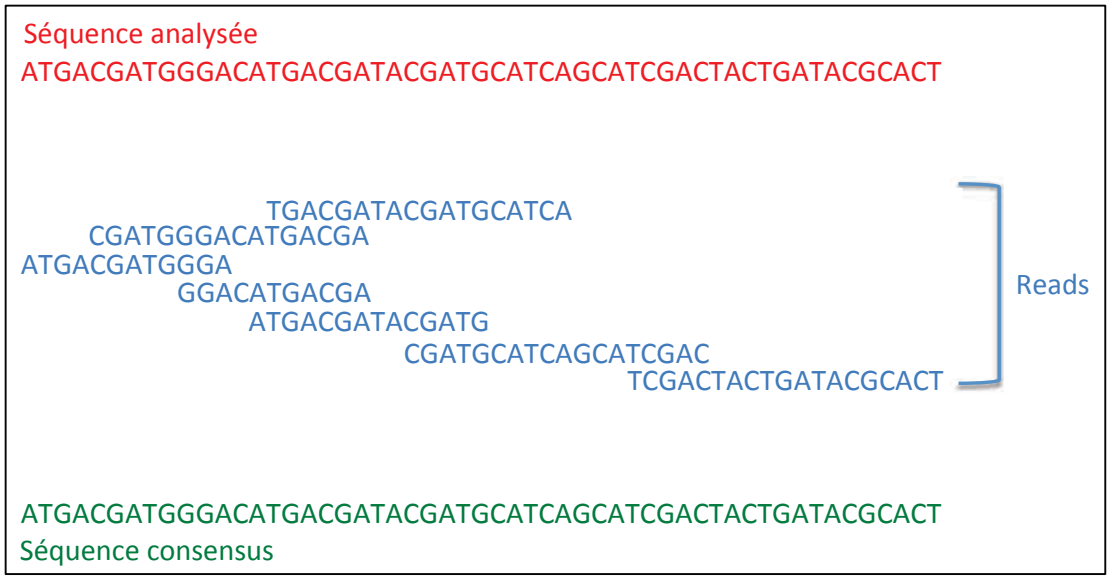



**Figure 18.** Représentation schématique d'une séquence consensus à partir de reads issus d'un séquençage.

Néanmoins ce type d'assemblage est difficilement réalisable en pratique car il consomme une quantité importante de mémoire vive compte tenu de la quantité de reads produits. Pour palier à ce problème les programmes d'assemblage procèdent à une découpe préalable de ces reads en fragment de petites tailles que l'on appelle K-mers, K représentant la taille du fragment, par exemple pour des fragments de 3 pb on parle de 3-mers. Le programme assemble l'ensemble de ces K-mers en retrouvant les zones de recouvrement comme décrit dans la Figure 18. L'assemblage de ces K-mers est possible en déterminant dans un ensemble de K-mers recouvrant les K-mers se suivant, ce qui revient à établir un graphe de De Bruijn. Il consiste à retrouver tous les recouvrements d'une longueur K-1 comme expliqué dans la Figure 19. On parle de chemin puisque ce graphe retrouve avec l'ensemble des K-1 mers disponibles le chemin qui permet de reconstituer une séquence consensus. Cette méthode mathématique est d'une grande efficacité et diminue la mémoire vive nécessaire pour réaliser l'assemblage. La longueur des alignements de séquence est beaucoup plus petite et le processus repose surtout sur une analyse redondante que l'ordinateur est plus à même de mener à bien rapidement et efficacement qu'en recherchant des alignements plus longs.

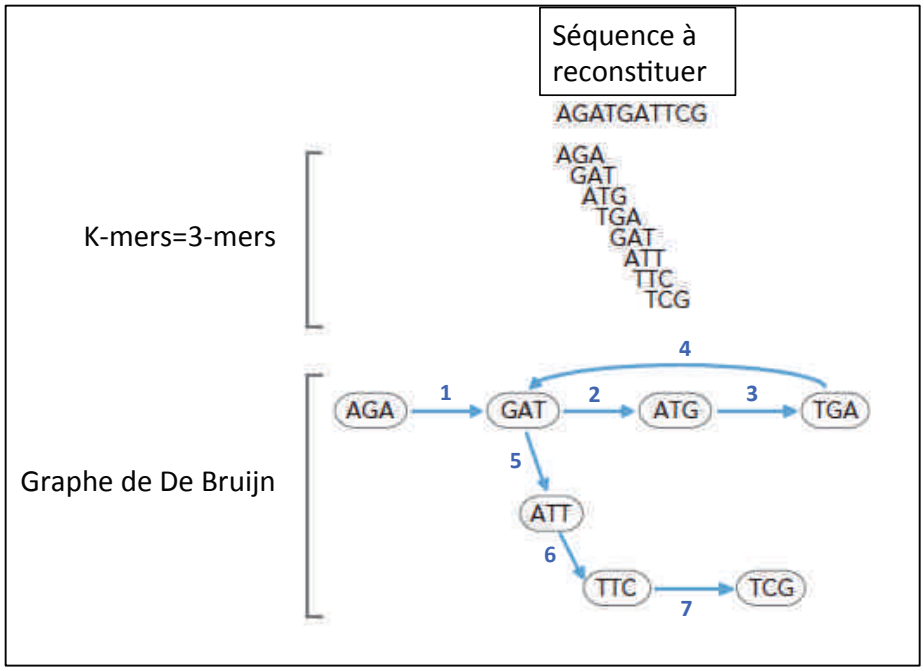



**Figure 19.** Découpage d'un read de 10 pb en ensemble de 3-mers. (Adapté de Illumina De Novo Sequencing Technical Note, http://support.illumina.com/sequencing/literature.html, accès le 17 janvier 2017).

Il existe plusieurs programmes d'assemblage répondant chacun à des besoins spécifiques. Plusieurs études ont comparé la performance de ces programmes en fonction des données : type d'ADN (bactérien, viral ou humain) et au type de données (reads Illumina ou autres techniques de séquençage). Le programme SPAdes offre des performances optimales pour les génomes bactériens de petite taille et avec des séquences Illumina [161]. Le principal élément d'incertitude consiste à choisir les K-mers qui donneront le meilleur assemblage final. Après plusieurs essais et compte tenu des données de la littérature nous avons choisis les K-mers 21, 33 et 55 (Galaxy v 1.4). Le programme ne permet pas d'obtenir d'emblée une séquence entière mais des fragments assemblés, plus ou moins longs, on parle de contigs. Il donne pour chaque contig sa taille et son niveau de couverture c'est à dire le nombre de reads qui ont été alignés pour le fabriquer sachant que plusieurs reads peuvent couvrir la même région, c'est à la base du niveau de couverture qui constitue un critère qualitatif de l'interprétation de la séquence. Certains critères de qualité doivent être remplis pour considérer les reads produits qui peuvent résulter d'aléas mathématiques. Nous avons retenus des reads de taille minimale de 500 pb et avec une profondeur de couverture d'au moins 10, des niveaux habituellement retenus dans la littérature. Le programme SPAdes permet de sélectionner les contigs selon ces critères. Enfin, nous contrôlons 2 critères qualitatifs majeurs dans une procédure d'assemblage : N50 et N90. Il s'agit de paramètres qui permettent d'avoir une représentation de la répartition de la longueur des contigs dans l'assemblage. Un assemblage fait de nombreux contigs de petite taille est souvent de moins bonne qualité qu'un assemblage de contigs de plus grandes tailles. La valeur N50 est la taille en kb du plus petit contig au delà duquel la somme de la taille

des contigs est ≥50% de la taille totale du génome. La valeur N90 est la taille en kb du plus petit contig au delà duquel la somme de la taille des contigs est ≥90% de la taille totale du génome. Il n'existe pas de valeurs seuil mais dans le cadre de soumission de génomes à la banque de données GeneBank par exemple on retient que la valeur N50 doit être >5 kb. Autrement dit, la somme de tous les contigs de plus de 5 kb doit représenter au moins 50% de la taille totale du génome. Le taux de couverture minimale retenu par GeneBank pour les contigs inclus dans une séquence est de 10.

SPAdes (v 3.10.1) a été utilsé en lignes de commandes sur les génomes de grande taille car l'interface Galaxy ets limitée dans la taille des fichiers natifs. La ligne de commande suivant a été utilisée :

« spades.py –k 21,33,55 –-careful -1 read_1.fastq -2 read_2.fastq –o output directory »

Le paramètre « –k » correspond aux choix des K-mers comme nous l'avons expliqué précédement.

L'option « –-careful » permet de corriger certaines erreurs d'assemblage comme des décalages ou des insertions et délétions accidentelles dans l'assemblage.

### c) Assemblage final

Le programme d'assemblage peut donc donner un ensemble de contigs qui répondent aux critères qualitatifs décrits ci-dessus. Ces contigs peuvent ensuite être assemblés sous la forme de scaffolds qui constituent un ordonnancement supérieur à l'aide d'un génome de référence quand il est disponible. Pour *S. lugdunensis* l'existence de 2 génomes complets et annotés permet de mener ce travail. Le principe est d'aligner ces contigs à la séquence connue de manière à obtenir un ordre cohérent avec les séquences précédentes. Certains programmes peuvent ensuite tenter de combler les « trous » qui séparent ces contigs, soit en repartant des séquences brutes (fichiers Fastq) soit en inscrivant un nombre déterminé de « N » à la place des nucléotides. En effet l'alignement à la séquence de référence peut montrer que 2 contigs sont en fait éloignés d'à peine quelques nucléotides. Nous avons utilisé une suite de logiciels à partir des contigs produits par SPAdes et ce après contrôle qualitatif et retrait des contigs ne répondant pas aux critères qualitatifs préétablis. Il s'agit de la suite PAGIT, dont nous décrivons ici les principales fonctionnalités dans le cadre de ce travail, mais une description détaillée de la fonctionnalité de chaque programme et les lignes de commande utilisées sont détaillées dans l'article princeps [162].

- **Etape 1, alignement des contigs sur une séquence de référence :** le programme ABACAS (Algorithm-Based Automatic Contiguation of Assembled Sequences v 1.3.1) permet d'aligner les contigs dans le bon ordre sur une séquence de référence (nous utilisons ici la souche séquence N920143) [163]. Les contigs ne s'alignant pas sur le génome de référence sont mis dans un fichier séparé. La ligne de commande et options suivantes ont été utilisées :

« perl $PAGIT_HOME/ABACAS/abacas.pl –r N920143_genome –q spades_assembly –p nucmer –m –b –o output_prefix »

L'option « –p nucmer » correspond au choix d'un alignement des sequences à partir de la sequence nucléotidique.

L'option « –m » permet d'afficher un génome aligné sous la forme de plusieurs fichiers de sorite (format fasta).

L'option « –b » conduit à garder les contigs non alignés dans un fichier séparé et de pouvoir donc ensuite retravailler dessus.

**- Etape 2, combler les trous entre ces contigs et produire des scaffolds :** le programme IMAGE (Iterative Mapping and Assembly for Gap Elimination, v 2.4.1) permet de combler certains trous de séquence en repartant des fichiers bruts (Fastq1 et Fastq2) [164]. Pour cela le programme recherche tous les reads pairés pouvant se placer sur l'extrémité d'un contig et ce de manière itérative jusqu'à la fermeture du trou de séquence où jusqu'à ce qu'il n'y ai plus de reads pairés appropriés. Une étape supplémentaire de scaffolding nécessite une autre commande à partir du fichier produit. La ligne de commande et options suivantes ont été utilisées pour combler les trous à partir de la sortie d'ABACAS :

« perl $PAGIT_HOME/IMAGE/image.pl –scaffolds ABACAS_assembly –prefix read_1.fastq read_ 2.fastq –iteration 1 –all_iteration 9 –dir_prefix ite –kmer 55 »

Le paramètre « –iteration » définissent le nombre de fois où le programme va repartir du dernier fichier de sortie pour tenter, à nouveau, de comble les trous à partir des fichiers fastq natifs. Le chiffre 9 est apparu après plusieurs essais comme le plus adapté.

Le paramètre « –kmer » définit la taille des Kmers utilisés par le programme sur les reads bruts dans la tentative de comblement des tours. Nous avons utilisé des tailles variables selon les génomes et les essais, entre 31 et 91.

La ligne de commande et options suivantes ont été utilisées pour l'étape de production d'un scaffold :

« perl $PAGIT_HOME/IMAGE/contigs2scaffolds.pl IMAGE_assembly IMAGE_assembly_placed 300 0 scaffolds »

Le paramètre « 300 » donne le nombre de N qui seront insérés dans le scaffold en presence d'un trou de sequence.

Le paramètre « 0 » donne la taille minimum des contigs qui peuvent être inclus dans le scaffold, en choisissant 0 on donne ainsi l'ordre au programme d'inclure tous les contigs dans le scaffold.

**- Etape 3, correction des erreurs dans la séquence consensus :** nous utilisons le programme ICORN (Iterative Correction of Reference Nucleotides, v 0.97) [165]. Le programme ICORN corrige les insertions, délétions (jusqu'à 3 pb) en partant de la

séquence consensus issue des analyses précédentes sur laquelle sont de nouveau alignés les reads des fichiers bruts (Fastq1 et Fastq2).

« icorn.start.sh IMAGE_scaffold_assembly 1 6 read_1.fastq read_2.fastq 100,500 250 »

Le paramètre « 1 6 » fait reference au nombre d'itérations qui vont être lances dnas le programme de correction, 6 itérations est un chiffre standard qui s'est révélé suffisant dans le cas de nos génomes.

Le paramètre « 100,500 250 » correspond à la taille estimée minimale, maximale et moyenne des insertions des reads pairés. Dans le cas du séquençaqge Illumina que nous avons utilisé pour les assemblages la taille moyenne des insertions des reads pairés est bien de 2x125 pb c'est-à-dire 250 pb.

- **Etape 4, visualisation de la séquence finale :** nous utilisons le programme Artemis (v 16.0.0) qui permet aussi d'effectuer secondairement des comparaisons de séquence [166].

- **Etape 5, analyse qualitative de la séquence :** nous utilisons le programme QUAST (Galaxy v 2.1) pour analyser la séquence consensus finale en termes de longueur et contenu en GC, mais aussi pour la comparer à la séquence de référence choisie et donner des statistiques importantes comme le niveau de couverture de la séquence de référence par cette nouvelle séquence.

### d) Annotation des génomes

L'annotation des génomes nouvellement assemblés est une étape fondamentale dans le cadre d'un travail de séquençage *de novo*. Plusieurs programmes d'annotation sont disponibles et nous avons décidé d'utiliser la suite de programmeS AGMIAL en collaboration avec l'INRA de Jouy en Josas [167]. AGMIAL permet tout d'abord une analyse des contigs (Contig Analysis Manager) qui permet la détection et classification des gènes (SHOW), la détection des ARNt (tRNA-Scan), la détection des ARNr (RNAmmer) et la détection des terminateurs (Petrin) puis transmet les données à un analyseur des séquences peptidiques extrapolées de ces données (Protein Analysis Manger). Ce dernier analyse les produits des gènes à la recherche de similarités (domaines, motifs, signatures fonctionnelles) et permet la visualisation des voies métaboliques du génome. Pour chaque protéine, on retient alors le meilleur « hit » Blast contre UniProt : $e \leq 10^{-3}$ et un alignement sur 50% de la longueur ou plus. AGMIAL produit en fin de processus un fichier GeneBank visualisable avec de nombreux programmes comme Artemis (v 16.0.0) ou Integrative Genome Viewer (IGV, v 2.3) et exploitable par de nombreux logiciels d'analyse fonctionnelle du génome que nous aborderons dans le paragraphe suivant [166][168].

### e) Analyse fonctionnelle des génomes

L'analyse fonctionnelle des génomes est une étape fondamentale pour l'interprétation des caractéristiques génétiques globales de la bactérie. Cette analyse revient à déterminer le rôle biologique de chaque protéine potentielle identifiée dans le cadre de

l'annotation du génome assemblé. Il existe plusieurs méthodes d'analyses fonctionnelles mais la plus consensuelle repose sur un vocabulaire précis mis en place depuis 1998 par un consortium de chercheurs impliqués dans la génomique et l'interprétation des données issues de séquençage, c'est le Gene Ontology Consortium [169]. Depuis sa mise en place cette base de données s'est massivement enrichie et fournit aujourd'hui un langage consensuel qui permet d'interpréter des données issues d'annotations de gènes et de les représenter sous la forme de tableaux ou de graphiques. Il existe plus de 40000 termes ontologiques s'intégrant dans 3 catégories principales : les processus biologiques, les fonctions moléculaires et la localisation cellulaire [170]. Les processus biologiques correspondent à la capacité d'une protéine à entrainer une chaine de réaction biologique, avec un début et une fin déterminées, et ayant une finalité biologique connue comme par exemple une fonction de métabolisation d'un substrat ou de biosynthèse. Une fonction moléculaire correspond à une fonction isolée de la protéine comme par exemple son activité catalytique. Enfin, la localisation cellulaire permet de prédire la localisation finale de la protéine comme par exemple une protéine membranaire ou cytoplasmique. Un gène codant une protéine peut donc être interprété à plusieurs niveaux par ses ontologies. L'interprétation des données à l'échelle d'un génome entier est difficile à l'état brut et nécessite d'associer des filtres à ces catégories en fonction de la question qui est posée. Dans le cas de *S. lugdunensis*, nous cherchons à avoir une carte d'identité globale des gènes annotés. Le principe repose donc sur la mise en place de catégories mères ou « GO slims ». Il existe d'infinies possibilités, mais la question que nous posons dans ce travail est assez simple et habituelle dans le cadre de l'analyse d'un nouveau génome et nous avons utilisé les GO slims génériques accessibles sur le site du « GO consortium » [171].

Pour obtenir les GO terms de chaque gène annoté il existe de nombreux programmes et nous avons utilisé le programme InterProScan (v 4.8) avec la ligne de commande suivante :

« iprscan –cli –i strain.faa –nocrc –iprlookup –goterms –format raw –o final_file.txt »

Les options de ce logiciel ont été choisi par les collaborateurs de l'INRA qui ont lancé ce programme au sein de la platefiorme bioinformatique de l'INRA.

InterProScan est aussi le fruit du travail d'un consortium remettant constamment à jour la base de données [172][173]. Il s'agit d'un logiciel accessible en ligne ou en ligne de commandes pour les recherches s'effectuant à l'échelle d'un génome entier. Le principe central repose sur l'identification de motifs fonctionnels au niveau de la séquence peptidique à l'aide de multiples outils d'identification de motifs comme SignalIP par exemple qui permet la recherche de peptides signaux sur une séquence peptidique, ou des outils plus généraux reposant souvent sur des processus markoviens comme Pfam. Au final plus de 10 programmes peuvent être utilisés comme ressource d'identification [172].

La représentation des résultats sous la forme de graphiques est nécessaire pour illustrer les résultats mais les données sont brutes sont essentielles pour tout travail de comparaison. Pour les besoins de ce travail, nous avons utilisé un programme élaboré dans le cadre d'une collaboration avec Mr Nicodème Paul (Immunologie Rhumatologie

Moléculaire - INSERM U1109 – Université de Strasbourg) permettant la création de graphiques quantitatifs à partir des fichiers bruts des GO slims.

### f) Comparaison des génomes

Nous avons tout d'abord utilisé le programme QUAST (Galaxy v 2.1) qui permet une comparaison très générale du génome nouvellement assemblé à un génome de référence. Nous avons ensuite mené deux approches comparatives complémentaires.

- **Alignement des séquences au génome de référence :** nous avons utilisé le programme BRIG (Blast Ring Image Generator, v 0.95) qui est un programme bénéficiant d'une interface graphique très simple d'usage permettant de manière circulaire un génome sur lequel viennent s'aligner des séquences qui lui sont comparées [174]. Ces comparaisons sont basées sur un BLAST entre la séquence de référence et la séquence à comparer et un ensemble de filtres permettent de fixer les limites de similarité. L'intérêt est de pouvoir visualiser de manière globale l'alignement de 2 séquences, puisqu'en l'absence de séquence semblable le programme laisse un blanc dans la séquence qui est comparée, mais surtout de pouvoir rechercher des gènes dans cette référence et visualiser rapidement leur présence dans les séquences comparées. Ce programme s'applique aussi parfaitement à la représentation circulaire de séquences plus courtes associées à leurs annotations, comme nous le verrons dans le paragraphe dédié aux éléments génétiques mobiles. Dans le cadre de cette étude, nous avons donc aligné la séquence de référence N920143 (référence NCBI : NC_017353.1) à l'ensemble des 7 séquences produites.

- **Relations phylogénétiques :** nous avons voulu explorer les relations phylogénétiques entre nos différents génomes, mais aussi avec les génomes déjà disponibles dans la banque de données Gene Bank. Nous avons utilisé l'outil CSI Phylogeny (v 1.4) qui est un outil en ligne permettant de construire un arbre phylogénétique à partir de génomes entiers [175]. Nous avons inclus les 7 séquences nouvelles de notre étude, ainsi que les autres séquences de *S. lugdunensis* disponibles dans Gene Bank : N920143 (référence NCBI : NC_017353.1) HKU09-01 (référence NCBI : NC_013893.1), FDAARGOS_141 (référence NCBI : NZ_CP014022.1) et FDAARGOS_143 (référence NCBI : NZ_CP014023.1). Cet outil base son analyse sur les polymorphismes nucléotidiques uniques (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) de haute qualité et nous avons fixé les paramètres suivants :
- Profondeur minimale de couverture : 10
- Distance minimale entre 2 SNP : 10 pb
- Qualité minimale : 30
- Z score : 1.96

Il s'agit des paramètres par défaut du progarmme qui sont particulièrement adaotés à l'étude phylogénétique des génomes bactériens de petite staille comme ceux des staphylocoques.

### g) Recherche d'éléments génétiques mobiles

**Recherche de prophages :** la recherche d'éléments génétiques pouvant correspondre à des prophages a été réalisé par l'intermédiaire de l'outil PHASTER (Phage Search Tool Enhanced Release) [176][177]. Cet outil en ligne recherche sur la séquence nucléotidique du génome ou sur le fichier d'annotation toute séquence compatible avec un phage. Les séquences identifiées sont ensuite annotées par l'outil et analysées (contenu en GC, recherche d'homologies). Un outil de visualisation graphique permet d'analyser le produit de cette annotation.

**Recherche de plasmides :** la recherche de plasmides est plus complexe que celle de phages même si plusieurs outils en lignes sont aussi disponibles. Leurs performances sont néanmoins moins bonnes que pour la recherche de séquences de phage. Nous avons donc utilisé une approche différente en se basant sur les contigs qui n'avaient pas pu être inclus dans le chromosome principal à l'issue de notre procédé d'assemblage. Nous avons réalisé une annotation de novo pour chacun de ces contigs en travaillant particulièrement sur les contigs ayant une profondeur de couverture plus élevée que la moyenne. En effet l'une des particularités des plasmides est qu'ils sont souvent présents en plusieurs exemplaires dans la bactérie. Cette propriété conduit souvent à une amplification anormalement élevée de la séquence lors de l'étape d'amplification du séquençage ILLUMINA. Cela se traduit au final par une profondeur de séquençage de la séquence plus élevée que pour le chromosome bactérien. Il est difficile voir impossible d'établir un lien de proportionnalité précis qui permettrait par exemple d'évaluer le degré de duplication par rapport à la profondeur de séquençage mais l'information de base reste pertinente : une séquence présente en plusieurs exemplaires est plus amplifiée et correspond souvent à un plasmide. Afin de contrôler la qualité de ces contigs extra-chromosomiques nous avons réalisé un alignement des fichiers bruts sur le contig pour nous assurer de l'homogénéité de la couverture. En effet, il est important de s'assurer que la couverture élevée d'un contig n'est pas liée à l'amplification accidentelle d'un ou plusieurs reads sur ce même contig. L'homogénéité de la couverture est contrôlée visuellement à l'aide du logiciel IGV (v 2.3). La procédure d'alignement ou mapping est effectuée à l'aide du logiciel Bowtie (Galaxy v 1.1.2), un logiciel adapté aux séquences ILLUMINA [178].

**Recherche d'îlots de pathogénicité :** de nombreux outils sont disponibles, en ligne ou en lignes de commandes pour la recherche d'îlots, basés sur les propriétés intrinsèques d'un génome et de son annotation [179]. Nous avons utilisé l'outil IslandViewer3 qui est disponible en ligne et qui associe 3 outils : IslandPick, SIGI-HMM et IslandPath-DIMOB [180]. IslandPick analyse les régions variables du génome soumis par rapport à une base de données de génomes proches en partant du principe que les ilots génomiques sont des éléments potentiellement distincts d'une souche à l'autre à la différence du génome de base ou core-génome. L'utilisation d'un logiciel d'alignement des séquences entre elles comme IslandPick permet finalement d'identifier les séquences uniques (logiciel MAUVE). SIGI-HMM est probablement l'un des outils les plus puissants disponibles. Ce logiciel analyse l'utilisation des codons dans chaque gène du génome. La fréquence d'utilisation des codons est relativement stable dans une bactérie et l'identification de modifications de fréquence de cette utilisation signe la présence potentielle d'un ADN étranger. Cette partie de l'analyse est appelée SIGI. Les créateurs du logiciel ont ensuite

introduit un modèle statistique de Markov caché (Hidden Markov Model, HMM) qui reconnaît la forme théorique prise par un îlot génomique. IslandPath-DIMOB étudie sur le génome soumis les variations du contenu en base, en GC notamment, la présence de gènes de mobilité et la fréquence d'utilisation des codons. En effet, les îlots génomique sont des séquences parfois issues d'une espèce distincte et portent des gènes ayant permis sa mobilité qu'ils soient devenus silencieux ou pas. L'ensemble de ces résultats est représenté sous la forme d'un graphique circulaire du génome permettant de visualiser simultanément le résultat de la recherche des 3 logiciels.

### h) Recherche de gènes de virulence

Nous avons recherché tous les gènes de virulence décrits dans littérature et dont la liste est détaillée dans le Tableau annexe 2. Nous avons aussi analysé le locus *agr*, un locus fondamental dans la régulation de la virulence chez *S. aureus*. Pour réaliser cela, nous avons tout d'abord construit des fichiers d'alignement à l'aide du logiciel Bowtie (Galaxy v 1.1.2) et aligné grâce au logiciel IGV (v 2.3) l'ensemble des séquences sur la séquence de *S. lugdunensis* N920143 (référence NCBI : NC_017353.1) porteuse de l'ensemble des gènes étudiés [178][168]. En effet, cette méthode d'analyse ne permet pas d'identifier un gène de virulence particulier s'il n'est pas présent dans le génome de référence. Le logiciel IGV permet aussi de visualiser le polymorphisme nucléotidique de chaque séquence par rapport à la référence (insertion, délétions) et les changements d'acides aminés qui en écoulent (mutation silencieuse, changement d'acide aminé, mutation non-sens).

### i) Synthèse des programmes utilisés

Nous avons réalisé dans le Tableau 15 une synthèse des logiciels utilisés, les modalités d'utilisation et l'objectif recherché pour les travaux d'assemblage et d'analyse des génomes de *S. lugdunensis*. Comme nous l'avons signalé plus haut certains lmogiciels étaient accessibles sous la forme d'outils en ligne (Web Base Tools), avec des interfaces graphiques classiques après installation sur un environnement windows ou mac classique, par lignes de commandes dans un environnement mac ou Linux ou enfin à partir d'une plateforme Galaxy et en particulier ici celle de l'INRA à Jouy en Josas.

**Tableau 15.** Synthèse des logiciels utilisés pour l'assemblage et l'analyse des génomes de *S. lugdunensis.*

| Logiciel utilisé | Modalités | Version | Objectif |
|---|---|---|---|
| **Assemblage et analyse globale des génomes** | | | |
| FastQC | Galaxy | 0.10.0 | Contrôle qualité des reads |
| SPAdes | LDC[1] | 2.9.0 | Assemblage des reads |
| SPAdes | Galaxy | 1.4 | Assemblage des reads |
| ABACAS | LDC | 1.3.1 | Alignement de l'assemblage sur la séquence de référence |
| IMAGE | LDC | 2.4.1 | Fermeture des trous, étape de scaffolding |
| ICORN | LDC | 0.97 | Correction des erreurs d'assemblage |
| QUAST | Galaxy | 2.1 | Contrôle qualité de l'assemblage final |
| AGMIAL | Collaboration INRA | - | Annotation des génomes |
| CSI Phylogeny | Interface Web | 1.4 | Analyse phylogénétiques des génomes |
| **Annotation fonctionelle** | | | |
| InterProScan | LDC | 4.8 | Annotation fonctionnelle des gènes |
| **Représentation graphique des génomes** | | | |
| Artémis | Interface graphique | 16.0.0 | Affichage linéarie des génomes |
| IGV | Interface graphique | 2.3 | Affichage linéaire des génomes |
| BRIG | Interface graphique | 0.95 | Alignement et comparaison des génomes par l'intermédiaire de BLAST |
| **Recherche d'éléments génétiques mobiles** | | | |
| PHASTER | Interface Web | - | Recherche de phages |
| IslandViewer3 | Interface Web | | Recherche d'îlots de pathogénicité |

[1] LDC, Lignes de Commandes

# III. Publication des résultats

## A. Article 1 : L'utilisation de la spectrométrie de masse en routine dans les laboratoires de microbiologie améliore l'identification des staphylocoques à coagulase négative et met en évidence la pathogénicité de *S. lugdunensis*

**Auteurs :** Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, Jaulhac B, Prévost G, Schramm F

**Statut de l'article : publié**

**Revue : Journal of Clinical Microbiology**

**Impact Factor 2014 : 3.9**

**Rang SIGAPS : B**

**Résumé de l'article :**

**Objectifs de l'étude :** Cette étude a pour objectif principal de comparer la performance de la spectrométrie de masse pour l'identification des SCN avec les méthodes phénotypiques d'identification comme avec le Vitek 2 (Biomérieux, Craponne, France). L'objectif secondaire est de déterminer sur un échantillon aléatoire de 50 souches de SCN le nombre de prélèvements répondant aux critères de significativité microbiologiques, autrement dit le nombre de prélèvements qu'il faut considérer comme contaminés ou pas.

**Résultats :** Concernant l'identification des SCN cette étude montre que l'identification systématique des SCN par spectrométrie de masse donne un éclairage tout à fait nouveau sur l'épidémiologie des SCN dans les prélèvements médicaux. Elle montre d'abord que l'identification de SCN est plus fréquente que celle de *S. aureus* sur une période de 1 an (8388 SCN contre 5066 *S. aureus*). Si la fréquence relative des principales espèces de SCN est relativement constante on note par contre l'identification de nouvelles espèces de SCN comme *S. pettenkoferi* dont le rôle en pathologie humaine est de plus en plus décrit ; ou encore une plus grande prévalence d'espèces déjà présentes auparavant comme *S. capitis* ou *S. warneri*. Concernant la significativité microbiologique cette étude révèle que *S. lugdunensis* est l'espèce de SCN la plus souvent significative, dans 40% des prélèvements, alors que la seconde espèce la plus souvent significative, *S. schleiferi*, ne l'est que dans 26% des prélèvements.

**Conclusion :** cette étude qui avait pour objectif premier de montrer le rôle de la spectrométrie de masse dans un laboratoire de microbiologie permet de constater que *S. lugdunensis* ne se comporte probablement pas comme une bactérie commensale simple comme plusieurs publications le signalaient déjà en 2014 lors de l'analyse des résultats. Ces travaux ont conduit à la mise en place de l'étude rétrospective suivante.

JCM

# Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*

**Xavier Argemi,[a] Philippe Riegel,[b] Thierry Lavigne,[a] Nicolas Lefebvre,[c] Nicolas Grandpré,[b] Yves Hansmann,[c] Benoit Jaulhac,[b] Gilles Prévost,[a] Frédéric Schramm[b]**

Université de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Strasbourg, France[a]; Laboratoire de Microbiologie, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France[b]; Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France[c]

**The use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for staphylococcal identification is now considered routine in laboratories compared with the conventional phenotypical methods previously used. We verified its microbiological relevance for identifying the main species of coagulase-negative staphylococci (CoNS) by randomly selecting 50 isolates. From 1 January 2007 to 31 August 2008, 12,479 staphylococci were isolated with phenotypic methods, of which 4,594 were identified as *Staphylococcus aureus* and 7,885 were coagulase negative staphylococci. Using MALDI-TOF MS from 1 January 2011 to 31 August 2012, 14,913 staphylococci were identified, with 5,066 as *S. aureus* and 9,847 as CoNS. MALDI-TOF MS allowed the identification of approximately 85% of the CoNS strains, whereas only 14% of the CoNS strains were identified to the species level with phenotypic methods because they were often considered contaminants. Furthermore, the use of MALDI-TOF MS revealed the occurrence of recently characterized *Staphylococcus* species, such as *S. pettenkoferi*, *S. condimenti*, and *S. piscifermentans*. Microbiological relevance analysis further revealed that some species displayed a high rate of microbiological significance, i.e., 40% of the *S. lugdunensis* strains included in the analysis were associated with infection risk. This retrospective microbiological study confirms the role of MALDI-TOF MS in clinical settings for the identification of staphylococci with clinical consequences. The species distribution reveals the occurrence of the recently identified species *S. pettenkoferi* and putative virulent species, including *S. lugdunensis*.**

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are normal inhabitants of the human skin that lately have revealed themselves as significant etiological agents causing nosocomial infections, particularly in medical devices (1–4). Until recently, the phenotypic identification of >40 currently recognized CoNS species remained a challenge, because the technique was labor-intensive and uncommon CoNS were usually not identified (5, 6). Until recently, CoNS identification at the species level was performed only for clinical isolates that were considered clinically significant according to clinical or microbiological criteria. Meanwhile, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as a reliable, fast, and cost-effective alternative for bacterial species identification and is now widely used in microbiology laboratories (7, 8). This method allows the identification of all staphylococci isolated in the clinical setting, thus rendering the use of well-known tests, such as free or bound coagulase tests, unnecessary. Previous reports have shown that MALDI-TOF MS is a reliable method to identify *Staphylococcus* at the species level; however, questions regarding the impact of such methods in clinical settings remain uncertain (9). *Staphylococcus epidermidis* is probably the major CoNS species causing nosocomial infections, although other CoNS, such as *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, and *S. saprophyticus*, have been reported as even more pathogenic in a range of both nosocomial and community-acquired infections (10–13).

The present study retrospectively compares the results of staphylococcal identifications in the routine workflow of a clinical laboratory before and after implementation of MALDI-TOF MS, details the methicillin susceptibility of the isolates, and compares the pathogenic roles of the various identified CoNS species based on microbiological data. Of the microbiological data, 14,913 staphylococci were identified by MALDI-TOF MS during a 16-month period from almost all clinical specimens without taking into account their possible involvement in a pathogenic process. Using this systematic method, an accurate representation of the various staphylococcal species was obtained in clinical specimens, and novel data for *S. pettenkoferi* and *S. lugdunensis* were acquired.

**Received** 24 January 2015 **Returned for modification** 19 February 2015
**Accepted** 8 April 2015

**Accepted manuscript posted online** 15 April 2015

**Citation** Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, Jaulhac B, Prévost G, Schramm F. 2015. Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin Microbiol 53:2030–2036. doi:10.1128/JCM.00177-15.

**Editor:** R. Patel

Address correspondence to Xavier Argemi, xavier_argemi@hotmail.com.

Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00177-15.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00177-15

Downloaded from http://jcm.asm.org/ on June 19, 2015 by UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

**TABLE 1** Criteria for microbiological relevance of bacteria isolated from clinical specimens according to the European Manual of Clinical Microbiology

| Specimen type | Culture result | Direct examination result | Associated flora | Considered significant |
|---|---|---|---|---|
| Blood culture | ≥2 positive bottles with same bacterium | | | Yes |
| | 1 positive/1 performed | | | No, but considered doubtful if patient is coming from an oncology ward |
| | 1 positive/≥2 performed | | | No |
| Urine | $\geq 10^5$ CFU/ml | $\geq 10^4$ leukocytes/ml | | Yes |
| | Other results | | | No |
| Intravascular catheter | >1,000 CFU/ml | | | Yes |
| | <1,000 CFU/ml plus positive blood culture with same bacterium | | | Yes |
| | Other results | | | No |
| Superficial | ≥2 positive | Cocci Gram positive | | Yes |
| | 1 positive/1 performed | Cocci Gram positive | 1 species | Yes |
| | Other results | | | No |
| Deep | ≥2 positive with same bacterium | | | Yes |
| | 1 positive | Cocci Gram positive | 1 species | Yes |
| | 1 positive | Presence of neutrophil polynuclear cells | | Doubtful |
| | Other results | | | No |

## MATERIALS AND METHODS

**Laboratory identification of CoNS.** All clinical samples were collected at the University Hospital of Strasbourg, France, and microbiological analyses were performed at the hospital laboratory. Our university hospital has 2,428 beds with 87,758 days of hospitalization in 2014 (13,649 days for patients <18 years). The number of day care center hospitalizations was 43,796 (6,594 days for patients <18 years). The median hospital stay is 708 days.

Phenotypic identification was performed for all specimens considered to be significant according to the 2007 Société Française de Microbiologie criteria (14). The strains isolated were first tested for free and bound coagulase. The tube coagulase test for the detection of free coagulase was performed with reconstituted rabbit plasma in EDTA (Bio-Rad Laboratories, Marne-La-Coquette, France). The slide agglutination test (combined detection of clumping factor, staphylococcal protein A, and capsular polysaccharides) was performed with the Pastorex Staph-Plus latex agglutination test (Bio-Rad Laboratories). Staphylococci positive for those two tests were considered to be *S. aureus*, and those negative for both tests or with discordant results were tested with Vitek 2. Analysis was performed from 1 January 2007 to 31 August 2008 using a Vitek 2 system with Gram-positive (GP) and ANC cards for *S. saccharolyticus*, which is anaerobic (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions.

In 2010, MALDI-TOF MS identification was implemented with a MALDI-TOF Microflex LT/LRF coupled to the MALDI Biotyper algorithm, as recommended by the manufacturer (Bruker Daltonics), which replaced phenotypic identification of *Staphylococcus* species. This identification was performed for all staphylococci except those obtained from throat and vaginal swabs that were examined only for beta-hemolytic streptococci according to the 2010 Société Française de Microbiologie criteria (15). Strains of CoNS were plated on Columbia agar with 5% sheep blood and incubated for 24 h at 37°C. One colony from each strain was placed on a 96-spot polished target plate and allowed to dry in room air. Next, 1 μl of matrix (3 mg/ml α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% [vol/vol] acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid [vol/vol]) was overlaid onto the dried sample and allowed to dry.

The acquisition of protein mass spectra was performed on the Microflex LT instrument using the flexControl 3.0 software (Bruker Daltonics), with a mass-to-charge ratio (*m/z*) range of 2 to 20 kDa. Automated data analysis of raw spectra was performed by the MALDI Biotyper RTC 3.0 software (Bruker Daltonics). During the study, the version 3.0.2.0 of the library (3,476 spectra, including 132 spectra from 38 *Staphylococcus* species) was successively updated to version 3.1.1.0 (3,740 spectra, including the same number of *Staphylococcus* spectra) and then to version 3.1.2.0 (3,955 spectra, including 139 spectra from the same 38 *Staphylococcus* species as those of the previous versions) (see Table S1 in the supplemental material).

An identification score of ≥2 was considered a high-confidence identification to the species level, whereas scores of 1.7 to 1.99 were considered intermediate confidence genus-level identification only. Scores of <1.7 were considered an unacceptable identification, according to the manufacturer's recommendations. The results of the identifications from 1 January 2011 to 31 August 2012 were retrospectively analyzed, and strains with an identification (ID) score of <2 were excluded from the analysis.

**Antimicrobial susceptibility testing.** Antimicrobial susceptibility testing was performed with either Vitek 2 or agar diffusion, according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for the 2011 to 2012 study period (http://www.eucast.org/).

**Assessment of microbiological relevance.** The microbiological relevance of 50 samples consecutively selected for each species of CoNS was evaluated according to the European manual of clinical microbiology (EMCM) criteria for interpretation (17) (Table 1). Analysis was started from the most recent sample to each previous sample, until reaching a total of 50 samples. For blood cultures, CoNS were not considered contaminants if there were at least two positive samples for the same bacterium (same species and same antimicrobial susceptibility) in two different sets of blood cultures. For the catheter samples, culture was significant at ≥1,000 CFU/ml or inferior provided it was associated with one blood culture positive for the same bacterium, according to the Cleri criteria (18) modified by Brun-Buisson (19). For urine samples, bacteriuria was significant at $\geq 10^5$ CFU/ml, when associated with leukocyturia at $\geq 10^4$/

Downloaded from http://jcm.asm.org/ on June 19, 2015 by UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

**TABLE 2** Laboratory identification of staphylococci with phenotypic methods and MALDI-TOF MS in a clinical laboratory

| Organism(s) | No. (%) of strains in period: | | | Comparison of periods 1 and 2 (all staphylococci) (*P* value) |
|---|---|---|---|---|
| | 1, isolated from 2007 to 2008 by phenotypic methods ($n$ = 12,479) | 2, isolated from 2011 to 2012 by MALDI-TOF MS identification ($n$ = 14,913) | | |
| | All staphylococci | All staphylococci | Blood cultures | |
| *S. aureus* | 4,594 (36.8) | 5,066 (34) | | <0.001 |
| Nonidentified CoNS | 6,781 (54.3) | 1,459 (9.8) | | |
| Identified CoNS | 1,104 (8.9) | 8,388 (56.2) | | |
| *S. epidermidis* | 694 (62.9) | 5,259 (62.7) | 1,388 (26.4) | 0.915 |
| *S. hominis* | 84 (7.6) | 698 (8.3) | 396 (56.7) | 0.418 |
| *S. haemolyticus* | 84 (7.6) | 975 (11.6) | 150 (15.4) | <0.001 |
| *S. capitis* | 52 (4.7) | 552 (6.6) | 194 (35.1) | 0.017 |
| *S. warneri* | 25 (2.3) | 278 (3.3) | 62 (22.3) | 0.064 |
| *S. lugdunensis* | 25 (2.3) | 205 (2.4) | 17 (8.3) | 0.716 |
| *S. simulans* | 7 (0.6) | 78 (0.9) | 2 (2.6) | 0.330 |
| *S. saprophyticus* | 80 (7.2) | 80 (1) | 3 (3.8) | <0.001 |
| *S. caprae* | 7 (0.6) | 56 (0.7) | 1 (1.8) | 0.897 |
| *S. pettenkoferi* | 0 | 54 (0.6) | 30 (55.6) | |
| *S. schleiferi* | 1 (0.1) | 30 (0.4) | 3 (10) | 0.176 |
| *S. cohnii* | 10 (0.9) | 35 (0.4) | 5 (14.3) | 0.030 |
| *S. pasteuri* | 14 (1.3) | 25 (0.3) | 9 (36) | <0.001 |
| *S. intermedius* | 3 (0.3) | 17 (0.2) | 0 | 0.639 |
| *S. sciuri* | 1 (0.1) | 14 (0.2) | 5 (35.7) | 0.555 |
| *S. auricularis* | 3 (0.3) | 9 (0.1) | | 0.163 |
| *S. xylosus* | 6 (0.5) | 9 (0.1) | | 0.002 |
| *S. saccharolyticus* | 5 (0.5) | 7 (0.08) | | 0.004 |
| *S. condimenti* | 0 | 3 (0.04) | | |
| *S. piscifermentans* | 0 | 3 (0.04) | | |
| *S. carnosus* | 0 | 1 (0.01) | | |
| *S. vitulinus* | 1 (0.1) | 0 | | |
| *S. lentus* | 1 (0.1) | 0 | | |
| *S. chromogenes* | 1 (0.1) | 0 | | |

ml, or when $\geq 10^3$ CFU/ml was detected for *S. saprophyticus*. For other specimens, the criteria previously reported for *Corynebacterium* were used, because CoNS are also inhabitants of skin and mucosal membranes (17). The doubtful category was considered to be not relevant, and those strains were considered to be contaminants in the analysis.

The CoNS studied were *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. pettenkoferi*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, and *S. warneri*. Only 45 samples were studied for *S. cohnii* and 42 samples for *S. schleiferi*. Representations of other species were insufficient to be included in this assessment.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed on the results of staphylococcal identification between periods 1 and 2 to determine whether staphylococcal identification with MALDI-TOF MS was significantly different from the phenotypic identification for each species. The two periods were compared using a chi-square test, with a *P* value of <0.05 considered statistically significant.

We also tested the microbiological relevance of 50 randomly selected clinical strains for statistical significance. Repartition between the two groups, relevant or not relevant, on microbiological criteria was tested using a chi-square test, with a *P* value of <0.05 considered statistically significant.

## RESULTS

**Laboratory identification of CoNS with phenotypic methods.** From 1 January 2007 to 31 August 2008 (period 1, Table 2), 12,479 staphylococci were isolated, of which 4,594 (36.8%) were identified as *S. aureus* and 7,885 were identified as coagulase negative. Identification of CoNS during this period was performed with phenotypic methods only. Among CoNS, 6,781 isolates were not identified to the species level because they were considered contaminants, according to the 2007 Société Française de Microbiologie criteria (14). Conversely, 1,104 (14%) isolates were considered significant and identified as follows: *S. epidermidis* (694, [62.9%]), *S. capitis* (52 [4.7%]), *S. hominis* (84 [7.6%]), *S. haemolyticus* (84 [7.6%]), and 190 others, comprised mainly of *S. saprophyticus* (80 [7.2%]), *S. lugdunensis* (25 [2.3%]), and *S. warneri* (25 [2.3%]).

**Laboratory identification of CoNS with MALDI-TOF MS.** From 1 January 2011 to 31 August 2012 (period 2, Table 2), 14,913 staphylococci were isolated, of which 5,066 (33.9%) were identified as *S. aureus* and 9,847 were identified as CoNS. One-third of the isolation sites were superficial (cutaneous) or deep anatomical regions (osteoarticular, vascular, digestive, or cerebrospinal), followed by respiratory tract and blood (20% each), biomaterial/catheter (9%), and urine (7%) samples. Individually, each of the other type of samples (stool, ocular, and genital) represented <5% of the anatomical sites for *Staphylococcus* isolation. Identification of CoNS during this period was performed with MALDI-TOF MS only. Among the CoNS, 1,459 (14.8%) isolates that were

Downloaded from http://jcm.asm.org/ on June 19, 2015 by UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

**TABLE 3** Oxacillin resistance and microbiological relevance of clinical strains of CoNS isolated in a clinical laboratory

| CoNS studied | Data for strains isolated during the 2007-2008 and 2011-2012 study periods | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Oxacillin resistance data | | Microbiological relevance data | | | |
| | | | | No. (%) considered: | | |
| | No. of antibiograms performed | No. (%) | No. of strains | Relevant | Doubtful | Not relevant |
| *S. epidermidis* | 3,640 | 2,584 (71) | 50 | 7 (14) | 5 (10) | 38 (76) |
| *S. hominis* | 525 | 284 (54.1) | 50 | 11 (22) | 0 | 39 (78) |
| *S. haemolyticus* | 661 | 575 (87) | 50 | 11 (22) | 11 (22) | 28 (56) |
| *S. capitis* | 392 | 145 (37) | 50 | 9 (18) | 6 (12) | 35 (70) |
| *S. warneri* | 204 | 47 (23) | 50 | 9 (18) | 6 (12) | 35 (70) |
| *S. lugdunensis* | 147 | 3 (2) | 50 | 20 (40) | 13 (26) | 17 (34) |
| *S. saprophyticus* | 77 | 25 (32.5) | | | | |
| *S. simulans* | 48 | 1 (2.1) | 50 | 11 (22) | 3 (6) | 36 (72) |
| *S. pettenkoferi* | 44 | 19 (43.2) | 50 | 1 (2) | 4 (8) | 45 (90) |
| *S. caprae* | 35 | 2 (5.7) | 50 | 11 (22) | 5 (10) | 34 (68) |
| *S. cohnii* | 25 | 9 (36) | 45 | 4 (9) | 7 (16) | 34 (76) |
| *S. schleiferi* | 19 | 0 | 42 | 11 (26) | 5 (12) | 26 (62) |
| *S. pasteuri* | 15 | 1 (6.7) | | | | |
| *S. intermedius* | 15 | 2 (13.3) | | | | |
| Total no. | 5,847 | 3,696 | 526 | | | |

not tested with MALDI-TOF MS were from throat and vaginal swabs that were examined only for beta-hemolytic streptococci, according to the 2010 Société Française de Microbiologie criteria (15). The 8,388 CoNS remaining were identified as follows: *S. epidermidis* (5,259 [62.7%]), *S. haemolyticus* (975 [11.6%]), *S. hominis* (698 [8.3%]), *S. capitis* (552 [6.6%]), and another 904. These other 904 CoNS were mainly *S. warneri* (278 [3.3%]), *S. lugdunensis* (205 [2.4%]), *S. saprophyticus* (80 [1%]), and *S. simulans* (78 [0.9%]).

**Comparison between periods 1 and 2.** Statistical analysis revealed that *S. aureus* identification was significantly different for the 2 periods ($P < 0.005$). With regard to CoNS, the identification rates during period 2 were significantly different from those in period 1 for *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. pasteuri*, *S. xylosus*, and *S. saccharolyticus*. Conversely, the identification rates were not significantly different for *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*, or *S. caprae*. Some CoNS identified with MALDI-TOF MS, *S. pettenkoferi*, *S. condimenti*, *S. carnosus*, and S. *piscifermentans*, were never identified with phenotypic method.

**Percentage of strains isolated from blood cultures.** The percentage of strains isolated from blood cultures (Bactec bottles incubated in Bactec 9240 instruments; Becton Dickinson) was determined from 1 January 2011 to 31 August 2012 and compared with that of all remaining sites of isolation after the removal of duplicate data (Table 2). The isolation rate in blood cultures was particularly high for *S. hominis* (396/698 [56.7%]) and *S. pettenkoferi* (30/54 [55.6%]). In contrast, some species, *S. intermedius* (0), *S. caprae* (1/56 [1.8%]), *S. simulans* (2/78 [2.6%]), *S. saprophyticus* (3/80 [3.8%]), and *S. lugdunensis* (17/205 [8.3%]), were rarely isolated in blood cultures.

**Antimicrobial susceptibility testing.** Table 3 shows the results of antimicrobial susceptibility testing performed during the study period. *S. haemolyticus* displayed the highest rate of oxacillin resistance, at 87% among the 661 isolates tested; *S. epidermidis* was also resistant, at a high rate of 71% among 3,640 isolates tested, while *S. hominis* was 54.1% resistant among 525 isolates tested. None of the *S. schleiferi* isolates tested ($n = 19$) displayed oxacillin resistance, while resistance remained low for *S. lugdunensis*, (2% [$n = 147$]), *S. simulans* (2% [$n = 48$]), and *S. caprae* (5.7% [$n = 35$]). Resistance remained intermediary for *S. warneri* (23% among 204 strains), *S. saprophyticus* (32.5% among 77 strains), *S. cohnii* (36% among 25 strains), *S. capitis* (37% among 392 strains), and *S. pettenkoferi* (43.2% among 44 strains).

**Microbiological relevance.** The putative pathogenic role of CoNS was determined as detailed above, consecutively selecting 50 isolates for each species while taking into consideration the microbiological criteria of significance, as detailed in Table 1 (17). The results displayed various rates of relevance. *S. pettenkoferi* was responsible for a putative clinical infectious process in only 2% of the case files studied, *S. cohnii* in 10%, and *S. epidermidis* in 14%. Conversely, *S. lugdunensis* displayed the highest rate of pathogenicity: 40% of the 50 strains selected were considered significant, based on microbiological criteria. Statistical analysis revealed that the repartition between relevant and nonrelevant groups was statistically significant, with a *P* value of $<0.001$.

## DISCUSSION

This study assessed the implementation of mass spectrometry in a microbiological laboratory for the identification of CoNS. The results show that using MALDI-TOF MS in a hospital laboratory increased the identification of CoNS to approximately 85%, whereas only 14% of these staphylococci were identified to the species level prior to MALDI-TOF MS being available. This previous lack of identification was compounded by the high cost and time required for phenotypic tests, as well as the usual poor clinical significance of a majority of CoNS isolated from clinical specimens. Conversely, mass spectrometry is notably able to more accurately carry out *S. aureus* identification than when using slide or tube coagulase tests, and it is faster and cheaper than any current automated system using phenotypic tests (20, 21).

Some studies based on phenotypic identifications previously

Downloaded from http://jcm.asm.org/ on June 19, 2015 by UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

assessed the clinical significance and species distribution of CoNS in various clinical specimens. Kleeman et al. (22) studied the species distribution of 499 CoNS identified by phenotypic methods and found results similar to those reported here with regard to the isolation frequency for each species. *S. epidermidis* constituted 64.5% of all CoNS identified (versus 62.7% in our study), followed by *S. haemolyticus* (13.4% versus 11.6% in our study), *S. hominis* (7.4% versus 8.3% in our study), and *S. warneri* (4.0% versus 3.3% in our study). In our study, based on a greater number of isolates, we also found other species not identified in the Kleeman et al. (22) study, such as *S. pettenkoferi*, *S. schleiferi*, *S. pasteuri*, *S. intermedius-S. pseudintermedius*, and *S. sciuri*.

Interestingly, about 40% of the *S. haemolyticus* isolates in our study came from respiratory specimens, while only 4% of the *S. hominis* isolates did. Likewise, *S. haemolyticus* was found in urine specimens in 11% of the cases and *S. hominis* in <0.1%. Therefore, it could be postulated that *S. haemolyticus* is a normal inhabitant of mucosal membranes, such as those of the mouth or urinary tract, whereas *S. hominis* is a normal inhabitant of the skin.

Statistical analysis of staphylococcal distribution between periods 1 and 2 revealed that MALDI-TOF MS allowed a significantly higher rate of identification to be determined for *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. pasteuri*, *S. xylosus*, and *S. saccharolyticus*. In addition, the use of MALDI-TOF MS revealed the further occurrence of certain species not well known until recently, such as *S. pettenkoferi*, *S. condimenti*, and *S. piscifermentans*. These species are not included in commercially available identification systems based on phenotypic features, and false identification might often occur with these systems (see Table S1 in the supplemental material) (23–25). A total of 54 *S. pettenkoferi* strains were identified during the study period, of which more than half originated from blood cultures. Of note, this species had never been isolated in our laboratory prior to the use of MALDI-TOF MS. From a clinical standpoint, it should be emphasized that this pathogen was described in several pathological instances, especially in immunocompromised patients, bloodstream infections, osteomyelitis, and wound infections (24–26). Its identification with the use of MALDI-TOF MS might therefore have valuable clinical consequences.

Based on phenotypic identifications, Tan, Ng, and Ng (27) also revealed some differences in clinical significance between 175 various CoNS. The authors notably found that 91% of the 53 strains of *S. lugdunensis* studied appeared to be clinically significant. They also found *S. haemolyticus* and *S. capitis* to be less virulent than *S. epidermidis* and *S. warneri*, which was not the case in our study. This may be explained by the smaller number of strains examined in that study.

Since its characterization in 1988 by Freney et al. (28), *S. lugdunensis* has been considered a potential emerging pathogen. Based on a retrospective study, Elamin et al. (29) showed that implementation of MALDI-TOF MS in 2010 for routine diagnostic use allowed the identification of 559 *S. lugdunensis* strains among 20,806 CoNS during a 24-month period, whereas 31 isolates were identified in the preceding 24 months using conventional methods (29). They also performed a clinical analysis for 478 individual isolates of *S. lugdunensis* and found no infectious diagnosis for 80 strains (16.7%), wound infection for 124 strains (25.9%), 99 abscesses (20.7%), and 12 significant bacteremias (2.5%), with 2 endocarditis cases (0.4%). In our study, *S. lugdunensis* was found to be microbiologically relevant in 40% of the cases, in contrast to the remaining CoNS, whose microbiological relevance was never >26%. The 50 *S. lugdunensis* isolates selected here for microbiological analysis originated from various independent sampling sites: superficial specimens ($n = 20$), deep-tissue specimens ($n = 15$), bone/synovial fluid/prosthetic joints ($n = 10$), intravascular catheters ($n = 2$), urine ($n = 1$), heart valve ($n = 1$), and blood culture ($n = 1$). Such associations of *S. lugdunensis* with severe infections were previously reported in various patient cases and series, including specimens from various origins, i.e. endocarditis, skin and soft tissue infections, arthritis, prosthetic joint infections, sepsis without identified gateway, pseudo-toxic shock syndrome, necrotizing sinusitis, and brain abscesses (30–35). *S. lugdunensis* is the second cause of endocarditis due to CoNS, with a poor prognosis in 40% of cases (36). Putative virulence factors have been described in *S. lugdunensis* that may explain its pathogenicity, including a fibrinogen binding protein, a von Willebrand factor binding protein, and possibly a delta-like hemolysin and a beta-hemolysin, although these hemolysins have not been correlated with any clinical type or severity of infection (37–39). The fibrinogen binding protein, also called the clumping factor, yields a positive result in slide coagulase and rapid latex agglutination tests, leading to its misidentification as *S. aureus*.

Interestingly, in our study, *S. schleiferi* was the second most important CoNS for its pathogenicity. This pathogen expresses a clumping factor, as does *S. lugdunensis*, and it also displays beta-hemolysin activity that may be responsible for its erroneous identification as *S. aureus* in the routine laboratory setting (37, 40). Clinical reports that describe infections with this pathogen remain scarce, although they appear unusual in their presentation and severity for a CoNS-mediated infection (40, 41). The production of a fibrinogen affinity factor might be involved in colonization of the vascular endothelium, one of the primary events in the pathogenesis of infective endocarditis, and its implication has been reported in experimental models of endocarditis (42).

Our study also reveals that >50% of the *S. hominis* and *S. pettenkoferi* isolates were recovered from blood cultures. There is no clear explanation for this observation. Previous studies reporting the diversity of CoNS in blood cultures remain sparse and mostly have described the presence of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, likely because they are the two most frequently isolated CoNS in microbiology laboratories (43–46). The rate of isolation in blood cultures was not correlated with pathogenicity in our study, since *S. hominis* and *S. pettenkoferi* displayed a low rate of pathogenicity. Moreover, most of these isolates came from a single positive blood culture; therefore, this could be considered a probable contaminant.

The antimicrobial susceptibility testing revealed a global methicillin sensitivity of 66%, which is similar to the 70% rate reported in the literature (1, 4). Nevertheless, it is noteworthy to compare the rate of methicillin resistance for each strain to its pathogenicity. The present results show that some of the rates are inversely related. *S. lugdunensis* and *S. schleiferi*, CoNS species that have the highest rates of pathogenicity, at 40% and 26%, respectively, also remained methicillin sensitive in 98% and 100% of the cases examined, respectively. Conversely, *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* were methicillin resistant in 87% and 71% of cases, respectively, but displayed low pathogenicity scores of about 22% and 14%, respectively. The impact of *S. aureus* methicillin resistance on clinical virulence is still a matter of debate. Pozzi et al. (47) recently published an *in vitro* study showing that methicillin resis-

Downloaded from http://jcm.asm.org/ on June 19, 2015 by UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

tance might attenuate *S. aureus* virulence (through repression of *agr* transcriptional activity and reduced protease production) and biofilm production in device-associated infections. Such observations have not been made in CoNS, although our data potentially support this hypothesis.

Several limitations of the present study should be acknowledged. Regarding the method described for phenotypic identification, it is well known that free coagulase is present in highly pathogenic species of staphylococci from animals (*S. intermedius* from dogs, *S. delphini* from dolphins, *S. hyicus* from pigs, and *S. lutrae* from otters), and *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, and *S. saprophyticus* can give positive results when tested with the slide agglutination test (48). Therefore, non-*aureus Staphylococcus* strains might have been misidentified as *S. aureus*. It also has to be noted that some deficient *S. aureus* strains lack both free coagulase and clumping factor, and some of these strains might have been misidentified in our study as coagulase-negative staphylococci. However, this bias should be very limited in our study, as both the free coagulase and slide agglutination tests were routinely performed for all isolates, and confirmation with Vitek 2 was systematically performed for deep-tissue samples or when discrepant results were obtained with tube and slide tests.

Another limitation in our study is that we selected for the MALDI-TOF analysis all the CoNS identified to the species level, meaning those with an identification score of ≥2. However, during this study period, it appears that 8% of the staphylococci tested with MALDI-TOF did not reach this threshold, were identified to genus level only, and were omitted from the analysis. Regarding the microbiological significance analysis, the main limitation is the methodology used to determine pathogenicity. Only microbiological criteria were examined and not clinical criteria. It could be postulated that while the microbiological criteria of significance were fulfilled according to EMCM guidelines in this study, it does not necessarily imply that the CoNS were involved in an ongoing infectious process. Nevertheless, the findings described here strongly correlate with previous data from the literature and may represent the first step toward a larger clinical/microbiological prospective analysis to confirm the role of certain CoNS species identified through the use of MALDI-TOF MS. This is especially true for *S. lugdunensis*, which appears to be one of the most pathogenic of the CoNS species. Another limitation regarding identification rate has to be pointed out. We compared the identification rates from periods 1 and 2, but in addition to using MALDI-TOF MS, more isolates were actually worked out in period 2 (1,104 CoNS in period 1 versus 8,388 in period 2). This difference might account for some of the differences in the ID rates between periods 1 and 2. Even if statistical analysis reveals significantly different ID rates, these data have to be read into carefully and confirmed.

In conclusion, the requirement of an accurate and cost-effective method, such as MALDI-TOF MS, to identify even rare CoNS cannot be overlooked at a time when the clinical significance of some CoNS appears to be very heterogenous (49). Exhaustive identification of CoNS by MALDI-TOF MS as well as microbiological criteria allow few suspect staphylococcal species to be identified as having a significant pathogenicity close to that of *S. aureus*, at least for *S. lugdunensis*. The heterogeneity of *S. lugdunensis* isolates is under investigation through a clinical and prospective study, as well as the possibility of a specific virulence content for the species.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was made possible because of data available at the Plateau Technique de Microbiologie of the Strasbourg University Hospital. We thank P. Pothier for English editing assistance.

## REFERENCES

1. **Rogers KL, Fey PD, Rupp ME.** 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am **23:**73–98. http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2008.10.001.
2. **Piette A, Verschraegen G.** 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol **134:**45–54. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.009.
3. **von Eiff C, Peters G, Heilmann C.** 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis **2:**677–685. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00438-3.
4. **Chu VH, Woods CW, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, Federspiel J, Athan E, Stryjewski ME, Nacinovich F, Marco F, Levine DP, Elliott TS, Fortes CQ, Tornos P, Gordon DL, Utili R, Delahaye F, Corey GR, Fowler VG, Jr, International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study Group.** 2008. Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. Clin Infect Dis **46:**232–242. http://dx.doi.org/10.1086/524666.
5. **Zadoks RN, Watts JL.** 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. Vet Microbiol **134:**20–28. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.012.
6. **Loonen AJM, Jansz AR, Bergland JNB, Valkenburg M, Wolffs PFG, van den Brule AJC.** 2012. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol **50:**1437–1439. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06746-11.
7. **Patel R.** 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin Infect Dis **57:**564–572. http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit247.
8. **Patel R.** 2013. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. Clin Chem **59:**340–342. http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2012.183558.
9. **Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, Bonnet R, Delmas J.** 2010. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol **48:**941–945. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00413-09.
10. **Otto M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis*–the "accidental" pathogen. Nat Rev Microbiol **7:**555–567. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2182.
11. **Otto M.** 2011. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin Immunopathol **34:**201–214. http://dx.doi.org/10.1007/s00281-011-0296-2.
12. **Frank KL, Del Pozo JL, Patel R.** 2008. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. Clin Microbiol Rev **21:**111–133. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00036-07.
13. **Thibodeau E, Boucher H, Denofrio D, Pham DT, Snydman D.** 2012. First report of a left ventricular assist device infection caused by *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*: a coagulase-positive organism. Diagn Microbiol Infect Dis **74:**68–69. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.027.
14. **Société Française de Microbiologie.** 2007. Référentiel en microbiologie médicale, Société Française de Microbiologie, Paris, France.
15. **Société Française de Microbiologie.** 2010. Référentiel en microbiologie médicale, 4th ed, Société Française de Microbiologie, Paris, France.
16. Reference deleted.
17. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** 2012. European manual of clinical microbiology, 1st ed. ESCMID-SFM, Paris, France.
18. **Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ.** 1980. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. J Infect Dis **141:**781–786. http://dx.doi.org/10.1093/infdis/141.6.781.
19. **Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M.** 1987. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. Arch Intern Med **147:**873–877. http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1987.00370050069012.
20. **Rajakaruna L, Hallas G, Molenaar L, Dare D, Sutton H, Encheva V, Culak R, Innes I, Ball G, Sefton AM, Eydmann M, Kearns AM, Shah**

Downloaded from http://jcm.asm.org/ on June 19, 2015 by UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

**HN.** 2009. High throughput identification of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF-MS of intact cells. Infect Genet Evol **9:**507–513. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.012.
21. **Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D.** 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. Future Microbiol **5:**1733–1754. http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.127.
22. **Kleeman KT, Bannerman TL, Kloos WE.** 1993. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. J Clin Microbiol **31:**1318–1321.
23. **Trülzsch K, Rinder H, Trcek J, Bader L, Wilhelm U, Heesemann J.** 2002. "*Staphylococcus pettenkoferi*," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis **43:**175–182. http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00399-1.
24. **Loïez C, Wallet F, Pischedda P, Renaux E, Senneville E, Mehdi N, Courcol RJ.** 2007. First case of osteomyelitis caused by "*Staphylococcus pettenkoferi.*" J Clin Microbiol **45:**1069–1071. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02328-06.
25. **Song SH, Park JS, Kwon HR, Kim SH, Kim HB, Chang HE, Park KU, Song J, Kim EC.** 2009. Human bloodstream infection caused by *Staphylococcus pettenkoferi*. J Med Microbiol **58:**270–272. http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.004697-0.
26. **Morfin-Otero R, Martínez-Vázquez MA, López D, Rodríguez-Noriega E, Garza-González E.** 2012. Isolation of rare coagulase-negative isolates in immunocompromised patients: *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus pettenkoferi* and *Staphylococcus pasteuri*. Ann Clin Lab Sci **42:**182–185.
27. **Tan TY, Ng SY, Ng WX.** 2006. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci recovered from nonsterile sites. J Clin Microbiol **44:**3413–3414. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00757-06.
28. **Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, Nervi C, Fleurette J.** 1988. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol **38:**168–172.
29. **Elamin WF, Ball D, Millar M.** 2015. Unbiased species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci: does it change the perspective on *Staphylococcus lugdunensis*? J Clin Microbiol **53:**292–294. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02932-14.
30. **Liu P-Y, Huang Y-F, Tang C-W, Chen Y-Y, Hsieh K-S, Ger L-P, Chen Y-S, Liu Y-C.** 2010. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: a literature review and analysis of risk factors. J Microbiol Immunol Infect **43:**478–484. http://dx.doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60074-6.
31. **Li YM, Blaskiewicz DJ, Hall WA.** 2013. Shunt-related intracranial abscess caused by *Staphylococcus lugdunensis* in a hydranencephalic patient. World Neurosurg **80:**e387–389. http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2013.01.046.
32. **Matthews PC, Lazarus R, Protheroe A, Milford C, Bowler ICJW.** 2011. Acute necrotizing sinusitis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin Microbiol **49:**2740–2742. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00722-11.
33. **Shah NB, Osmon DR, Fadel H, Patel R, Kohner PC, Steckelberg JM, Mabry T, Berbari EF.** 2010. Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. J Clin Microbiol **48:**1600–1603. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01769-09.
34. **Hung T, Zaghi S, Yousefzadeh J, Leibowitz M.** 2012. Necrotizing fasciitis associated with *Staphylococcus lugdunensis*. Case Rep Infect Dis **2012:** 453685. http://dx.doi.org/10.1155/2012/453685.
35. **Arias M, Tena D, Apellániz M, Asensio MP, Caballero P, Hernández C, Tejedor F, Bisquert J.** 2010. Skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus lugdunensis*: report of 20 cases. Scand J Infect Dis **42:**879–884. http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2010.509332.
36. **Petti CA, Simmon KE, Miro JM, Hoen B, Marco F, Chu VH, Athan E, Bukovski S, Bouza E, Bradley S, Fowler VG, Giannitsioti E, Gordon D, Reinbott P, Korman T, Lang S, Garcia-de la-Maria C, Raglio A, Morris AJ, Plesiat P, Ryan S, Doco-Lecompte T, Tripodi F, Utili R, Wray D, Federspiel JJ, Boisson K, Reller LB, Murdoch DR, Woods CW, International Collaboration on Endocarditis–Microbiology Investigators.** 2008. Genotypic diversity of coagulase-negative staphylococci causing endocarditis: a global perspective. J Clin Microbiol **46:**1780–1784. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02405-07.
37. **Hébert GA.** 1990. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. J Clin Microbiol **28:**2425–2431.
38. **Mitchell J, Tristan A, Foster TJ.** 2004. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. Microbiology **150:**3831–3841. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27337-0.
39. **Szabados F, Nowotny Y, Marlinghaus L, Korte M, Neumann S, Kaase M, Gatermann SG.** 2011. Occurrence of genes of putative fibrinogen binding proteins and hemolysins, as well as of their phenotypic correlates in isolates of *S. lugdunensis* of different origins. BMC Res Notes **4:**113. http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-4-113.
40. **Hernández JL, Calvo J, Sota R, Agüero J, Garcia-Palomo JD, Farinas MC.** 2001. Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **20:**153–158. http://dx.doi.org/10.1007/PL00011251.
41. **Kumar D, Cawley JJ, Irizarry-Alvarado JM, Alvarez A, Alvarez S.** 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. Transpl Infect Dis **9:**336–338. http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2007.00222.x.
42. **Moreillon P, Que Y-A.** 2004. Infective endocarditis. Lancet **363:**139–149. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15266-X.
43. **García-Vázquez E, Fernández-Rufete A, Hernández-Torres A, Canteras M, Ruiz J, Gómez J.** 2013. When is coagulase-negative *Staphylococcus* bacteraemia clinically significant? Scand J Infect Dis **45:**664–671. http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2013.797599.
44. **Abdul Rahman Z, Hamzah SH, Hassan SA, Osman S, Md Noor SS.** 2013. The significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in a low resource setting. J Infect Dev Ctries **7:**448–452. http://dx.doi.org/10.3855/jidc.25345.
45. **Elzi L, Babouee B, Vögeli N, Laffer R, Dangel M, Frei R, Battegay M, Widmer AF.** 2012. How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients. Clin Microbiol Infect **18:**E355–E361. http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03964.x.
46. **Rahkonen M, Luttinen S, Koskela M, Hautala T.** 2012. True bacteremias caused by coagulase negative *Staphylococcus* are difficult to distinguish from blood culture contaminants. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31:** 2639–2644. http://dx.doi.org/10.1007/s10096-012-1607-9.
47. **Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, Loftus BJ, Pier GB, Fey PD, Massey RC, O'Gara JP.** 2012. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. PLoS Pathog **8:**e1002626. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002626.
48. **Garcia LS, Isenberg HD.** 2007. Clinical microbiology procedures handbook, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.
49. **Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola BL, Fournier P-E, Rolain JM, Raoult D.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis **49:**543–551. http://dx.doi.org/10.1086/600885.

Downloaded from http://jcm.asm.org/ on June 19, 2015 by UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

**Table S1** Vitek 2 and Maldi Biotyper Databases

| | Vitek 2 GP and ANC[a] | | Maldi Biotyper databases used in this study | | | | | | Maldi Biotyper database current version | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Period 1 | | Period 2 | | | | | | | |
| | | | V3.0.2.0_3476 at 1st Jan., 2011 | | V3.1.1.0_3740 updated 29th July, 2011 | | V3.1.2.0_ 3955 updated 15th Nov., 2011 | | V4.0.0.1_5627 updated 4th Feb., 2014 | |
| | | | species | (subspecies) | species | (subspecies) | species | (subspecies) | species | (subspecies) |
| *S. arlettae* | + | | 2 | | 2 | | 2 | | 3 | |
| *S. aureus* (ssp. *anaerobius* / ssp. *aureus*) | + | (-/-) | 12 | (1/7) | 12 | (1/7) | 12 | (1/7) | 14 | (1/9) |
| *S. auricularis* | + | | 1 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| *S. capitis* (ssp. *capitis* / ssp. *urealyticus*) | + | (+/+) | 6 | (4/1) | 6 | (4/1) | 6 | (4/1) | 7 | (5/1) |
| *S. caprae* | + | | 1 | | 1 | | 2 | | 8 | |
| *S. carnosus* (ssp. *carnosus* / ssp. *utilis*) | + | (+/-) | 3 | (1/2) | 3 | (1/2) | 3 | (1/2) | 3 | (1/2) |
| *S. chromogenes* | + | | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| *S. cohnii* (ssp. *cohnii* / ssp. *urealyticus*) | + | (+/+) | 5 | (3/2) | 5 | (3/2) | 5 | (3/2) | 6 | (3/2) |
| *S. condimenti* | - | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| *S. delphini* | - | | 1 | | 1 | | 1 | | 3 | |
| *S. epidermidis* | + | | 9 | | 9 | | 9 | | 10 | |
| *S. equorum* (ssp. *equorum*) | + | (-) | 2 | (2) | 2 | (2) | 2 | (2) | 4 | (2) |
| *S. felis* | - | | 1 | | 1 | | 1 | | 8 | |
| *S. fleurettii* | - | | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| *S. gallinarum* | + | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |
| *S. haemolyticus* | + | | 8 | | 8 | | 8 | | 12 | |
| *S. hominis* (ssp. *hominis* / ssp. *novobiosepticus*) | + | (+/+) | 6 | (3/1) | 6 | (3/1) | 6 | (3/1) | 7 | (3/1) |
| *S. hyicus* | + | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| *S. intermedius* | + | | 2 | | 2 | | 2 | | 3 | |
| *S. kloosii* | + | | 4 | | 4 | | 4 | | 4 | |
| *S. lentus* | + | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| *S. lugdunensis* | + | | 5 | | 5 | | 6 | | 7 | |
| *S. lutrae* | - | | 3 | | 3 | | 3 | | 6 | |
| *S. muscae* | - | | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| *S. nepalensis* | - | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| *S. pasteuri* | + | | 2 | | 2 | | 2 | | 8 | |
| *S. pettenkoferi* | - | | 4 | | 4 | | 5 | | 6 | |
| *S. piscifermentans* | - | | 1 | | 1 | | 2 | | 2 | |
| *S. pseudintermedius* | - | | 1 | | 1 | | 1 | | 5 | |
| *S. saccharolyticus* | + | | 2 | | 2 | | 2 | | 5 | |
| *S. saprophyticus* (ssp. *bovis* / ssp. *saprophyticus*) | + | (-/-) | 8 | (1/7) | 8 | (1/7) | 8 | (1/7) | 10 | (1/9) |
| *S. schleiferi* (ssp. *coagulans* / ssp. *schleiferi*) | + | | 6 | (2/3) | 6 | (2/3) | 6 | (2/3) | 7 | (3/3) |
| *S. sciuri* (ssp. *carnaticus* / ssp. *rodentium* / ssp. *sciuri*) | + | | 4 | (1/1/2) | 4 | (1/1/2) | 4 | (1/1/2) | 4 | (1/1/2) |
| *S. simiae* | - | | 4 | | 4 | | 4 | | 4 | |
| *S. simulans* | + | | 5 | | 5 | | 5 | | 9 | |
| *S. succinus* (ssp. *casei* / ssp. *succinus*) | - | | 2 | (1/1) | 2 | (1/1) | 2 | (1/1) | 2 | (1/1) |
| *S. vitulinus* | + | | 3 | | 3 | | 3 | | 5 | |
| *S. warneri* | + | | 4 | | 4 | | 4 | | 6 | |
| *S. xylosus* | + | | 4 | | 4 | | 4 | | 4 | |
| *S.* sp. | | | | | | | 2 | | 5 | |
| **Total *Staphylococcus* species** | **27** | | **38** | | **38** | | **38** | | **38** | |
| **Total mass spectra in Maldi Biotyper Database** | NA | | **132** | | **132** | | **139** | | **201** | |

The number of spectra for each *Staphylococcus* species (and subspecies in brackets) present in the successive Maldi Biotyper databases used in this study are indicated in column. The content of the latest Maldi Biotyper database release (current version at march 2013) is indicated for comparison in the last column. The presence of *Staphylococcus* species (and subspecies in brackets) in the Vitek 2 database is indicated by "+", and absence of the species is indicated by "-".
NA: not applicable.

## *B.* Article 2 : Etude rétrospective du rôle pathologique de *Staphylococcus lugdunensis*

**Auteurs :** Nawal Douiri, Yves Hansmann, Daniel Christmann, Mickael Martin, Marion Baldeyrou, Nicolas Lefebvre, Gilles Prévost, Xavier Argemi.

**Statut de l'article : publié**

**Revue : Clinical Microbiology and Infection**

**Impact Factor 2014 : 4.6**

**Rang SIGAPS : B**

**Résumé de l'article :**

**Objectif :** Suite aux résultats décrits dans l'article précédent nous avons voulu étudier systématiquement tous les prélèvements positifs à *S. lugdunensis* de 2010 à 2014 en se basant sur l'étude des dossiers cliniques des patients. Cette période fait suite à la mise en place de l'utilisation systématique de la spectrométrie de masse pour l'identification des SCN nous donnant ainsi une confiance accrue dans l'exactitude des identifications réalisées par rapport aux tests phénotypiques précédemment utilisés, en particulier pour *S. lugdunensis.*

**Résultats :** 215 souches de *S. lugdunensis* ont été identifiées pendant la période de l'étude, provenant de 168 patients différents. Soixante dix souches (41.6%) sont impliquées dans une infection certaine selon les critères définis à priori dont 39 infections ostéo-articulaires, 18 infections de la peau et des tissus mous et 13 bactériémies. Parmi les 39 infections ostéo-articulaires 25 sont survenues sur matériel prothétique articulaire. Enfin, sur l'ensemble des 70 patients infectés, 56 (70%) ont eu besoin d'une intervention chirurgicale dans le cadre de leur infection.

**Conclusion :** cette deuxième étude préliminaire confirme les données microbiologiques qui suggéraient que *S. lugdunensis* soit impliqué dans un processus infectieux dans 40% des cas. Elle révèle aussi de manière totalement inattendue la fréquence d'isolement de cette espèce dans des infections ostéo-articulaires, en particulier prothétiques. Ces données ont servi de rationnel à la mise en place de l'étude prospective VISLISI.

Clinical Microbiology and Infection 22 (2016) 747–748

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Letter to the Editor

# *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections

*Dear Sir,*

*Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative staphylococcus that has emerged over the past 10 years as a significant pathogen. Several clinical studies have emphasized its pathogenicity compared with other coagulase-negative staphylococci causing mainly skin and soft-tissue infections [1]. In a previous study, we used matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to identify strains and observed that *S. lugdunensis* exhibited the highest rate of virulence (40%) of the strains isolated, which were involved in an infectious process [2]. Here, we conducted a retrospective study to analyse all *S. lugdunensis* strains isolated in the laboratory between 2010 and 2014 and assessed the clinical significance of each sample.

We collected all staphylococci identified in our institution from January 2010 to January 2014. The identification of all bacteria was performed using MALDI-TOF MS as previously described [2]. Medical records from the patients included in the study were categorized according to the patient's clinical and microbiological data. Bacteraemia was considered to be proven if at least two blood samples were positive. Bacteraemia was considered doubtful if only one bottle was positive but patients presented with signs of sepsis and no differential diagnosis. Bone, joint and prosthetic joint infections were proven if at least two samples were positive, according to Infectious Diseases Society of America guidelines [3]. If the Infectious Diseases Society of America criteria were not fulfilled, but medical records were suggestive of a bone and joint infection caused by *S. lugdunensis*, then we categorized the case as being doubtful. For skin and soft-tissue, we used national microbiological guidelines to interpret samples in association with medical record data. If patients presented with local or general signs of infection and a monomicrobial sample, we considered the case as being proven, whereas cases involving polymicrobial samples were considered doubtful. Statistical analyses were performed using Stata software, version 11.0 (Stata Corp., College Station, TX). Patients' baseline characteristics were compared with Fisher exact test or by $\chi^2$ analysis for differences in proportions. p values were two-sided and considered statistically significant if $p < 0.05$. The study was approved by the French Ethical Committee (CPP IV Est, Strasbourg, France) (see Table 1).

In total, 11 605 strains of staphylococci were identified during the study period, including 3486 (30%) *Staphylococcus aureus*, 4727 (40.7%) *Staphylococcus epidermidis*, 558 (4.8%) *Staphylococcus haemolyticus*, 215 (1.8%) *S. lugdunensis* and 2619 (22.5%) other coagulase-negative staphylococci. After removing duplicate samples from the same patients, 168 cases of *S. lugdunensis* remained in our study data set. Among these, 67 (39.9%) strains arose from bone and joints, 44 (26.2%) came from skin and soft tissue, and 27 (16.1%) from blood cultures. Thirty (17.8%) of our patients were excluded: 25 because of sample mislabelling, three because they were <18 years of age, and two because medical records were not available. Samples mislabelled were defined as those without information regarding their origin. Among the 67 strains arising from bone, joint and prosthetic joints, 39 patients presented with a proven infection, 23 were doubtful, and five were considered as contaminations. Among the 39 proven infections the samples were collected directly from surgery for 35 patients: bone biopsies, soft-tissue biopsies and sonication of removed prosthesis. Joint aspiration was performed for four patients. Twenty-five (64.1%) infections occurred on prosthetic materials: 15 prosthetic joints (knee, $n = 12$; hip, $n = 2$; shoulder, $n = 1$), ten osteosynthesis/arthrodesis (knee, $n = 2$; ankle, $n = 2$; spinal, $n = 2$; tibial, $n = 2$; toe, $n = 2$). Nineteen infections (48.7%) were considered acute and 20 (51.3%) were chronic. Regarding the 44 skin and soft-tissue infections, 18 were considered proven, 15 doubtful, and 11 as contaminations. Ten (55.6%) patients had a clinical abscess (five of which were in the breast), and it is of interest to note that one patient had a necrotizing infection. Thirteen episodes of proven bacteraemia were identified, whereas six remained doubtful and eight samples were considered as contaminations. Among the patients with proven bacteraemia, three cases of endocarditis were recorded. Fifty-six patients (80%) among the 70 with proven infections underwent surgical intervention for *S. lugdunensis* infection and 55 had confirmatory cultures from surgery. Antibiotic treatment targeted specifically *S. lugdunensis* in 60 patients among 70. This retrospective study confirmed that *S. lugdunensis* is frequently involved in pathogenic processes as 41% of the clinical isolates examined were not considered as contaminants. This rate is in accordance with our previously published data and the literature [2,4]. Bone and joint infections were frequent sources in this study, one possible explanation for this is the choice of methodology used by our laboratory to analyse joint fluid and prosthetic devices. Indeed, bacteriologists systematically inoculate paediatric blood culture bottles (BACTEC PED PLUS, BD Diagnostics, Le Pont de Claix, France) for joint-fluid analysis and sonicate prosthetic materials before the inoculation of culture media. We also found that most of the patients presenting with proven bone and joint infections did not have fever or neutrophilic leucocytosis even if those parameters were collected before antibiotic or surgical treatment. Our study is limited by its retrospective design, but a prospective study is ongoing and aims to evaluate the pathogenicity of *S. lugdunensis* and describe its specific infectious features (NCT02026895).

http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.031
1198-743X/© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Table 1**
Characteristics of patients presenting with proven *Staphylococcus lugdunensis* infection ($n = 70$)

| | Bone and joint infections ($n = 39$) | Skin and soft-tissue infection ($n = 18$) | Bacteraemia ($n = 13$) | p [a] |
|---|---|---|---|---|
| Age (years) | 63.1 | 52.4 | 62.6 | 0.086 |
| Sex (male/female) | 21/18 | 8/10 | 10/3 | 0.187 |
| Nosocomial infection | 19 (48.7%) | 7 (38.9%) | 10 (66.0%) | 0.099 |
| Community infection | 20 (51.3%) | 11 (61.1%) | 3 (23.1%) | 0.099 |
| Co-morbidities | | | | |
| Diabetes | 11 (28.2%) | 5 (27.8%) | 4 (30.8%) | 0.665 |
| Renal insufficiency | 8 (20.5%) | 2 (11.1%) | 5 (38.5%) | 0.183 |
| Cancer | 3 (7.7%) | 3 (16.7%) | 4 (30.8%) | 0.113 |
| Congestive heart failure | 6 (15.4%) | 0 | 5 (38.5%) | 0.015 |
| Charlson co-morbidity index | 4.1 | 3.2 | 6.3 | 0.017 |
| Foreign bodies/prosthetic joints | 25 (64.1%) | 0 | 10 (76.9%) | <0.001 |
| Clinical characteristics | | | | |
| Fever | 5 (12.8%) | 6 (33.3%) | 11 (84.6%) | <0.001 |
| Neutrophilic leucocytosis | 4 (10.3%) | 7 (38.9%) | 6 (46.2%) | 0.008 |
| Neutropenia | 0 | 0 | 1 (7.7%) | 0.108 |
| Elevated C-reactive protein | 29 (74.4%) | 13 (72.2%) | 13 (100%) | 0.111 |
| Mean C-reactive protein measurement (mg/L) | 66.9 | 64.4 | 135.1 | 0.081 |
| Mortality due to *S. lugdunensis* infection | 1 (2.6%) | 0 | 3 (23.1%) | 0.011 |

[a] p values were considered statistically significant if p <0.05

## Funding

None.

## Transparency Declaration

All authors report no conflicts of interest for this article.

## References

[1] Bocher S, Tonning B, Skov RL, Prag J. *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community. J Clin Microbiol 2009;47:946–50.
[2] Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, et al. Implementation of MALDI-TOF MS in routine clinical laboratories improves identification of coagulase negative staphylococci and reveals the pathogenic role of Staphylococcus lugdunensis. J Clin Microbiol 2015;53:2030–6.
[3] Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Executive summary: diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2013;56:1–10.
[4] Elamin WF, Ball D, Millar M. Unbiased species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci: does it change the perspective on *Staphylococcus lugdunensis*? J Clin Microbiol 2015;53:292–4.

N. Douiri*
*Hopitaux universitaires de Strasbourg, Maladies infectieuses, Strasbourg, France*

Y. Hansmann
*CHU, Infectious Diseases, Strasbourg, France*

N. Lefebvre
*Hopitaux Universitaires de Strasbourg, Infectious Diseases, Strasbourg, France*

P. Riegel
*Nouvel hopital civil, laboratoire de microbiologie, Strasbourg, France*

M. Martin
*Hopitaux universitaires de Strasbourg, Clinical Immunology, Strasbourg, France*

M. Baldeyrou
*Hopitaux Universitaires de Strasbourg, Infectious Diseases, Strasbourg, France*

D. Christmann
*CHU, Infectious Diseases, Strasbourg, France*

G. Prevost
*Faculte de medecine, Fédération de Médecine Translationnelle, EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

X. Argemi
*Nouvel Hopital Civil, Maladies Infectieuses et Tropicales, Strasbourg, France*

* Corresponding author.
*E-mail address:* nawal.douiri@chru-strasbourg.fr (N. Douiri).

24 March 2016
Available online 11 June 2016

Editor: L. Leibovici

## C. Article 3 : Identification d'une métalloprotéase comme potentiel facteur de virulence de *Staphylococcus lugdunensis* dans l'étude clinique prospective VISLISI

**Auteurs :** Xavier Argemi, Gilles Prévost, Philippe Riegel, Daniel Keller, Nicolas Meyer, Marion Baldeyrou, Nawal Douiri, Nicolas Lefebvre, Kilifa Meghit, Cécile Ronde-Oustau, Daniel Christmann, Sarah Cianférani, Jean Marc Strub, Yves Hansmann.

**Statut de l'article : publié**

**Revue : Clinical Microbiology and Infection**

**Impact Factor 2014 : 4.6**

**Rang SIGAPS : B**

**Résumé de l'article :**

**Objectif :** l'étude VISLISI a pour objectif de rechercher un ou des facteurs de virulence chez *S. lugdunensis* en menant une étude prospective monocentrique clinique des infections à *S. lugdunensis* et en recherchant dans le même temps des facteurs de virulence au sein du laboratoire. Concernant l'étude clinique le nombre de sujet nécessaire a été fixé à 82 et les inclusions se sont étendues de décembre 2013 à février 2016. Le détail des facteurs de virulence recherché est détaillé dans le chapitre matériel et méthodes de cette étude. Les objectifs secondaires sont : décrire la présentation clinique des infections à *S. lugdunensis* et rechercher des facteurs de risque clinique et immunologiques. Les analyses statistiques ont été faites sur la base des modèles Bayésiens, méthodes inférentielles qui d'une manière très générale évaluent la probabilité d'un événement en fonction de la probabilité des événements déjà évalués. Cette méthode statistique donne une évaluation de l'OR et sa probabilité statistique sous la forme d'une probabilité d'association *pr*.

**Résultats :** L'analyse des résultats cliniques montre que sur 347 patients ayant un prélèvement positif à *S. lugdunensis* 129 (37.2%) présentent une infection certaine compte tenu des critères d'inclusion et 82 ont été inclus dans l'étude mais un patient a été exclu secondairement pour défaut lié au document de consentement éclairé. Sur les 81 patients inclus la majorité présente une infection ostéo-articulaire (n=28, 34.6%), le plus souvent sur prothèses articulaires (n=16), puis des infections de la peau et des tissus mous (n=23, 28.4%), des bactériémies (n=8, 9.9%) et d'autres localisations (n=22, 27.2%). La recherche de facteurs de virulence met en évidence la présence d'une activité protéolytique chez 50 souches (61.7%). Cette protéolyse est due à une protéase de type métalloprotéase que nous avons purifiée par chromatographie par échange d'ions et séquencée par nano LC-MS/MS. Cette technologie associe une séparation des peptides issus de la protéine (digestion à la trypsine) par chromatographie liquide à haute performance et une spectrométrie de masse en tandem comme décrite dans le paragraphe des matériels et méthodes. La séquence peptidique obtenue comparée à une base de données montre que cette protéase présente 62.4% d'homologies de séquence avec la protéine SHPI. SHPI est une métalloprotéase isolée de *Staphylococcus hyicus*, un

SCN rependu en médecine vétérinaire. La protéase produite par *S. lugdunensis* a été appelée lugdulysine. Nous avons ensuite réalisé un séquençage complet du gène de la protéase par l'intermédiaire des séquences *de novo* obtenues dans le cadre de la deuxième partie de l'étude VISLISI. Cette séquence génétique confirme la séquence peptidique obtenue par nano LC-MS/MS et montre qu'il s'agit, comme SHPI, d'une protéine sécrétée (présence d'un peptide signal) sous forme immature (préprotéine). Nous avons ensuite réalisé une PCR sur l'ensemble des 81 souches et montré que toutes étaient porteuses du gène *shpI* (codant pour la lugdulysine) posant ainsi la question de l'expression de ce gène, sa régulation, mais aussi de notre méthode d'évaluation de l'activité protéolytique. L'analyse statistique a enfin montré une association statistique forte entre cette protéase et les infections ostéo-articulaires (OR=1.82, IC=0.7-4.9, *pr*=0.89).

**Conclusion :** l'étude VISLISI a permis de mettre en évidence la production par *S. lugdunensis* d'une nouvelle métalloprotéase, statistiquement associée aux infections ostéo-articulaires. D'une manière générale, nous confirmons les résultats obtenus rétrospectivement et montrons l'importance clinique de cette bactérie, mais aussi son implication dans les infections ostéo-articulaires.

Clinical Microbiology and Infection 23 (2017) 334.e1–334.e8

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

# VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*

X. Argemi [1, 2, *, 8], G. Prévost [2, 3, 8], P. Riegel [2, 3], D. Keller [3], N. Meyer [4], M. Baldeyrou [1], N. Douiri [1], N. Lefebvre [1], K. Meghit [5], C. Ronde Oustau [6], D. Christmann [1, 2], S. Cianférani [7], J.M. Strub [7], Y. Hansmann [1, 2]

[1)] *Hôpitaux Universitaires, Maladies Infectieuses et Tropicales, Strasbourg, France*
[2)] *Université de Strasbourg, CHRU de Strasbourg, VBP EA7290, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Institut de Bactériologie, 3 Rue Koeberlé, Strasbourg, France*
[3)] *Hôpitaux Universitaires, Laboratoire de Microbiologie, Strasbourg, France*
[4)] *Hôpitaux Universitaires, Service de Santé Publique, Strasbourg, France*
[5)] *Hôpitaux Universitaires, Immunologie Clinique, Strasbourg, France*
[6)] *Hôpitaux Universitaires, Service de Chirurgie Orthopédique, CCOM, Strasbourg, France*
[7)] *Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Département des Sciences Analytiques, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 (CNRS-UdS), Strasbourg, France*

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 18 September 2016
Received in revised form
28 November 2016
Accepted 14 December 2016
Available online 23 December 2016

Editor: G. Lina

*Keywords:*
Bone and joint infections
Mass spectrometry
Metalloprotease
*Staphylococcus lugdunensis*
Virulence factors

ABSTRACT

*Objective:* *Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative staphylococcus that displays an unusually high virulence rate close to that of *Staphylococcus aureus*. It also shares phenotypic properties with *S. aureus* and several studies found putative virulence factors. The objective of the study was to describe the clinical manifestations of *S. lugdunensis* infections and investigate putative virulence factors.
*Method:* We conducted a prospective study from November 2013 to March 2016 at the University Hospital of Strasbourg. Putative virulence factors were investigated by clumping factor detection, screening for proteolytic activity, and sequence analysis using tandem nano-liquid chromatography-mass spectrometry.
*Results:* In total, 347 positive samples for *S. lugdunensis* were collected, of which 129 (37.2%) were from confirmed cases of *S. lugdunensis* infection. Eighty-one of these 129 patients were included in the study. Bone and prosthetic joints (PJI) were the most frequent sites of infection ($n = 28$; 34.6%) followed by skin and soft tissues ($n = 23$; 28.4%). We identified and purified a novel protease secreted by 50 samples (61.7%), most frequently associated with samples from deep infections and PJI (*pr* 0.97 and *pr* 0.91, respectively). Protease peptide sequencing by nano-liquid chromatography-mass spectrometry revealed a novel protease bearing 62.42% identity with ShpI, a metalloprotease secreted by *Staphylococcus hyicus*.
*Conclusion:* This study confirms the pathogenicity of *S. lugdunensis*, particularly in bone and PJI. We also identified a novel metalloprotease called lugdulysin that may contribute to virulence. **X. Argemi, Clin Microbiol Infect 2017;23:334.e1–334.e8**
© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are major human skin flora crucial for maintaining homeostasis of the skin microbiome. However, CoNS are also recognized as significant pathogens mainly causing nosocomial infections in patients with epithelial barrier breaches [1]. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*

* Corresponding author. X. Argemi, Infectious Diseases Department, Strasbourg University Hospital, 67000, Strasbourg, France.
*E-mail address:* xavier.argemi@chru-strasbourg.fr (X. Argemi).
[8] X. Argemi and G. Prévost contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.018
1198-743X/© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

and *Staphylococcus haemolyticus* are the most frequently isolated CoNS in human diseases, but matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) has revealed other infectious CoNS species, such as *Staphylococcus lugdunensis* [2]. This CoNS is part of the normal skin flora, particularly in the pelvic region, groin area, lower extremities and axillae [3]. Clinical reports have shown that rates of virulence for nosocomial and community infections as well as the level of severity are similar to that of *S. aureus* [2,4]. Among other phenotypic similarities, *S. lugdunensis* shares with *S. aureus* a linked coagulase that yields a positive result in slide coagulase and rapid latex agglutination tests, often leading to misidentification as *S. aureus* [5]. *Staphylococcus lugdunensis* expresses various adhesion factors that are possibly involved in endocarditis, including von Willebrand and fibrinogen adhesion proteins as well as cytotoxic factors, i.e. a δ-like haemolysin, β-haemolysin and haemolysin III [6]. It is also able to produce a biofilm that is mainly proteinaceous and is the only CoNS carrying an ESAT-6 system [7]. In addition, *S. lugdunensis* encodes a streptolysin S-like toxin system and iron-regulated surface determinant similar to *S. aureus* in terms of organization and sequence. Genes for enterotoxins G and I were identified from clinical samples [8]. The clinical presentation of severe *S. lugdunensis* infection may be caused by virulence factor production. For example, necrosis was observed in some skin or deep infections, suggesting that *S. lugdunensis* elicits a non-appropriate inflammatory response or produces aggressive compounds, such as cytolysins and enterotoxins, as found in some *S. aureus* infections [9]. *Staphylococcus lugdunensis* was also involved in bone and joint infections that may be facilitated by the production of the metalloprotease aureolysin, as recently demonstrated for *S. aureus* [10]. The main objective of this prospective study is to describe the clinical manifestations of *S. lugdunensis* infection and to assess the role of various *in vitro* factors that could be associated with virulence. To this end, we conducted a prospective study of all *S. lugdunensis* infections encountered and evaluated putative virulence factors at the laboratory level.

## Materials and methods

### *Population study and ethical approval*

This prospective study was conducted from November 2013 to March 2016 at the University Hospital of Strasbourg, France. Microbiological analyses were performed at the hospital laboratory and virulence factor investigations were performed at the Medical University Laboratory, EA7290. The study and consent forms were approved by the French Ethics Committee (IDCRB-2013-A01057-38) and promoted by the University Hospital of Strasbourg (PRI 2013–HUS no. 5616). This study was also registered at clinicaltrial.gov under number NCT02026895.

Inclusion criteria were age >18 years and *S. lugdunensis* infection as confirmed by clinical signs and previously published microbiological criteria [2]. Bone, joint and prosthetic joint infections (PJIs) were defined by two or more positive intraoperative cultures or a combination of positive preoperative aspiration and intraoperative cultures according to the PJI guidelines of the Infectious Diseases Society of America (IDSA) [11]. For patients with only one bone sample positive for *S. lugdunensis*, infection was confirmed by three criteria: clinical signs of infection, positive pure culture, and from samples that did not come from known niches for this organism (groin area, lower extremities or axillae) [3]. Bacteraemia was confirmed if at least two blood samples were positive or if only one bottle culture was positive, but the criteria of Souvenir *et al.* were fulfilled [12]. Skin and soft-tissue infections were confirmed if the patients presented with local signs of infection and two positive microbiological samples or one positive sample but in pure culture. Central venous catheter infections were defined by local signs of infection and culture with $\geq$ 1000 CFU/mL according to the Cleri criteria modified by Brun-Buisson *et al.* [13]. For urinary tract infections, we used national guidelines. Bacteriuria was considered significant at $\geq 10^5$ CFU/mL when associated with leucocyturia at $\geq 10^4$ CFU/mL. Exclusion criteria were age under 18 years and no social insurance.

### *Data collection and follow up*

Patients were clinically evaluated on enrolment. The following biological parameters were recorded: haemoglobin level, platelet, leucocyte, neutrophil and lymphocyte counts, creatinine clearance, and C-reactive protein level. Patients were monitored for 1 month, and the following immunological parameters were then collected: leucocyte, neutrophil, lymphocyte, $CD4^+$ T-cell, $CD8^+$ T-cell, $CD56^+$ T-cell and $CD20^+$ B-cell counts, complement levels (C3, C4, CH50) and immunoglobulin dosage. Patients were categorized according to the presence or absence of seven features indicative of virulence: sepsis, deep infection, material infection, abscess, portal of entry for the infection, bacteraemia, immune deficiency, and bone and joint infection.

### *Strain identification and antimicrobial susceptibility*

All strains were identified by MALDI-TOF/MS as previously described according to the manufacturer's instructions (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) [2]. Antimicrobial susceptibility testing was performed using a VITEK 2® automated ID/AST instrument (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or agar diffusion tests according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for the 2013–2016 study period [14]. Samples from prosthetic devices were systematically sonicated and inoculated into paediatric blood culture bottles (BACTEC PED PLUS, BD Diagnostics, Le Pont de Claix, France) in addition to the regular culture method.

### *Virulence factors analysis*

*Clumping factor detection*. A rapid latex agglutination test was used to detect fibrinogen adhesion factor. Pastorex™ Staph Plus (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) is a rapid slide latex agglutination assay designed for the detection of *S. aureus* clumping factor, capsular polysaccharide and protein A. However, protein A has not been detected in *S. lugdunensis* and monoclonal antibodies for capsular polysaccharides are species specific. Hence, a positive result with *S. lugdunensis* favours the presence of clumping factor.

*Screening for proteolytic activity*. After identification, each strain was cultured on Mueller–Hinton agar plates for 18 h at 37°C. A single colony was then inoculated into 100 mL brain–heart infusion broth and incubated for 18 h at 37°C with shaking. Culture supernatant was collected and filtered through 0.22-μm pore filters. Protease activity was measured using azocasein (Sigma-Aldrich, Vélizy, France) as previously described [15]. One millilitre of the supernatant was added to 200 μL of 7.5 M NaOH, and absorbance at 440 nm was measured to estimate protease activity. The limit of detection for this test was defined as 3× SD of the mean for negative controls.

Protease purification was achieved by ion-exchange chromatography on an Akta Purifier (GE Healthcare, Vélizy, France). The strain VISLISI_22 was chosen for protease purification as it displayed a high proteolytic activity according to the azocasein assay. Two-step chromatography was performed. Briefly, culture supernatant from brain–heart infusion broth was harvested by

centrifugation (10 min at 7000 ***g*** and 4°C) and filtered through 0.45-μm pore filters (Merck-Millipore). Filtrate was then eluted with ammonium sulphate (700 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 8) after phenyl source capture (GE Healthcare). A second step of purification on a MonoQ column (GE Healthcare) with NaCl elution (NaCl 280 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 8) allowed identification of fractions, which were retested for protease activity by the azocasein assay. The molecular weight of each fraction was evaluated by SDS–PAGE with Coomassie Blue staining. The 1D gel samples were washed and subjected to enzymatic digestion by trypsin. Extracted tryptic peptides were analysed by nano liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), and sequences were compared against the *S. lugdunensis* database using Mascot. The liquid fraction of the purified protease was analysed by LC-MS using an Alliance 2695 separation module coupled to a micrOTOF-Q mass spectrometer (see Supplementary material, Data S1).

*Whole genome sequencing*

The whole genome sequence was obtained from strain VISLISI_22, the strain used for the protease purification. DNA was extracted and purified using the MasterPure™ DNA Purification kit (Epicentre, Le Perray en Yvelines, France). Whole genome sequencing was performed using Illumina technology: Illumina HiSeq 2500 (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany). Raw data were assembled using SPAdes assembler (v 3.9.0) and the sequence was finished using the PAGIT toolkit from Sanger Institute [16,17]. The assembled genome was compared with one of the available genome, *S. lugdunensis* N920143 (NCBI Reference Sequence: NC_017353.1) using Integrative Genome Viewer [18]. Command lines for the bioinformatics tools used are available in Supplementary material, Data S2.

*Gene distribution*

After protease identification and whole genome sequencing, we performed a PCR on all strains to examine the distribution of the gene coding for the protease previously identified and sequenced. DNA extraction and purification were performed as described in the previous paragraph. The primers synthesized were as follow: 5'-GATCGTCAACATTTGAATGAAT-3' as the forward primer and 5'-GTGCAGTATTCGTATCACCTGGA-3' as the reverse primer, amplifying a 372-bp region (Fig. 3). PCR was performed using a *Taq* PCR Kit (E5000S PCR Kit, New England BioLabs, Evry, France). Thermal cycling conditions included an initial denaturation step (30 s at 95°C), followed by 30 cycles of amplification (denaturation for 30 s at 95°C, annealing for 30 s at 45°C and extension at 68°C for 1 min). A final extension step of 5 min at 68°C was performed before cooling at 4°C. PCR products were analysed by electrophoresis into 1 % agarose gels.

*Statistical analysis*

Continuous variables are expressed as mean (SD). Categorical variables are expressed with frequency and percentages. Inferential statistical analyses were conducted using Bayesian methods [19]. Logistic regressions were used to model the relationships between the putative virulence factor and infection characteristics. Infection characteristics were evaluated at baseline, during follow up and at the final visit. Patients were categorized using the following groups: presence of sepsis, deep infection, foreign body infection, presence of abscess, presence of a portal of entry for the infection, bacteraemia, presence of immune deficiency and PJI. All those categories were analysed according to various variables detailed in Table 2. The results are presented as OR with their 95% credibility interval, and with the probability *pr* that the OR is >1 (which indicates a positive association), i.e. *pr* Pr(OR >1). Larger values of this probability (near 1) indicate higher likelihood of the OR being >1. Smaller values of this probability (near 0) indicate higher likelihood of the OR being <1 (negative relationship). A probability near 0.5 is to be interpreted as a weak probability of a positive or negative relationship. Bayesian analysis does not use the (frequentist) p-value and the *pr* probability must not be confused with a p-value. The log(OR) before was a moderately informative Gaussian distribution ($N$ ($\mu = 0$, $\sigma^2$=2.33)), which implies on prior grounds that the OR has a prior 95% chance to be in the (1/20; 20) interval. According to the Bayesian theory, inference is based on the posterior OR distribution.

The Bayesian analyses were run with JAGS 4.2.0. and R 3.2.0 softwares. After a burn-in of 5000 updates, 100 000 iterations were performed and convergence was checked using trace plots of the sample values for each iteration. Convergence was observed in all cases.

## Results

*Patients*

During the study period, 347 samples positive for *S. lugdunensis* were collected, and 129 (37.2%) came from confirmed infections (Fig. 1). Eighty-two of these 129 patients (63.6%) gave their consent to participate in the study; three patients were excluded because of age (<18 years), 47 did not give their consent, and one patient withdrew consent. Among the 81 patients included in the analysis, 28 (34.6%) presented with bone and joint infections, 23 (28.4%) with skin and soft-tissue infections, 8 (9.9%) with bacteraemia, 5 (6.2%) with urinary tract infections, and 17 (21%) with other infections (five postoperative lymphocele infections, five deep abscesses and seven other infections). One patient presenting with a PJI also had one positive blood culture. Mean age of patients included was 60 years, and a high proportion also had diabetes ($n = 25$; 30.9%) or cancer ($n = 26$; 32.1%) (Table 1). Most patients did not have fever on presentation ($n = 23$; 28.4%). At a biological level, leucocyte and neutrophil counts were usually normal (mean $9 \times 10^9$/L and $6.2 \times 10^9$/L, respectively; normal range $3.9 \times 10^9$ to $10.5 \times 10^9$/L) but C-reactive protein was significantly elevated (mean 77.2 mg/L; normal value <4 mg/L). Most underwent surgery because of *S. lugdunensis* infection ($n = 52$; 64.2%). Regardless of treatment modality, most were cured after 1 month of follow up ($n = 67$; 82.7%). T-cell and B-cell counts and complement dosage were usually normal at follow up. All clinical and biological characteristics were explored in all patient groups as described in the Materials and methods (see Supplementary material, Table S1).

*Microbiological results*

All clinical isolates remained susceptible to methicillin, vancomycin, fluoroquinolones and aminoglycosides. Thirty-five (42.7%) were resistant to fosfomycin, 6 (7.3%) to erythromycin, and four to fusidic acid. Six strains were small colony variants, three from PJI, and three from skin and soft-tissue infections. Two strains were rough colony variants, one from skin and soft-tissue infection, and one from infected postoperative lymphocele. Slide agglutination tests yielded positive results in 53 of 81 (65.4%) strains (see Supplementary material, Table S2).

*Protease identification and purification*

Fifty of 81 strains identified (61.7%) displayed proteolytic activity in the azocasein assay. Protease purification was performed

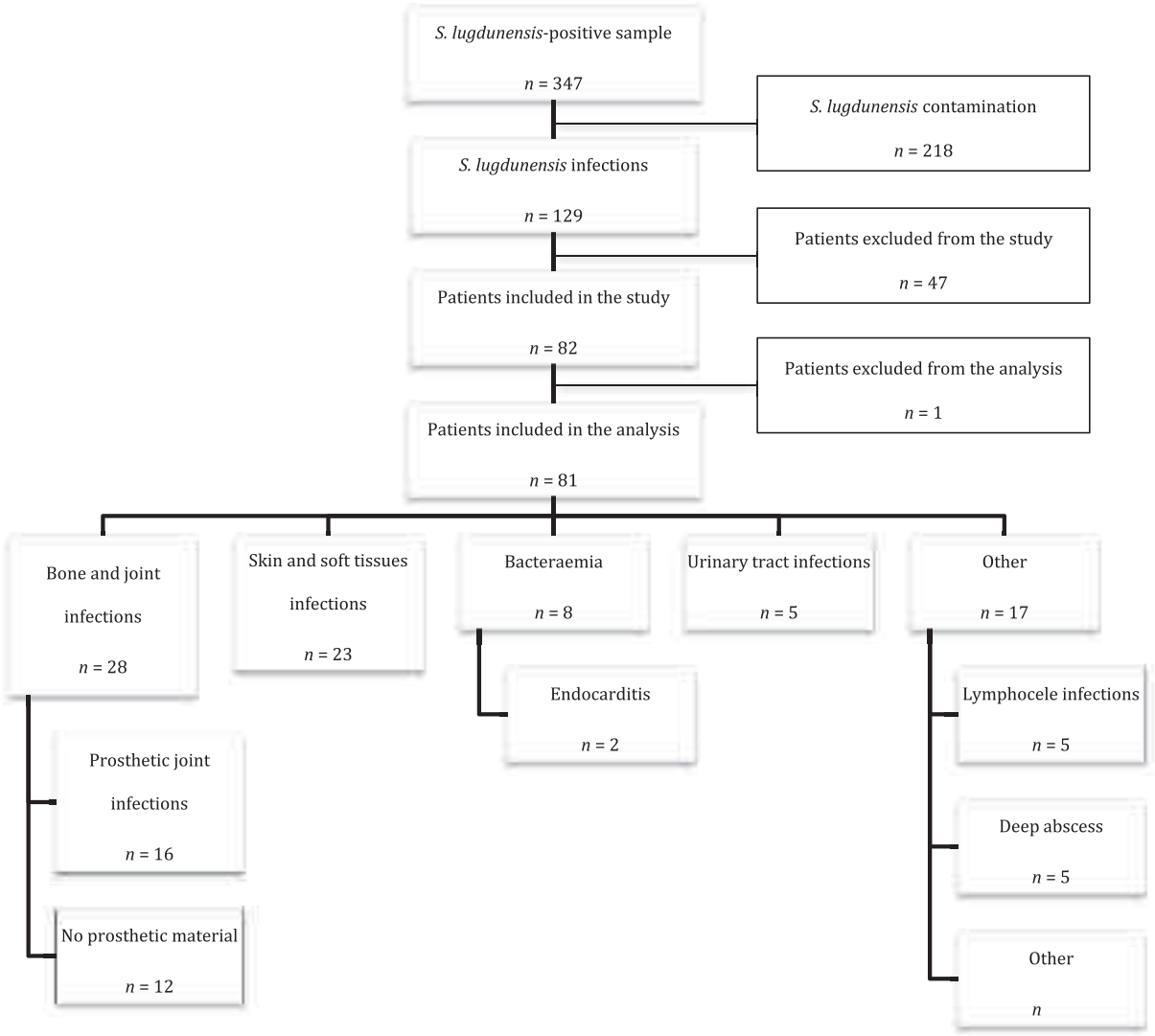



**Fig. 1.** Recruitment of patients with positive samples for *Staphylococcus lugdunensis*.

with strain VISLISI_22 as it displayed strong proteolytic activity in the azocasein assay. The source patient for the VISLISI_22 sample presented with bacteraemia, endocarditis and septic embolism. Ion-exchange chromatography yielded four fractions with proteolytic activity, all with the same molecular weight of 37 kDa (Fig. 2). Lane C in the SDS–polyacrylamide gel showed a putative degraded form of the protease, representing 20% of the fraction. NanoLC-MS/MS analysis after trypsin digestion of gel band C identified a neutral metalloprotease protein with 78% sequence coverage (see Supplementary material, Fig. S1). The LC-MS analysis of liquid fraction C detected 2 components, eluted at 14 and 30.3 minutes (see Supplementary material, Fig. S2). The average mass measured for the major compound eluted at 30.3 min was 39 778.61 ± 0.47 Da. The average mass calculated for the sequence from serine residue 92 to C-terminal asparagine residue 437 was 39 778.44 Da. A homology search found 68% sequence identity with the ShPI metalloprotease (also named hycolysin, GenBank Accession number CAA51745.1) described in another CoNS, *S. hyicus*. Alignment of the peptidic sequences of ShPI from *S. hyicus* and the *S. lugdunensis* VISLISI_22 protease using Clustal revealed 216 identical positions, 97 similar positions, and a global identity score of 62.42%. ShpI is a secreted pre-protein metalloprotease (harbouring an N-terminal signal peptide) of the M30 family (MEROPS Accession number MER0001182) with a typical HEXXH motif (H242 E243 Y244 Q245 H246) at the catalytic site. The VISLISI_22 protease lugdulysin has an identical HEXXH catalytic site but different amino acid positions (H150 E151 Y152 Q153 H154). The results obtained in our study with strain VISLISI_22 and nano LC-MS/MS suggest that lugdulysin is also a metalloprotease secreted in the form of a pre-protein. The peptide sequence we obtained could represent the final secreted form of lugdulysin as the molecular weight of both lugdulysin and the mature form of ShpI from *S. hyicus* are close (37 and 39 kDa, respectively).

### *Whole genome sequence of strain VISLISI_22*

SPAdes assembly of raw fastq files produced 34 contigs with an N50 of 167 kb. PAGIT applications suite produced a main chromosome of 2.6 Mb and 33.7% GC. Whole genome comparison with *S. lugdunensis* N920143 shows that VISLISI_22 shared 94.7% of its genome with this reference strain. Using Integrative Genome Viewer we aligned VISLISI_22 genome with the genome from *S. lugdunensis* strain N920143 and its annotation. We were able to locate the *shpI* locus that is present in VISLISI_22 without any nucleotidic

**Table 1**
Clinical and biological characteristics of patients with *Staphylococcus lugdunensis* infections

| | Patients with *Staphylococcus lugdunensis* infection ($n = 81$) |
|---|---|
| Clinical parameters | |
| Age, years, mean (IQR) | 60 (22) |
| Male | 37 (45.7%) |
| Female | 44 (54.3%) |
| Charlson score, mean (IQR) | 3.5 (3) |
| Cancer | 26 (32.1%) |
| Diabetes | 25 (30.9%) |
| BMI, mean (IQR) | 28.4 (7.7) |
| $T$°C, mean (IQR) | 37.5 (1) |
| $T$°C >38°C | 23 (28.4%) |
| Biological parameters | |
| Haemoglobin, g/dL, mean (IQR) | 11.7 (2.6) |
| Platelets, $10^9$/L, mean (IQR) | 293 (135) |
| Leucocytes, $10^9$/L, mean (IQR) | 9 (5) |
| Neutrophils, $10^9$/L, mean (IQR) | 6.2 (3.9) |
| Lymphocytes, $10^9$/L, mean (IQR) | 1.6 (1.1) |
| Creatinine clearance, mL/min, mean (IQR) | 79.4 (10) |
| CRP, mg/L, mean (IQR) | 77.2 (94.6) |
| Microbiological data | |
| Monomicrobial | 62 (76.5%) |
| Polymicrobial | 19 (23.5%) |
| 1-month follow up | |
| Death due to infection | 0 |
| Cured | 67 (82.7%) |
| Length of hospital stay, days, mean (IQR) | 15.2 (19) |
| Surgery performed | 52 (64.2%) |
| Leucocytes, $10^9$/L, mean (IQR) | 7.3 (3) |
| Neutrophils, $10^9$/L, mean (IQR) | 4.6 (2.1) |
| Lymphocytes, $10^9$/L, mean (IQR) | 1.7 (1.2) |
| Gammaglobulins, g/L, mean (IQR) | 11 (3.4) |
| IgG, g/L, mean (IQR) | 11.5 (3) |
| LT CD4, cells/mm$^3$, mean (IQR) | 849 (641) |
| LT CD8, cells/mm$^3$, mean (IQR) | 409 (408) |

Abbreviations: BMI, Body Mass Index was calculated as the weight in kilograms divided by height in m$^2$; CRP, C-reactive protein; IQR, interquartile range.

polymorphisms. The nucleic acid sequence was translated and the resulting amino acids sequence is presented in Fig. 3. Protein analysis confirms that lugdulysin is a secreted protein (peptide signal sequence was identified using SignalP v 4.1 server) [20]. The last 346 amino acids translated from this locus are identical to the 346 amino acids obtained by nano LC-MS/MS and constitute the mature protein. The 64 amino acids that remain between the putative signal peptide and this mature protein sequence match with the propeptide region.

*Lugdulysin gene distribution among the strains*. All 81 isolates tested with PCR were positive for the gene coding for lugdulysin.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis revealed that positivity for the clumping factor was strongly associated with bacteraemia and immune deficiency ($pr = 0.95$ for both variables) (Table 2). On the contrary, foreign body infections were not strongly associated with clumping factor positivity ($pr = 0.05$). Production of lugdulysin was also strongly associated with deep infections and immune deficiency ($pr = 0.97$ and $pr = 0.98$, respectively), bacteraemia, and bone, joint or PJ infection site ($pr = 0.90$ and $pr = 0.91$, respectively). Diabetes was strongly associated with bone, joint or PJ infection site and with a portal of entry for the infection ($pr = 0.98$ and $pr = 0.99$, respectively). Duration of hospital stay was strongly associated with deep and foreign body infections ($pr = 1$ and $pr = 0.99$, respectively) and with immune deficiency ($pr = 0.93$). Regarding patient follow up, surgery was highly associated with bone, joint or PJ infection ($pr = 1$). Finally, patients with abscesses were unlikely to have deep infections, foreign body infections, bacteraemia ($pr = 0$ for all), or bone, joint, or PJ infections ($pr = 0.02$).

## Discussion

Although *S. lugdunensis* is not a commonly detected CoNS [2], this prospective study confirms the clinical significance of infection. In fact, a high proportion of the patients included in the study required surgery because of *S. lugdunensis* infection, particularly those with bone, joint or prosthetic joint infections.

This pathogen has been isolated more frequently from skin and soft tissue infections than from bone, joint or PJ infections [4,21]. One possible explanation for the high incidence of bone, joint and PJ infections in the current study is the methodology used in our laboratory to analyse joint fluid and prosthetic devices. Bacteriologists systematically inoculate paediatric blood culture bottles (BACTEC PED PLUS, BD Diagnostics, Le Pont de Claix, France) for analysis of joint fluid, tissue specimens and sonicated prosthetic materials before inoculation of culture media. Paediatric blood culture bottles for joint fluid inoculation have proven useful for *Kingella kingae* and *Brucella melitensis* septic arthritis and may also

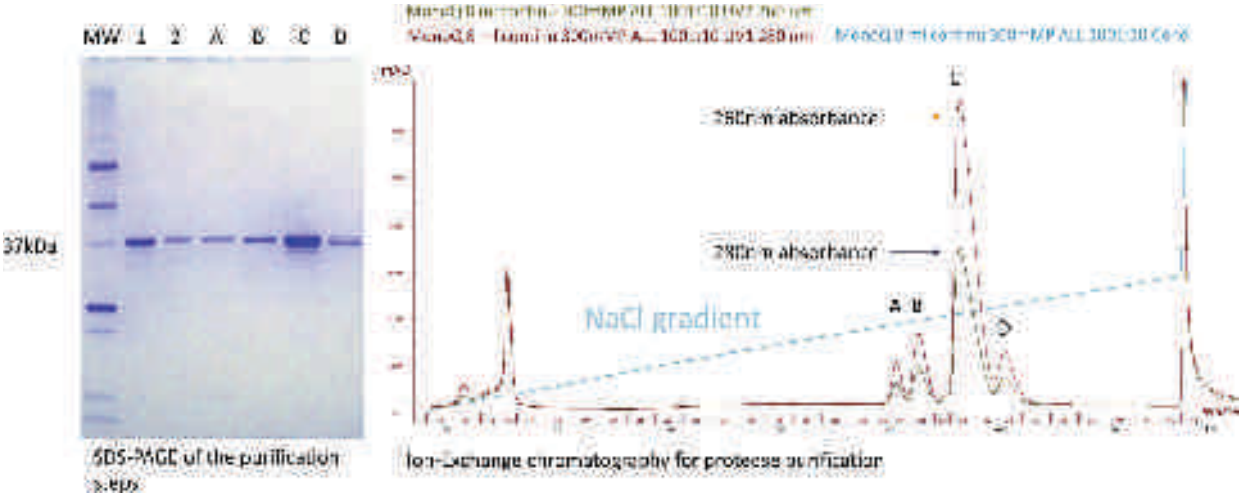



**Fig. 2.** *Staphylococcus lugdunensis* (strain VISLISI_22) protease purification. Elution after phenyl source® capture yielded two fractions with protease activity (lanes 1 and 2). Purification on a MonoQ® column allowed identification of four fractions with protease activity (from lane A to lane D). Lane MW, molecular weight.

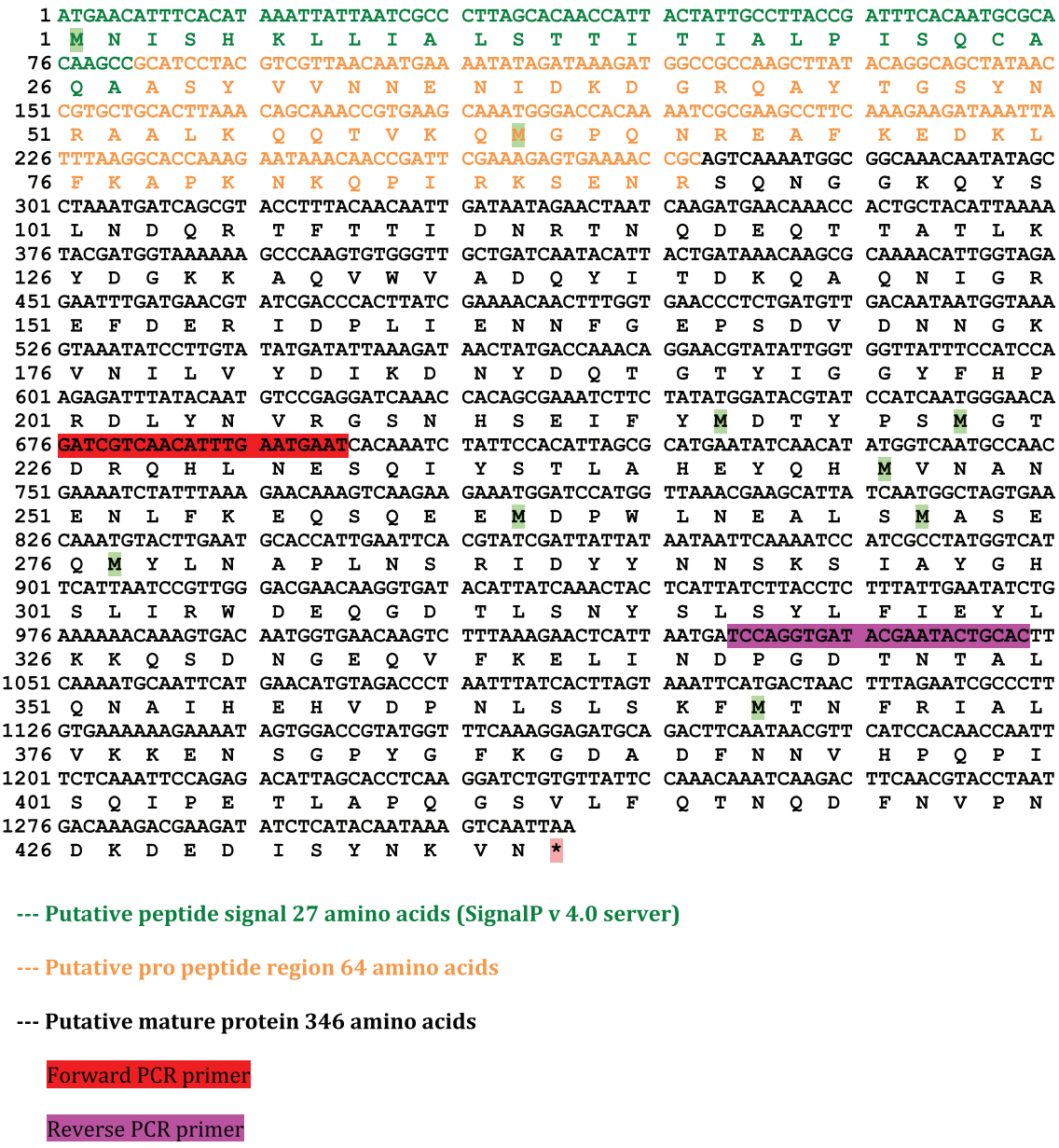



**Fig. 3.** Nucleotides sequence of locus *shpI* from genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* strain VISLISI_22 and protein sequence translation.

be useful for the identification of several other types of bacteria, including staphylococci [22]. The presence of CoNS in deep samples, such as bone and joint fluid samples, is usually interpreted with caution. For PJI, the IDSA recommends that at least two samples yield the same microorganism to mitigate the possibility of contamination (except for known highly virulent pathogens such as *S. aureus*) [11]. In the recent IDSA recommendations for the diagnosis and treatment of native vertebral osteomyelitis, *S. lugdunensis* is considered differently from other CoNS, as image-guided aspiration biopsy is not recommended when blood cultures are positive for this pathogen [23]. Our results underscore the utility of this choice. Bone or joint fluid samples positive for *S. lugdunensis* should be interpreted as recommended for virulent pathogens, such as *S. aureus*, and considered significant not only for vertebral osteomyelitis but also for PJIs. Caution may also be warranted regarding interpretation of *S. lugdunensis*-positive samples derived from or near the normal niches of this species, such as hip, shoulder and ankle, but these infection sites appeared to be far less frequent than knee arthroplasty and diabetic foot infections [24].

The role of diabetes in bone and PJ infections has been reported previously [25]. In diabetes, traumatic or surgical injury may lead to deep chronic painless wounds that are prone to chronic infection. Hyperglycaemia is also a risk factor for PJIs, possibly because of associated immune deficiency [26]. Biofilm formation from *S. lugdunensis*, *S. aureus* and *S. epidermidis* was enhanced by glucose *in vitro*, and biofilm formation plays a crucial role in PJIs [27]. Another explanation for this unusually high incidence of *S. lugdunensis* infections in bones and joints may be the production of virulence factors, as shown for *S. aureus*. Multiple putative virulence factors for *S. lugdunensis* have been described, mainly adhesion factors such as von Willebrand and fibrinogen adhesion proteins. Furthermore, numerous putative adhesion proteins have been identified from the genome sequence of *S. lugdunensis* N920143 [28].

**Table 2**
Statistical analysis of patient groups with *Staphylococcus lugdunensis* infection according to various factors

| Patient category | Baseline characteristics | | | | | | Patient follow-up | | | | Final visit | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Diabetes | | Clumping Factor + | | Lugdulysin + | | Abscess formation | | Surgery performed | | Hospitalization length | | Cure rate | |
| | OR 95% CI | *pr** | OR 95% CI | *pr* | OR 95% CI | *pr* | OR 95% CI | *pr* | OR 95% CI | *pr* | OR 95% CI | *pr* | OR 95% CI | *pr* |
| Sepsis | 1.43 (0.56–3.70) | 0.77 | 1.3 (0.52–3.23) | 0.71 | 1.02 (0.42–2.48) | 0.52 | 1.35 (0.56–3.25) | 0.75 | 0.69 (0.28–1.68) | 0.20 | 1.01 (0.98–1.04) | 0.80 | 1.13 (0.37–3.53) | 0.59 |
| Deep infection | 1.81 (0.61–6.10) | 0.86 | 1.63 (0.59–4.93) | 0.82 | 2.53 (0.95–6.83) | 0.97 | 0.06 (0.01–0.19) | 0 | 1.38 (0.51–3.65) | 0.74 | 1.07 (1.02–1.14) | 1 | 1.66 (0.49–5.25) | 0.80 |
| Foreign body infection | 0.95 (0.36–2.44) | 0.46 | 0.45 (0.16–1.14) | 0.05 | 1.13 (0.46–2.78) | 0.60 | 0.14 (0.05–038) | 0 | 1.47 (0.59–3.72) | 0.80 | 1.04 (1.01–1.08) | 0.99 | 0.89 (0.29–2.83) | 0.42 |
| Abscess | 0.45 (0.16–1.18) | 0.06 | 0.90 (0.34–2.25) | 0.41 | 0.49 (0.20–1.18) | 0.06 | — | — | 1.17 (0.48–2.97) | 0.64 | 0.94 (0.88–0.97) | 0 | 1.24 (0.41–4.03) | 0.65 |
| Portal of entry | 3.22 (1.13–10.49) | 0.99 | 0.88 (0.35–2.29) | 0.40 | 2.16 (0.86–5.41) | 0.95 | 0.88 (0.34–2.14) | 0.38 | 1.68 (0.66–4.16) | 0.86 | 1 (0.98–1.04) | 0.63 | 2.60 (0.85–8.24) | 0.95 |
| Bacteraemia | 1.36 (0.34–4.89) | 0.71 | 2.6 (0.75–9.85) | 0.94 | 1.99 (0.53–8.64) | 0.85 | 0.03 (0–0.28) | 0 | 0.73 (0.20–2.71) | 0.31 | 1.02 (0.98–1.05) | 0.85 | 0.68 (0.17–3.28) | 0.31 |
| Immune deficiency | 0.47 (0.08–21.92) | 0.16 | 2.66 (0.95–9.83) | 0.94 | 3.39 (0.86–17.81) | 0.96 | 0.73 (0.18–2.61) | 0.31 | 0.47 (0.13–1.74) | 0.12 | 1.02 (0.99–1.06) | 0.91 | 1.25 (0.28–7.42) | 0.61 |
| Prosthetic and joint infections | 2.83 (1.07–7.52) | 0.98 | 0.50 (0.18–1.33) | 0.08 | 1.82 (0.70–4.85) | 0.89 | 0.36 (0.13–0.92) | 0.02 | 25.97 (6.21–162.40) | 1 | 1.01 (0.98–1.04) | 0.72 | 0.91 (0.30–3.02) | 0.44 |

* *pr* = probability OR >1.

In the present study, we identified a new protease that we named lugdulysin and that was strongly associated with bone, joint, or PJ infection. This protease is secreted in the form of a pro-protein and is encoded by a gene previously described in *S. lugdunensis* N920143, named *ShpI* due to the similarities with this known gene in *S. hyicus* (see Supplementary material, Fig. S1 and Fig. 3). Lugdulysin was produced by 50 of 81 strains studied whereas the coding sequence was identified by PCR in 100% of the strains, an observation that could be related to transcriptional or post-transcriptional gene silencing phenomena. This observation needs further investigations, as gene silencing in bacteria is quite unusual. Lugdulysin closely resembles hyicolysin (62.4% sequence homologies according to Clustal online comparison tool) and shares the same HEXXH catalytic domain, albeit at different positions [29]. Hyicolysin was, until now, the only member of the M30 family. This metallo-endopeptidase was described in *S. hyicus*, a CoNS found in pigs, cattle and chickens with exudative dermatitis and necrosis at the tips of the ears. The first descriptions of hyicolysin suggested a role in pathology, but this issue has not been examined since. Metalloproteases are part of a large family with 99 members according to the MEROPS database [30]. Involvement in human pathology relies on their capacity to remodel the extracellular matrix. Indeed, metalloproteases are crucial for tumour invasion and metastasis, particularly of breast cancer, and for bone remodelling [31,32]. Consequently, the presence of a secreted metalloprotease from *S. lugdunensis* has to be considered as a putative virulence factor. Its correlation with bone and joint infections also appears consistent with this type of protease, but further characterizations and animal model studies are needed to confirm such biological effects.

This study also confirms a high rate of positive results for the slide agglutination test (53 of 81 samples), a rare characteristic among CoNS that *S. lugdunensis* shares with *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus saprophyticus*. This feature could lead to their misidentification as *S. aureus* without MALDI-TOF/MS [33]. The high slide agglutination rate is because of the presence of a fibrinogen binding protein (or clumping factor), an adhesion protein that has been linked to the development of endocarditis in animal models of *S. aureus* infection [34]. On the contrary, there are no reports linking this adhesion factor to prosthetic joint infections. Rather, we found that positivity on slide agglutination test was strongly associated with bacteraemia but not with bone and joint infections. However, these results are preliminary as this test was designed for *S. aureus,* and the presence of a fibrinogen-binding protein was not linked to any specific clinical manifestation.

This study has several additional limitations. Although prospective, it was restricted to inpatients, which could overestimate the clinical significance of *S. lugdunensis*. We also included patients from a referral centre for prosthetic joint infections, which could also result in an overestimation of the true proportion of bone and joint infections among *S. lugdunensis* infections. We also used a quite permissive definition for skin and soft-tissue infections as one positive was enough to be considered as significant if in pure culture, but even with this limitation incidence of this kind of infections remained low compared with PJIs. Identification of a new protease, particularly a metalloprotease, is of particular interest for *Staphylococcus* pathogenesis and management, but our findings are not sufficient to prove that this protease is directly linked to any specific clinical manifestations of *S. lugdunensis* infection. Further biochemical and functional characterizations of this protease are needed.

## Acknowledgements

We thank all the patients that participated to the study, as well as doctors and nurses from Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

The authors would like to thank Enago (www.enago.com) for the English language review.

## Funding

This work was funded by a grant from the Collège des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT), by EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Faculté de Médecine, Strasbourg and supported both by the University Hospital of Strasbourg and Public funding of EA7290.

## Transparency declaration

The authors have stated that there are no conflicts of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.018.

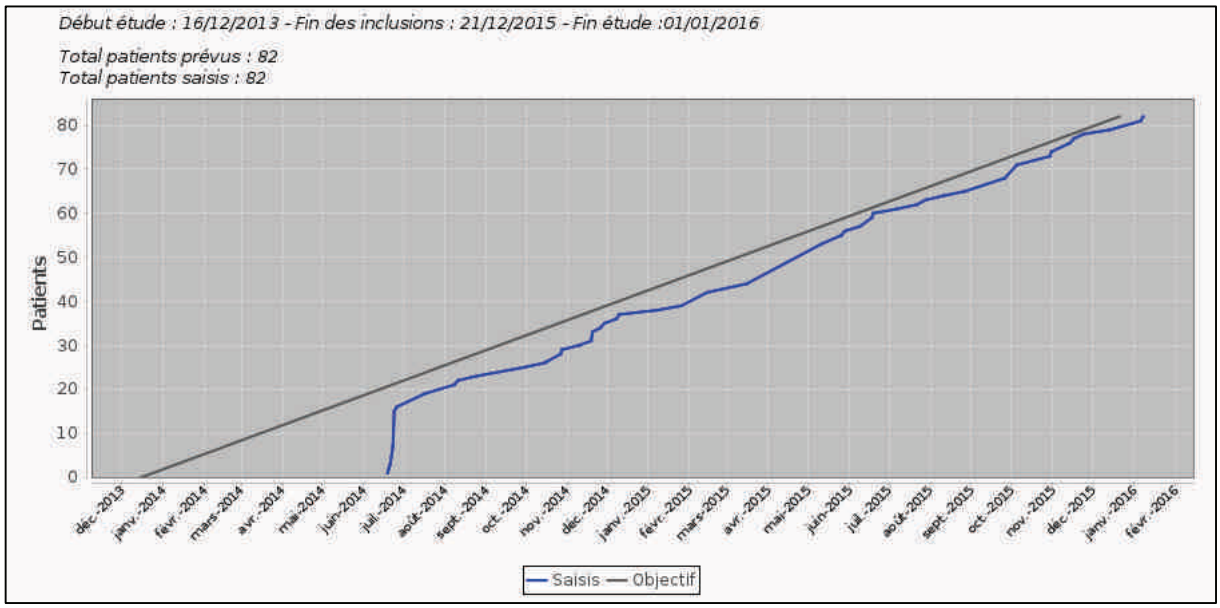
## References

[1] Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 2014;27:870–926.
[2] Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, et al. Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin Microbiol 2015;53:2030–6.
[3] Bieber L, Kahlmeter G. *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. Clin Microbiol Infect 2010;16:385–8.
[4] Douiri N, Lefebvre N, Riegel P, Baldeyrou M, Prevost G, Argemi X. *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections. Clin Microbiol Infect 2016;22:747–8.
[5] Tan TY, Ng SY, He J. Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin Microbiol 2008;46:2393–5.
[6] Liesenborghs L, Peetermans M, Claes J, Veloso TR, Vandenbriele C, Criel M, et al. Shear-resistant binding to Von Willebrand Factor allows *Staphylococcus lugdunensis* to adhere to the cardiac valves and initiate endocarditis. J Infect Dis 2016:jiv773.
[7] Frank KL, Patel R. Poly-*N*-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. Infect Immun 2007;75:4728–42.
[8] Vasconcelos NG, Pereira VC, Araújo Júnior JP, da Cunha M de LRS. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil: Detection of enterotoxins in *Staphylococcus* spp. J Appl Microbiol 2011;111:749–62.
[9] Delaunay F, Pegot A, Coquerel-Beghin D, Aktouf A, Auquit-Auckbur I. [*Staphylococcus lugdunensis* necrotizing fasciitis after abdominal dermolipectomy: Report of two cases and review of the literature.]. Ann Chir Plast Esthet 2014;59:136–9.
[10] Cassat JE, Hammer ND, Campbell JP, Benson MA, Perrien DS, Mrak LN, 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.
[11] Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2013;56:e1–25.
[12] Souvenir D, Anderson DE, Palpant S, Mroch H, Askin S, Anderson J, et al. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. J Clin Microbiol 1998;36:1923–6.
[13] Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis—critical-level of quantitative tip cultures. Arch Intern Med 1987;147:873–7.
[14] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Recommendations. 2014. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
[15] Vandecandelaere I, Depuydt P, Nelis HJ, Coenye T. Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms. Pathog Dis 2014;70:321–31.
[16] Swain MT, Tsai IJ, Assefa SA, Newbold C, Berriman M, Otto TD. A Post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. Nat Protoc 2012;7:1260–84.
[17] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol 2012;19:455–77.
[18] Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol 2011;29:24–6.
[19] Ntzoufras I. Bayesian Modeling Using WinBUGS. Chichester: Wiley; 2009.
[20] Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 2011;8:785–6.
[21] Wu A-B, Wang M-C, Tseng C-C, Lin W-H, Teng C-H, Huang A-H, et al. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired *Staphylococcus lugdunensis* infections in Southern Taiwan. J Clin Microbiol 2011;49:3015–8.
[22] Hughes JG, Vetter EA, Patel R, Schleck CD, Harmsen S, Turgeant LT, et al. Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. J Clin Microbiol 2001;39:4468–71.
[23] Berbari EF, Kanj SS, Kowalski TJ, Darouiche RO, Widmer AF, Schmitt SK, et al. 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of native vertebral osteomyelitis in adults. Clin Infect Dis 2015;61:e26–46.
[24] Shah NB, Osmon DR, Fadel H, Patel R, Kohner PC, Steckelberg JM, et al. Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. J Clin Microbiol 2010;48:1600–3.
[25] Eka A, Chen AF. Patient-related medical risk factors for periprosthetic joint infection of the hip and knee. Ann Transl Med 2015;3.
[26] Stegenga ME, van der Crabben SN, Blümer RME, Levi M, Meijers JCM, Serlie MJ, et al. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. Blood 2008;112:82–9.
[27] Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. Acta Orthop 2015;86:147–58.
[28] Heilbronner S, Holden MTG, van Tonder A, Geoghegan JA, Foster TJ, Parkhill J, et al. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence. FEMS Microbiol Lett 2011;322:60–7.
[29] Ayora S, Götz F. Genetic and biochemical properties of an extracellular neutral metalloprotease from *Staphylococcus* hyicus subsp. hyicus. Mol Gen Genet MGG 1994;242:421–30.
[30] Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman AMEROPS. the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res 2014;42:D503–9.
[31] Lynch CC. Matrix metalloproteinases as master regulators of the vicious cycle of bone metastasis. Bone 2011;48:44–53.
[32] Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2013;13:649–65.
[33] Garcia Lynne Shore, Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. 3rd ed., vol. 1. Washington, DC: ASM Press; 2010.
[34] Piroth L, Que Y-A, Widmer E, Panchaud A, Piu S, Entenza JM, et al. The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein a synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis. Infect Immun 2008;76:3824–31.

## Résultats supplémentaires non publiés de l'article 3

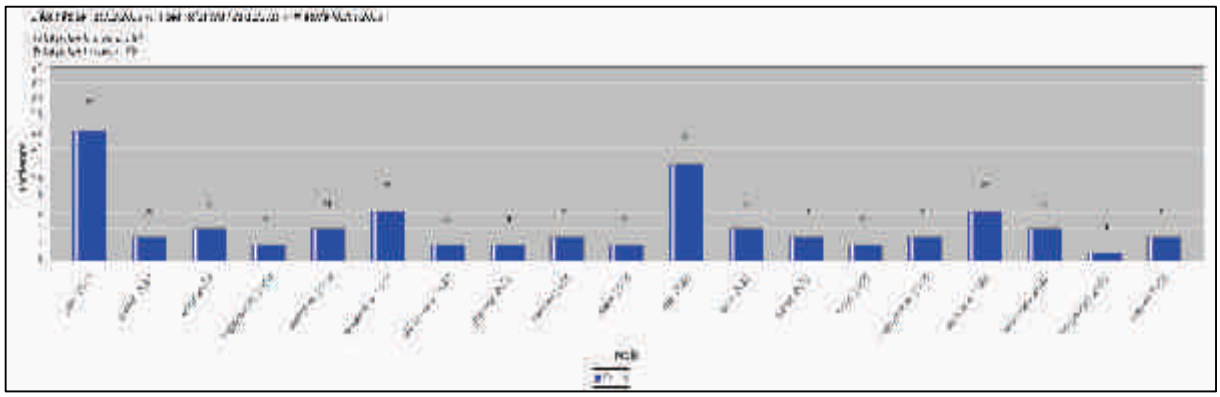
### 1. Inclusions dans l'étude VISLISI

Les inclusions se sont déroulées comme prévu sur une période de 3 ans selon un rythme régulier (Figure A et B).




**Remarque :** le logiciel de saisie informatique des patients a été mis en place 6 mois après le début de l'étude expliquant le début brutal de la courbe ici présentée mais en réalité les patients ont été inclus dès décembre 2013.

**Figure A.** Rythme d'inclusion des patients dans l'étude VISLISI.



**Remarque :** le logiciel de saisie informatique des patients a été mis en place 6 mois après le début de l'étude expliquant le début brutal de la courbe ici présentée mais en réalité les patients ont été inclus dès décembre 2013.

**Figure B.** Evolution mensuelle de l'inclusion des patients dans l'étude VISLISI.

### 2. Analyse des profils spectrométriques souches de *S. lugdunensis*

**- Analyses qualitative des dépôts :** les dépôts optimaux sont les dépôts de protéines extraites à l'acide formique/acéto nitrile sur des souches en culture depuis 12h. On observe alors 100% d'identifications et des spectres superposables à l'issue de 3 séquences de tirs sur la même cible. Le profil est donc stable dans ces conditions expérimentales. Les dépôts de bactéries fraiches permettent bien l'identification du genre et de l'espèce car les 5 à 10 pics principaux sont constants mais les autres pics, moins intenses sont très variables pour une même souche d'une culture à l'autre. Les dépôts de protéines extraites avec de l'acétone sont de très mauvaise qualité (très peu de pics).

**- Recherche de pics spectrométriques discriminants :** nous n'avons identifié aucun pic permettant de discriminer les souches en fonction des caractéristiques cliniques préalables.

**- Recherche de clusters et de relations hiérarchiques :** nous n'avons mis en évidence aucun cluster après analyse des PCA qui soit cohérent avec un groupe clinique particulier. Quatre clusters apparaissent, mais les changements de paramètres font facilement changer les souches de cluster et ce clustering n'est donc pas pertinent (Figure C).

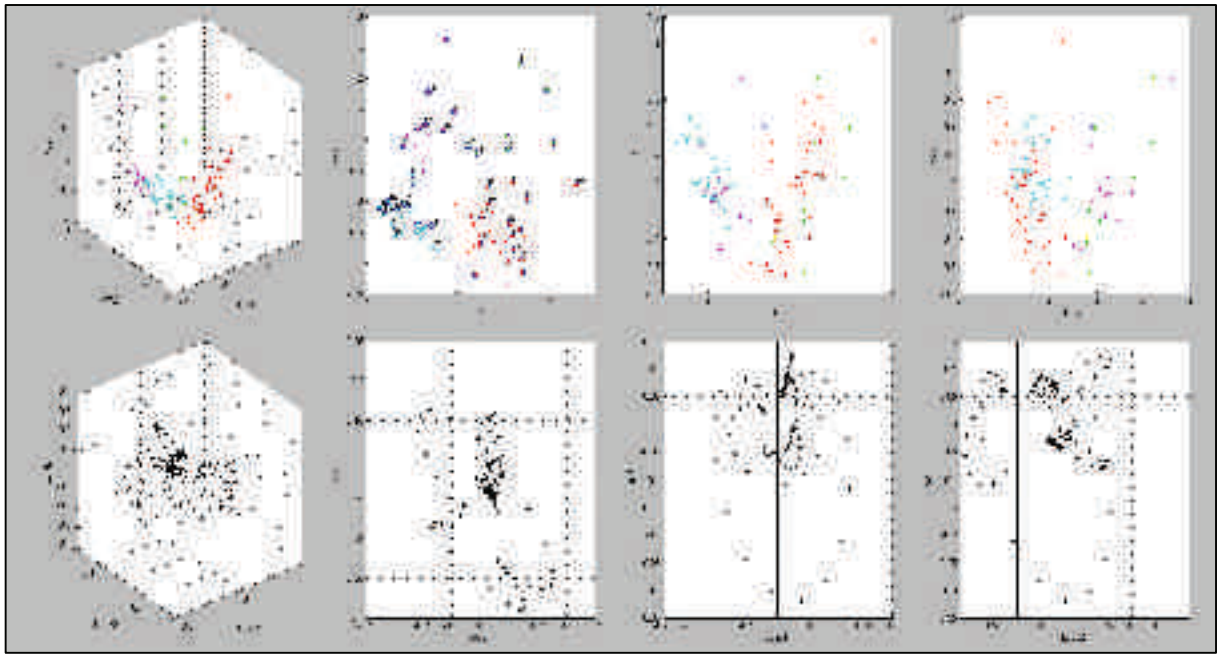


**Figure C.** Clustering des PCA des 82 souches bactériennes issues de l'étude VISLISI.

La recherche d'une relation hiérarchique par l'analyse des MSP montre la présence de 2 clusters principaux et 2 sous clusters mais il n'y a aucune corrélation avec l'origine clinique des souches (Figure D). Par ailleurs on ne retrouve pas non plus de corrélation avec les 4 clusters établis par l'analyse des PCA.

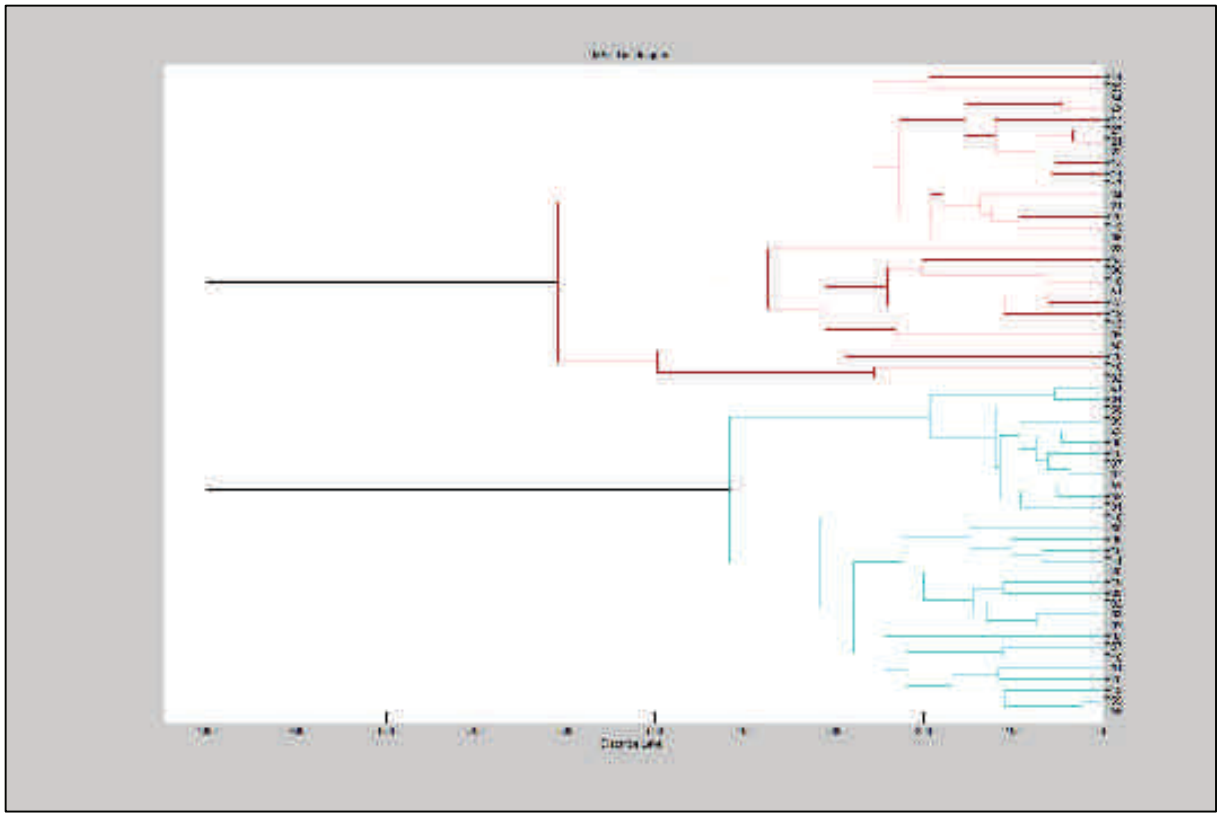


**Figure D.** Dendrogramme des MSP des 82 souches bactériennes issues de l'étude VISLISI.

### 3. Recherche d'une activité hémolytique et leucotoxique

**- Hémolyse synergique (CAMP test) :** 80 souches sur les 82 testées présentent une hémolyse synergique avec *S. intermedius* et aucune avec un streptocoque du groupe B (Figure E). Ces résultats sont concordants avec la littérature et correspondent à la production d'une δ-like hémolysine par *S. lugdunensis* et pas à une β-like -hémolysine. Par ailleurs, ces résultats ne permettent pas d'envisager de corrélation avec certains sous-groupes de malades puisque toutes les souches sont positives.

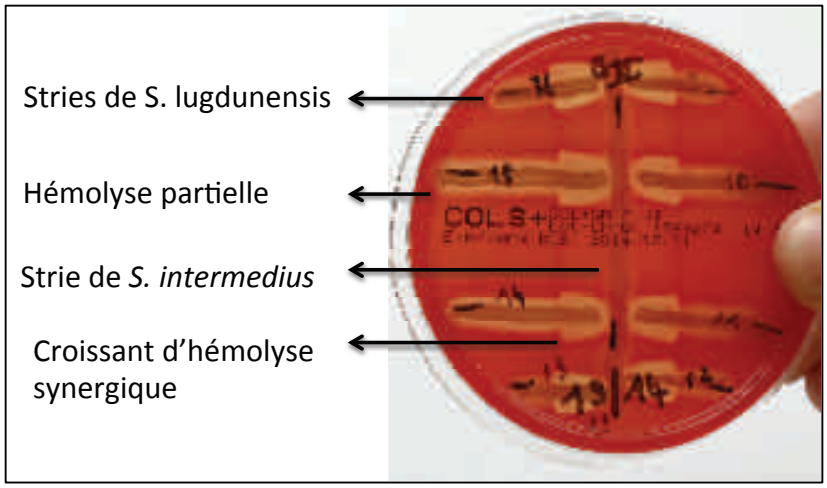



**Figure E.** Hémolyse synergique de 8 souches de *S. lugdunensis* avec *S. intermedius.*

**- Titres hémolytiques sur globules rouges humains et de lapins :** les tests de mise en place de la méthode ont montré que 49 souches sur 53 testées étaient hémolytiques sur globules rouges humains et après culture en milieu BHI avec un taux d'hémolyse allant de 1 à 201. L'hémolyse sur globules rouges de lapin et les cultures en milieu YCP n'ont pas donné de résultats interprétables et ont donc été rapidement abandonnés. Nous n'avons pas non plus mené ces tests jusqu'au bout dans la mesure où la positivité de la quasi-totalité des souches ne permettait pas de répondre à la question posée, c'est à dire de mettre en évidence un facteur permettant de distinguer un groupe clinique d'un autre, mais aussi parce que cette activité hémolytique a déjà été décrite dans la littérature et n'est pas inattendue.

### 4. Recherche de leucotoxicité

Les tests de leucotoxicité se sont révélés inexploitables, car positifs dans la quasi totalité des souches testées (16/20) avec des problèmes de reproductibilité des résultats.

### 5. Recherche de leucotoxines et superantigènes par Dot Blot et Western Blot

La recherche de ces toxines sur 20 souches s'est révélée d'abord positive en Dot Blot pour les entérotoxines D, G et I mais aussi pour LukS-PV et LukF-PV. Nous avons réalisé un Western Blot pour ces antigènes et les résultats sont négatifs.

### 6. Etude des propriétés biochimiques de la lugdulysine

**- Recherche du pH optimal (Figure F) :** l'augmentation du pH entraine une diminution continue de l'activité de la protéase en considérant le niveau d'hydrolyse de l'azocaséine. Le pH optimal est relativement acide, situé à 5 .5-6 (différence non significative). L'activité devient nulle au delà de 9.

**- Recherche de la température d'activité optimale (Figure F) :** les mesures ont été effectuées à pH 6 compte tenu des résultats précédents. La protéase reste active de 27 à

62°C, mais la température optimale se situe entre 52 et 57°C (différence non significative).

**- Détermination de la concentration optimale en $Zn^{2+}$ et effets des inhibiteurs (Figure F) :** l'activité de la lugdulysine ne change pas dans un intervalle de concentration de 0 à $10^{-4}$ M de $Zn^{2+}$ et l'activité décroit de manière significative à partir de $10^{-3}$ M. L'utilisation de phénanthroline qui est un chélateur du zinc entraine une diminution de l'activité de la protéase à partir de 10 µM sans pour autant l'inhiber totalement jusqu'à 100 µM. L'ajout secondaire de $Zn^{2+}$ à 400 µM dans la solution inhibée par 100 µM de phénanthroline restaure 75% de l'activité de la protéase confirmant sa dépendance au zinc. Enfin l'EDTA inhibe l'activité de la lugdulysine à partir de 0.1 µM et l'inhibe totalement à partir de 10 mM. L'effet inhibiteur de l'EDTA est beaucoup plus marqué que celui de la phénanthroline.

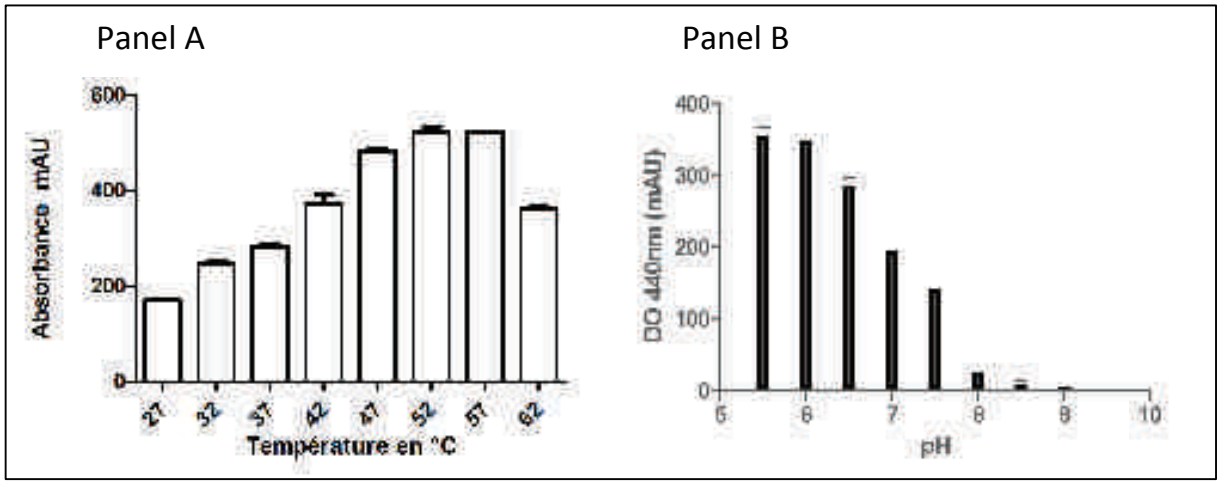



**Figure F.** Déterminants physicochimiques de l'activité de la lugdulysine. Etude de la température (à 40 nM et pH=6, anel A) et du pH (panel B).

### 7. Analyses complémentaires du gène codant pour la lugdulysine

Nous nous sommes basés sur la séquence nucléotidique de VISLISI_22 obtenue à partir des travaux de séquençage décrits dans l'Article 6.

**- Recherche d'un promoteur avec BPROM:** plusieurs séquences promotrices potentielles ont été identifiées et la région avec la plus forte probabilité est représentée dans la Figure G.

**- Recherche d'un site d'attachement du ribosome à l'aide de Reg RNA 2.0 :** nous avons identifié une séquence de Shine Dalgarno tronquée de 5 nucléotides et représentée dans la Figure G.

**- Recherche d'un terminateur à l'aide de Reg RNA 2.0 :** nous avons identifié un terminateur *rho* indépendant potentiel représenté dans les Figures G et H.

**- Recherche d'un peptide signal à l'aide de SignalP 4.0 :** nous avons identifié un peptide signal potentiel de 27 acides aminés (clivage entre l'acide aminé 27 et 28, 2 alanine) représenté dans la Figure G et le score de probabilité est représenté dans la Figure I.

**Figure G.** Séquence nucléotidique et peptidique du gène codant pour la lugdulysine et représentation des différents éléments de régulation de la transcription.

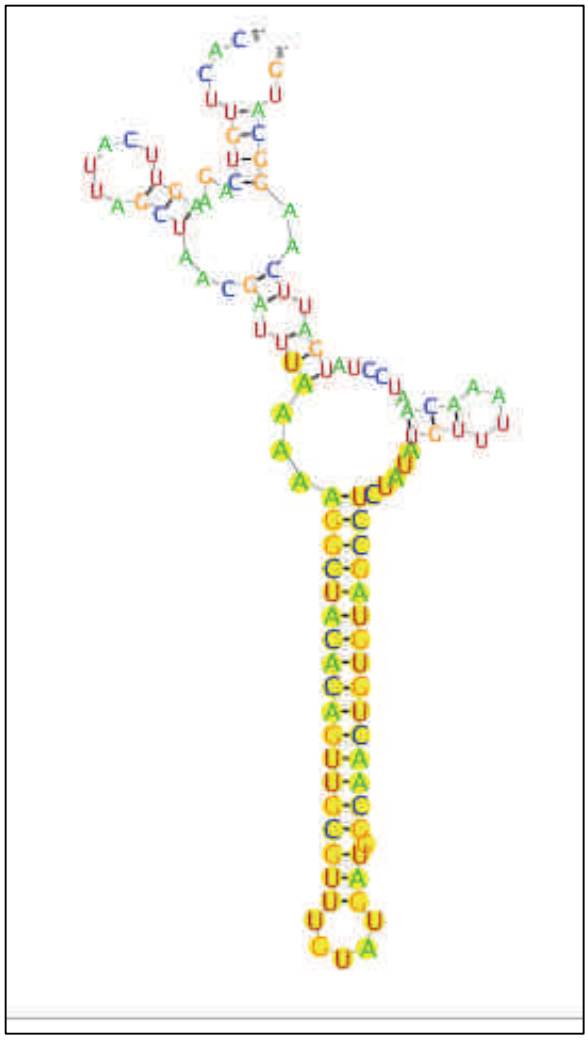
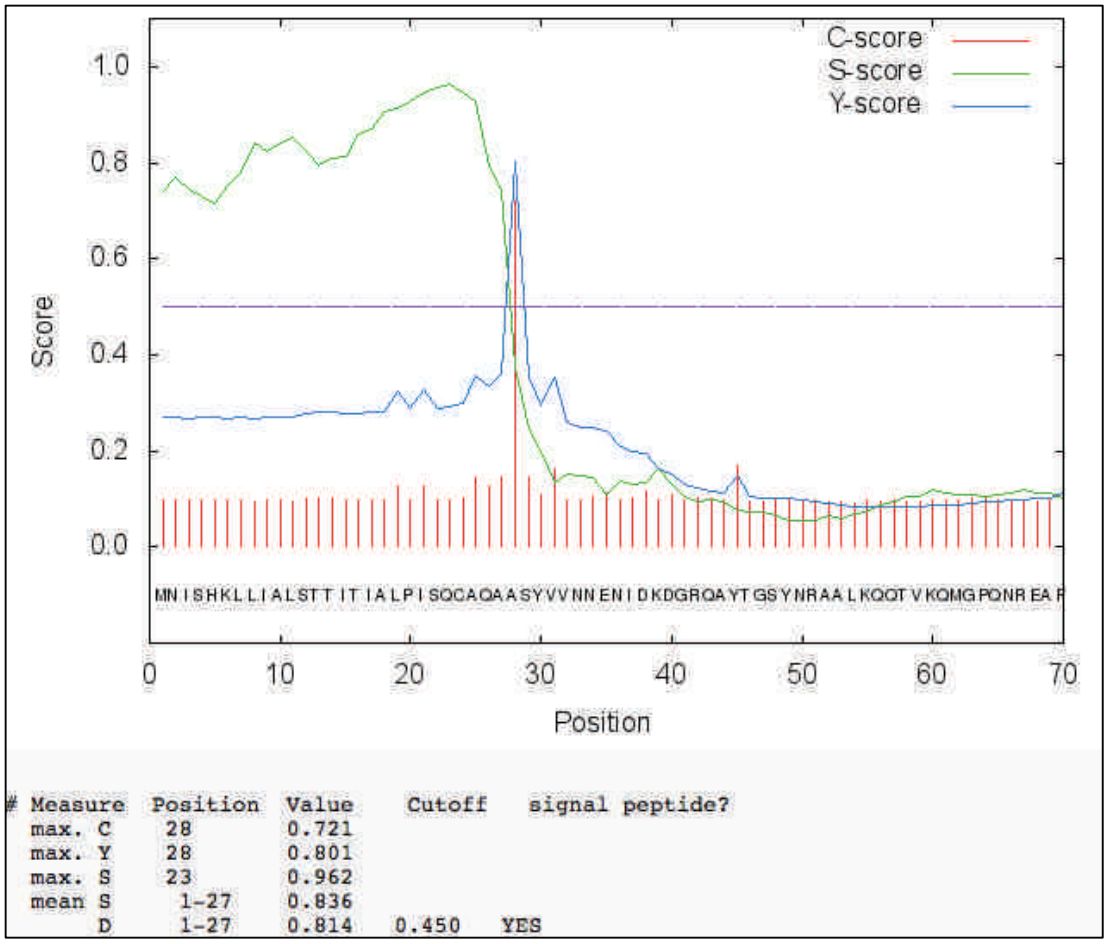


**Figure H.** Terminateur Rho indépendant du gène codant pour la lugdulysine (Reg RNA 2.0).




| # Measure | Position | Value | Cutoff | signal peptide? |
|---|---|---|---|---|
| max. C | 28 | 0.721 | | |
| max. Y | 28 | 0.801 | | |
| max. S | 23 | 0.962 | | |
| mean S | 1-27 | 0.836 | | |
| D | 1-27 | 0.814 | 0.450 | YES |

**Figure I.** Probabilité de clivage au sein de la séquence d'acides aminés de la lugdulysine pour la recherche d'un peptide signal (SignalP 4.0).

**- Recherche de variant du gène codant pour la lugdulysine (Tableau A) :** nous avons comparé les séquences des 7 gènes disponibles ainsi que des régions nucléotidiques d'amont et d'aval : VISLISI_21, VISLISI_22, VISLISI_25, VISLISI_27, VISLISI_33, VISLISI_37 et une souche de contamination C_33. Nous nous sommes basés sur les séquences disponibles à partir des travaux de séquençage décrits dans l'Article 6. Nous n'avons retrouvé aucun polymorphisme nucléotidique au sein des 7 séquences disponibles concernant la région promotrice, le site de liaison au ribosome et le terminateur. Concernant la séquence du gène proprement dite on observe quelques polymorphismes. Résumés dans le Tableau A. On remarque la présence de polymorphismes le plus souvent silencieux sauf pour les souches VISLISI_27 et VISLISI_33 avec le remplacement d'une glycine par une sérine au niveau de l'acide aminé 299. Par ailleurs ces deux souches font partie des souches non protéolytiques. Cette substitution n'est pas située au niveau du site actif de la protéase, mais pourrait entrainer des modifications conformationnelles expliquant la perte d'activité. Nous avons, dans un second temps, décidé de séquencer un plus grand nombre de gènes codant pour la lugdulysine et provenant de l'étude VISLISI. Ces travaux sont en cours mais nous avons déjà séquencé 23 gènes issus de souches ayant une activité protéolytique et 28 de souches n'ayant pas

d'activité protéolytique. Les résultats des polymorphismes nucléotidiques et leur traduction en termes de séquence d'acides aminés sont résumés dans le Tableau B. On observe que 16 souches sur 28 n'ayant pas d'activité protéolytique présentent la mutation G299S alors qu'aucune souche protéolytique ne la présente, ce qui renforce les résultats obtenus précédemment.

**Tableau A.** Polymorphismes nucléotidiques retrouvés dans les 7 gènes codant pour la lugdulysine par rapport au gène de la référence N920143 (référence NCBI : NC_017353.1).

| Souches | Position | Polymorphisme | Changement d'acide aminé | Protéase |
|---|---|---|---|---|
| **VISLISI_21** | 40-42 | ACC > ACG | Thréonine > Thréonine | + |
| | 148-150 | AAC > AAT | Asparagine > Asparagine | |
| | 283-285 | GGC > GGT | Glycine > Glycine | |
| | 1144-1146 | GGA > GGG | Glycine > Glycine | |
| **VISLISI_22** | 40-42 | ACC > ACG | Thréonine > Thréonine | + |
| | 517-519 | AAT > AAC | Asparagine > Asparagine | |
| **VISLISI_25** | 40-42 | ACC > ACG | Thréonine > Thréonine | + |
| | 127-129 | CAA > AAA | Glutamine > Lysine | |
| | 475-477 | CTT > CTG | Leucine > Leucine | |
| | 517-519 | AAT > AAC | Asparagine > Asparagine | |
| **VISLISI_27** | 894-896 | GGT > AGT | Glycine > Serine | - |
| **VISLISI_33** | 894-896 | GGT > AGT | Glycine > Serine | - |
| **VISLISI_37** | | Aucun | | + |
| **C_37** | | Aucun | | + |

Mutation silencieuse
Mutation sens

**Tableau B.** Séquençage du gène de la lugdulysine chez 51 souches issues de l'étude VISLISI et corrélation entre l'activité protéolytique et les changements d'acides aminés par rapport par rapport au gène de la référence N920143 (référence NCBI : NC_017353.1).

| Souches | Modifications de la séquence en acides aminés | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | G299S | Q43K | S412F | STOP | Aucune |
| **Protéase NEG n=28** | 16 (57%) | 1 (4%) | 4 (14%) | 2 (7%) | 5 (18%) |
| **Protéase POS n=23** | 0 | 4 (17%) | 0 | 0 | 19 (83%) |

- **Modélisation 3D de la lugdulysine à partir de la séquence VISLISI_22 :** nous avons utilisé le logiciel accessible en ligne I-TASSER (Figure J) permettant de générer un fichier qui est ensuite lu avec Weblab ViewerPro. La structure tridimensionnelle est partielle et totalement probabiliste, basée sur la structure de séquences homologues existantes. On observe dans le cadre de souches protéolytiques la présence d'un site catalytique bien délimité, de forme triangulaire et positionner de manière centrale avec au milieu la coordination d'un atome de $Zn^{2+}$. Ce dernier se lie théoriquement aux histidines 241 et 245 ainsi qu'à à l'acide glutamique 268 avec une molécule d'eau qui constitue le substrat de la réaction d'hydrolyse. Deux autres résidus, la tyrosine 315 et l'acide glutamique 242 sont théoriquement nécessaires à la stabilisation de la réaction d'hydrolyse. C'est la partie A de la figure J. Dans la partie B on observe la même protéase présentant la mutation G299S. On remarque que cette mutation est située sur les berges de la poche catalytique. Elle semble entrainer l'apparition et la disparition de feuillets β et d'hélices α conduisant à un encombrement par le haut de cette poche qui pourrait alors devenir inaccessible à son substrat ce qui expliquerait la perte d'activité que nous avons pu observer sur l'azocaséine. Ces conclusions restent préliminaires et il est nécessaire de déterminer la structure réelle de la protéase par méthodes cristallographiques pour confirmer ces hypothèses.

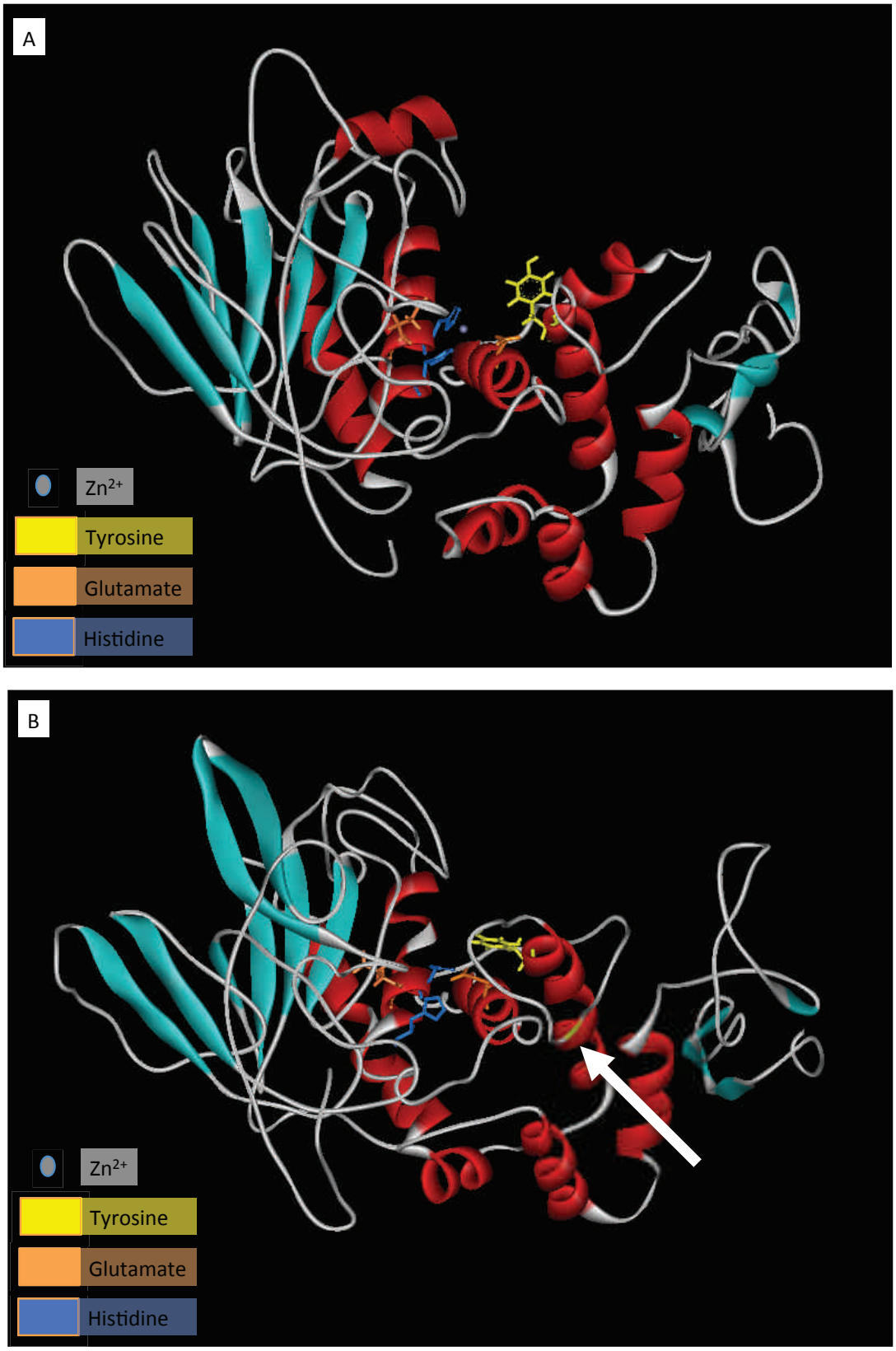



**Figure J :** Modélisation 3D de la lugdulisine et du site catalytique, souche non mutée (A), souche mutée G299S (B) montrant la fermeture possible du site catalytique.

**- Relations phylogénétiques de la lugdulysine :** nous avons établi un arbre phylogénétique en retenant les 21 premières espèces bactériennes proposées par BLAST (Figure K). On remarque une identité de séquence peptidique parfaite avec une « hypothetical protein [*Staphylococcus lugdunensis*] » et qui est donc située sur le même nœud de l'arbre. Comme attendu la métalloprotéase de *S. hyicus*, ShpI, est la deuxième protéine la plus proche. On constate que cette métalloprotéase présente des homologies avec d'autres métalloprotéases déduites de séquences d'autres staphylocoques et de *Bacillus*.

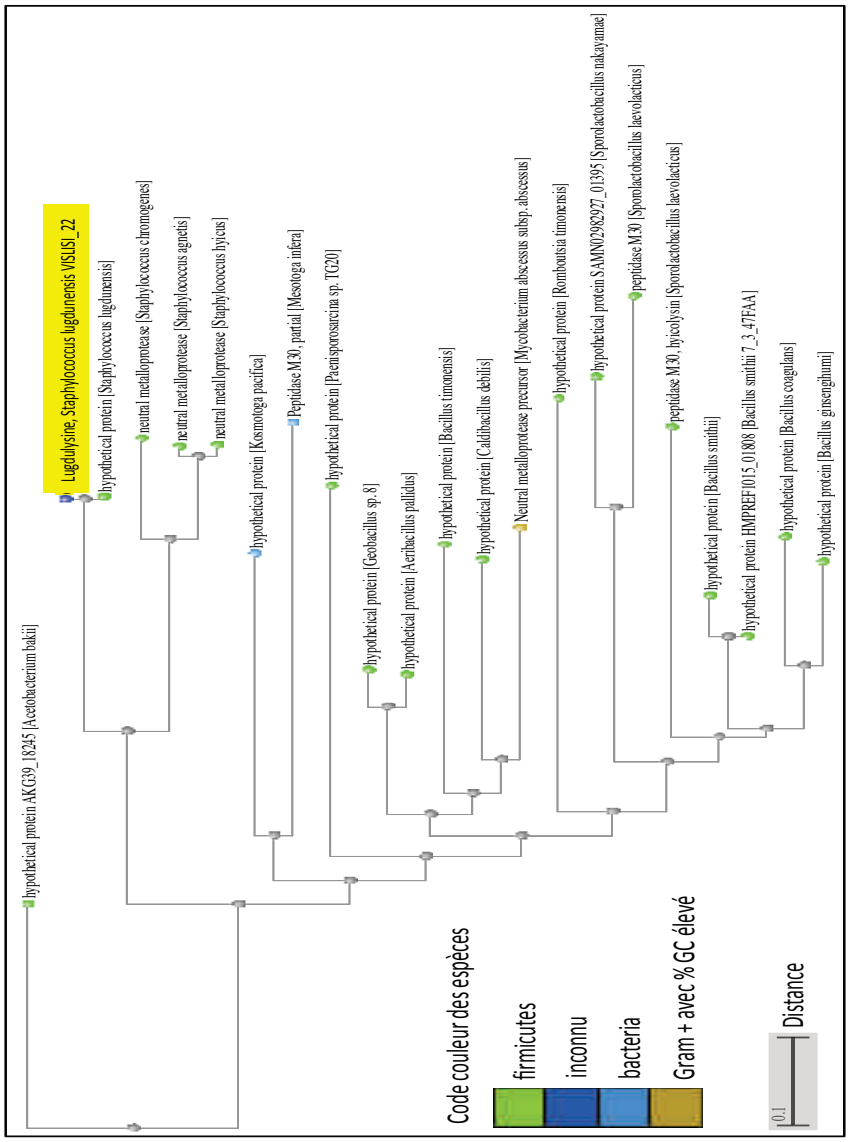



**Figure K.** Relations phylogénétiques entre la lugdulysine et les 21 premières espèces bactériennes les plus proches sur la base de l'algorithme BLAST.

## D. Article 4 : Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus lugdunensis*, une analyse complémentaire de l'étude clinique VISLISI

**Auteurs** : Xavier Argemi, Gilles Prévost, Philippe Riegel, Nicolas Meyer, Christian Provot, Stéphanie Badel-Berchoux, François Jehl, Elodie Olivares, Yves Hansmann.

**Statut de l'article : accepté, en attente des épreuves**

**Revue : Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**

**Impact Factor 2014 : 2.5**

**Rang SIGAPS : C**

**Résumé de l'article**

**Objectifs :** nous avons voulu analyser en détail l'histoire clinique des patients issus de l'étude clinique VISLISI et présentant une infection ostéo-articulaire et déterminer leur évolution à 1 an de l'épisode infectieux. Secondairement, nous avons déterminé la production de biofilm à l'aide d'un nouveau dispositif, le Biofilm Ring Test (BRT, BioFilm Control, Saint-Beauzire, France). Ce dernier évalue de manière cinétique la production bactérienne de biofilm en mesurant la mobilité de microbilles magnétiques disposées dans des puits de culture bactérienne.

**Résultats :** cette seconde analyse de 28 patients présentant une infection ostéo-articulaire montre le terrain particulier des malades qui présentent dans presque 50% des cas un antécédent de diabète. La majorité des infections de matériel survient sur prothèse totale de genou (n=9) et la majorité des infections ostéo-articulaires sans matériel sont en fait des maux perforants plantaires de grade 3 (n=9). La quasi-totalité des patients (n=27) a bénéficié d'un traitement chirurgical associé à une antibiothérapie et concernant les infections de prothèse articulaire tous les changements de prothèse (n=9) ont été effectuées en 1 seul temps chirurgical (retrait e la prothèse, nettoyage, repose d'une prothèse) suivi d'une antibiothérapie prolongée de 6 semaines avec un taux de succès de 100%. Cette donnée confirme les données obtenues en France où le changement de prothèse infectée est désormais recommandé en un seul temps chirurgical alors que les recommandations et les pratiques américaines continuent de favoriser une approche chirurgicale en 2 temps (retrait de la prothèse articulaire et antibiothérapie suivi dans un deuxième temps de la remise en place d'une prothèse articulaire). Cette deuxième approche comportant de nombreux inconvénients, car cela allonge la durée totale d'hospitalisation, multiplie les interventions chirurgicales, retarde le rétablissement fonctionnel, alors que le taux de succès n'est pas supérieur. Enfin notre étude a montré que la totalité des souches étaient productrices de biofilm avec une rapidité surprenante puisque sur la base d'un test d'immobilisation de billes magnétisables (BioFilm Ring Test®), la quasi-totalité des souches débute cette production dans les 2 premières de culture et elle semble maximale à 6H de culture. Ces résultats illustrent l'importance des conditions de prise en charge chirurgicale des infections ostéo-articulaires en particulier sur prothèse pour lesquelles le retrait d'un matériel infecté semble difficilement évitable, mais au cours desquelles le débridement

des tissus infectés est fondamental et l'administration d'antibiotiques doit être per opératoire et extrêmement rapide après les prélèvements à visée bactériologique.

**Conclusion :** cette analyse du-sous groupe des patients souffrant d'infections ostéo-articulaires à *S. lugdunensis* permet de définir 2 populations à risque : les patients diabétiques avec un mal perforant plantaire et les patients porteurs d'une prothèse totale de genou. Nous montrons aussi que le changement de prothèse articulaire en un seul temps chirurgical chez 9 patients n'a pas été suivi d'échec. Enfin, *S. lugdunensis* est une bactérie capable de produire un biofilm avec une fréquence et une rapidité qu'il faut prendre en compte lors de la prise en charge des patients ayant une infection sur matériel.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xxx (2017) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

# Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections

Xavier Argemi [a,b,*], Gilles Prévost [b], Philippe Riegel [b], Christian Provot [c], Stéphanie Badel-Berchoux [c], François Jehl [b], Elodie Olivares [b], Yves Hansmann [a,b]

[a] Hôpitaux Universitaires, Maladies Infectieuses et Tropicales, Strasbourg, France
[b] Université de Strasbourg, CHRU de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), VBP EA7290, Institut de Bactériologie, 3 Rue Koeberlé, Strasbourg, France
[c] BioFilm Control SAS, Saint-Beauzire, France

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 8 March 2017
Received in revised form 5 May 2017
Accepted 9 May 2017
Available online xxxx

*Keywords:*
*Staphylococcus lugdunensis*
Biofilm
Prosthetic joint infections
Diabetes

ABSTRACT

*Objective:* To describe the clinical presentation and 1-year follow-up of patients with bone and joint infections (BJIs) caused by *Staphylococcus lugdunensis* and evaluate its biofilm-forming capacities.

*Patients and methods:* Overall, 28 patients with BJIs from VISLISI clinical trials were included. We evaluated 1-year clinical follow-up and analyzed biofilm production kinetics of the 28 strains using the BioFilm Ring Test®.

*Results:* Of all patients, 12 had osteoarticular infections without material and 16 had prosthetic joint infections, of which 9 underwent a 1-stage revision procedure. At the 1-year follow-up, all patients were cured but needed a surgical intervention. Diabetes affected 46.4% of all patients. Of all, 20 strains (71.4%) started biofilm formation within 2 h, but all strains started the formation after 4 h experiment, and 25 strains (89.3%) reached a maximum after 6 h.

*Conclusions:* This study describes the clinical and surgical management of BJIs caused by *S. lugdunensis* and shows that 1-stage prosthesis exchange procedures may be efficient. Further, it shows that biofilm production by this strain was not marginal and directly impacted clinical and surgical management.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase negative staphylococcus species (CNS) that may cause various infections with unusual severity (Babu and Oropello, 2011). This commensal skin bacteria was originally described mainly in the skin and soft tissue infections, but recent retrospective studies have emphasized its role in bone and joint infections (BJIs), particularly prosthetic and joint infections (PJIs) (Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016; Seng et al., 2017; Shah et al., 2010). These clinical observations are supported by some microbiological properties of this atypical CNS. Indeed, it produces a bound coagulase via a clumping factor, but this is only one of multiple adhesion factors described in this species. It exhibits a high binding percentage to purified collagen I and IV and immunoglobulin G, but it also binds fibrinogen, laminin, fibronectin, and plasminogen (Paulsson et al., 1993). Two adhesins, the fibrinogen binding protein (locus *Fbl*) and the von Willebrand factor binding protein (locus *vwbl*), have been reported (Mitchell, 2004; Nilsson et al., 2004), but additional surface components that recognize adhesive matrix molecules may exist, as suggested by genome sequence analysis of *S. lugdunensis* strains, N920143 and HKU09-01, which indicates several putative proteins covalently anchored to the cell wall surface (Heilbronner et al., 2011). Besides its ability to bind extracellular matrix components, *S. lugdunensis* produces a biofilm that is mainly proteinaceous and contains iron-regulated surface determinants (Hussain et al., 2015; Zapotoczna et al., 2013). We recently conducted a prospective clinical trial that confirmed the pathogenicity of *S. lugdunensis* and facilitated the identification of a novel metalloprotease named lugdulysin, which is statistically linked to deep BJIs (Argemi et al., 2016). It represented approximately 35% of all infections, and this rate was in accordance with a previous published study (Douiri et al., 2016). In this secondary analysis of VISLISI clinical trial, we focused on the clinical characteristics, treatment, and evaluated the outcome at the 1-year follow-up of all patients who presented with BJIs. We performed a biofilm production analysis at the microbiological level using a recently available technology called the BioFilm Ring Test® (BRT; BioFilm Control, Saint-Beauzire, France), based on superparamagnetic bead mobility in bacterial suspensions (Chavant et al., 2007; Olivares et al., 2016). This device was used previously to evaluate biofilm production by *Staphylococcus aureus* and other CNS, and some *S. aureus* strains were shown to produce biofilm within 4–5 h, a result of high importance from a clinical perspective as biofilm-associated infection has emerged as a therapeutic challenge (Chavant et al., 2007; Di Domenico et al., 2016; Tasse et al., 2016). Biofilm-embedded bacteria represent a physical and biochemical barrier to antibiotic diffusion, and mechanical debridement of material-

* Corresponding author. Tel.: +33 388550845.
E-mail address: xavier.argemi@chru-strasbourg.fr (X. Argemi).

http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002
0732-8893/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: Argemi X, et al. Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. Diagn Microbiol Infect Dis (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002

associated infections sometimes remains as the univocal solution to eliminate bacteria and biofilm (Flemming et al., 2016; Lebeaux et al., 2014).

## 2. Methods

### 2.1. Study population

VISLISI clinical trial was previously reported (NCT: 02026895) (Argemi et al., 2016). Overall, 81 patients with *S. lugdunensis* infection in the Strasbourg University Hospital from November 2013 to March 2016 were included in the study. All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the National Research Committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. The study was approved by the French Ethical Committee under registration number IDCRB-2013-A01057-38 and promoted by the University Hospital of Strasbourg (PRI 2013–HUS No. 5616). Informed and signed consent was obtained from all individual participants included in the study. Of the 81 patients, 28 presenting with BJIs were selected for subsequent analyses. BJIs and PJIs were defined as having 2 or more positive intraoperative cultures or a combination of positive preoperative aspiration and intraoperative cultures according to PJI guidelines of the Infectious Diseases Society of America (IDSA) (Osmon et al., 2013). For patients with only 1 bone sample positive for *S. lugdunensis*, infection was confirmed by 3 additional criteria: clinical signs of infection, a positive pure culture, and samples that did not come from a known niche (groin area, lower extremities, or axillae) (Bieber and Kahlmeter, 2010; Ho et al., 2015; van der Mee-Marquet et al., 2003). Postoperative infections occurring within 3months after prosthesis implantation were classified as "early," whereas those occurring within 3months to 1year after implantation were classified as "delayed," according to IDSA classification (Osmon et al., 2013).

### 2.2. Data collection and follow-up

All clinical and paraclinical parameters were recorded at admission and after 1month follow-up. The final outcome was evaluated 1year after admission. The immunological status of the patient was evaluated 1month after admission, including the white blood cell count, gammaglobulin dosage, phenotyping of lymphocytes, and complement components dosage.

### 2.3. Bacterial identification and antibiotics susceptibility testing

All strains were identified using MALDI-TOF MS, as previously described (Argemi et al., 2015). Regarding bone, joints, and material samples, bacteriologists systematically inoculated pediatric blood culture bottles (BACTEC PED PLUS, BD Diagnostics, France) for the analysis of joint fluid, tissue, and sonicated prosthetic materials prior to culture media inoculation. Antimicrobial susceptibility testing was performed using the VITEK 2 microbial identification system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or agar diffusion tests according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for the 2013–2016 study period (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2014). All strains were named after their identification number in the VISLISI clinical trial that included 81 patients. Therefore, strains were numbered according to the patient inclusion number in the trial. For example, strain 2 referred to the second patient included in the VISLISI trial. Lugdulysin production and slide coagulation tests were described previously (Argemi et al., 2016).

### 2.4. Biofilm Ring Test (BRT)

The BRT kit consisted of 96-well microplates, toner (solution containing magnetic microbeads), contrast liquid (inert opaque oil used for plate reading step), and a pack including a block test (magnets holder), a dedicated plate reader, and BFC Elements® software (v 3.0) to acquire and analyze images. All strains analyzed were pre-cultured for 24 h on brain heart infusion (BHI) agar plates. Selected colonies were suspended in sterile BHI medium, and the initial bacterial suspension (IBS) was prepared to a final concentration of $4.10^6$ CFU/mL in BHI containing the toner suspension (10 μL/mL). After homogenization by vortexing, bacterial mixtures were loaded with 200 μL of IBS per well. One plate was prepared for each incubation time tested (0, 2, 4, and 6 h). Microplates were incubated at 37 °C. Controls of spontaneous adhesion kinetics of bacteria and bead migration (medium without bacterial strains) were also prepared in each plate and analyzed. For plate reading, 120 μL of contrast liquid was used to cover the medium in the wells that were scanned with the plate reader after 1 min magnetization with the block test. The block test was made of 96 mini magnets that were centered under the bottom of each well. During magnet contact, free beads were attracted toward the center of wells to form a brown spot, whereas the beads embedded in biofilm were blocked and remained non-detectable. The adhesion ability of each strain was expressed as BioFilm Index (BFI) and calculated by BFC Elements® software (v 3.0), as previously described (Olivares et al., 2016). A high BFI value (BFI > 17) signified a high bead mobility under magnet action that corresponded to the absence of biofilm formation (similar to the control wells), whereas a zero value (BFI = 0) shows full bead immobilization because of the sessile cells. Results were displayed at each time point as the results of 4 measurements, corresponding to 4 different wells (quadruplicates), with standard deviation.

### 2.5. Statistical analyses of groups repartition

Patient characteristics at admission and during follow-up were compared using the Fisher exact test for qualitative data and the Wilcoxon rank-sum tests for quantitative data. *P* values were 2-sided and $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using STATA software, version 11.0 (Stata Corp., College Station, TX).

## 3. Results

### 3.1. Study population

Of the 28 patients included in the analysis, 12 had material-free infections and 16 had PJIs. Age, sex, background, and infection characteristics are reported in Tables 1 and 2. Regarding material-free infections, metatarsophalangeal localizations were the most frequent ($n = 7$, 58.3%) followed by concomitant diabetes ($n = 8$, 66.7%). Only 1 patient (8.3%) had fever but 3 (25%) had sepsis. Two (16.6%) had postoperative infections, both of which occurred after a sternotomy caused by cardiac surgery after 1 and 4weeks, respectively. Regarding PJIs, most patients had total knee arthroplasty infections ($n = 9$, 56.3%) and 5 (31.3%) had concomitant diabetes. Only 2 patients (12.5%) presented with fever, but 5 (31.3%) fulfilled the sepsis criteria. Eight (50%) infections occurred within 1year after surgery, but only 2 (12.5%) were diagnosed between 3months and 1year after prosthesis implantation and were considered delayed. All other postoperative infections ($n = 6$, 37.5%) were classified as early. Four patients (25%) had prosthesis infections within 1month after implantation.

### 3.2. Patient treatment and outcome

Nearly all patients required surgical intervention and antibiotics treatments ($n = 27$, 96.4%, Table 2). Regarding material-free infections, transmetatarsal amputation was the most frequent intervention performed ($n = 4$, 33.3%) and fluoroquinolones and amoxicillin/clavulanate were the frequently prescribed medications ($n = 5$, 41% and $n = 4$, 33.3%, respectively) for a short term (≤2 weeks in 6 patients, 50%). Of the 12 patients, 11 (91.7%) were cured and the remaining patient underwent a

Please cite this article as: Argemi X, et al. Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. Diagn Microbiol Infect Dis (2017). http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002

Table 1
Clinical and biological characteristics of patients with osteoarticular and prosthetic joint infections caused by *S. lugdunensis*.

| | Osteoarticular infection n = 12 | Prosthetic joint infection n = 16 | *P* value |
|---|---|---|---|
| Clinical characteristics at admission | | | |
| Age, year, mean ± SD[1] | 59.9 ± 11.3 | 66.9 ± 13.3 | 0.05 |
| Male | 9 (50%) | 9 (37.5%) | 0.70 |
| Female | 9 (50%) | 19 (62.5%) | |
| Charlson, mean ± SD | 3.7 ± 2.4 | 3.6 ± 1.8 | |
| Cancer | 1 (8.3%) | 4 (25%) | 0.35 |
| Diabetes | 8 (66.7%) | 5 (31.3%) | 0.12 |
| Hypertension | 9 (50%) | 13 (81.3%) | 0.11 |
| Dyslipidemia | 8 (33.3%) | 7 (43.8%) | 0.70 |
| BMI, mean ± SD | 27.5 ± 6.4 | 33.6 ± 6.3 | 0.04 |
| T°C[2], mean ± SD | 37.1 ± 0.2 | 37.4 ± 0.6 | 0.46 |
| T°C ≥ 38 °C at admission | 1 (8.3%) | 2 (12.5%) | 1.00 |
| Sepsis | 3 (25%) | 5 (31.3%) | 1.00 |
| Abscess | 3 (25%) | 2 (12.5%) | 0.62 |
| Infection localisation | | | |
| Metatarsophalangeal | 7 (58.3%) | 3 (18.8%) | 0.06 |
| Metacarpophalangeal | 2 (16.7%) | 0 | 0.17 |
| Rachis | 1 (8.3%) | 3 (18.8%) | 0.61 |
| Sternum | 2 (16.7%) | 0 | 0.17 |
| Knee | 0 | 9 (56.3%) | 0.00 |
| Hip | 0 | 1 (6.3%) | 1.00 |
| Biological parameters at admission | | | |
| Hemoglobin, g/dL, mean (SD) | 12.1 (1.9) | 11.4 (2) | 0.29 |
| Platelets, $10^9$/L, mean (SD) | 298 (120) | 348 (102) | 0.30 |
| Leukocytes, $10^9$/L, mean (SD) | 7.8 (3.4) | 7.2 (1.7) | 0.60 |
| Neutrophils, $10^9$/L, mean (SD) | 4.5 (3) | 4.5 (1.4) | 0.86 |
| Lymphocytes, $10^9$/L mean (SD) | 1.7 (0.7) | 1.7 (0.4) | 0.91 |
| Creatinine clearance, mL/min, mean (SD) | 82 (16) | 84 (12) | 0.70 |
| CRP[3], mg/L, mean (SD) | 43 (80) | 63 (54) | 0.07 |
| Lugdulysin positive | 11 (91.7%) | 9 (56.3%) | 0.00 |
| Clumping factor positive | 5 (41.7%) | 2 (12.5%) | 0.10 |
| One month follow up | | | |
| Length hospital stay, d, mean (SD) | 15 (12) | 18 (14) | 0.53 |
| Leukocytes, $10^9$/L, mean (SD) | 7.8 (1.8) | 6 (1.3) | 0.01 |
| Neutrophils, $10^9$/L, mean (SD) | 4.2 (1.6) | 3.5 (1.1) | 0.08 |
| Lymphocytes, $10^9$/L, mean (SD) | 1.8 (0.7) | 1.5 (0.5) | 0.21 |
| Gammaglobulines, g/L, mean (SD) | 9.8 (1.7) | 10.9 (4) | 0.53 |
| IGG[4], g/L mean (SD) | 10.3 (1.7) | 12.2 (3.4) | 0.18 |
| LT CD4[5], /$mm^3$, mean (SD) | 888 (262) | 814 (442) | 0.23 |
| LT CD8[5], /$mm^3$, mean (SD) | 489 (204) | 554 (260) | 0.11 |
| LT CD20[5], /$mm^3$, mean (SD) | 262 (192) | 149 (134) | 0.08 |
| LT CD56[5], /$mm^3$, mean (SD) | 195 (125) | 148 (107) | 0.35 |
| C3, g/L, mean (SD) | 1.2 (0.2) | 1.4 (0.4) | 0.24 |
| C4, g/L, mean (SD) | 0.2 (0.1) | 0.2 (0.1) | 0.18 |
| Total complement, U/mL, mean (SD) | 71 (7) | 71 (11.5) | 0.61 |

[1] SD = Standard deviation.
[2] T°C = Temperature.
[3] CRP = C-reactive protein.
[4] IGG = Immunoglobulin G.
[5] LT = T Lymphocyte.

total transmetatarsal amputation after metatarsophalangeal resection arthroplasty. Regarding PJIs, particularly those patients with a total knee arthroplasty infection, 7 of the 9 patients underwent a 1-stage revision, 1 patient with an early postoperative infection underwent an irrigation debridement intervention with material retention, and 1 patient underwent only irrigation debridement followed by suppressive therapy because of his general condition. Half of the patients (n = 8, 50%) underwent 6weeks of antibiotic therapy following surgery, and 15 of 16 patients (93.8%) underwent less than 3months antibiotics therapy. All patients were cured at the 1-year follow-up except for the 1 patient who underwent suppressive therapy.

### 3.3. Microbiological results

All strains were identified using MALDI-TOF MS. Of the 28 strains, 3 were small colony variants (SCVs) and needed 48–72 h at 37 °C to grow (strains 2, 19, and 40). All strains remained susceptible to methicillin, fluoroquinolones, aminoglycosides, clindamycin, and rifampicin. Slide agglutination tests yielded positive results in 7 of the 28 (25%) strains, and proteolytic activity because of lugdulysin was identified in 16 of the 28 strains (57.1%).

### 3.4. Comparison with previously published studies

Four studies from 2010 to 2017 focused on BJIs caused by *S. lugdunensis*; we did not include case reports in this comparison (Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016; Seng et al., 2017; Shah et al., 2010). The results are displayed in Table 3. All 4 were retrospective studies that included 28–39 patients with a similar mean age and sex ratio. Prosthetic knee infections were most often reported except Seng et al., who focused on osteomyelitis and thus mainly reported diabetic foot infections. A 2-stage revision and irrigation debridement were the most frequent therapeutic approaches for prosthetic infections and a medical treatment alone for diabetic foot infections. After various follow-up lengths that ranged from 1 to 2 years, treatment failure was observed in 8%–22% cases.

### 3.5. Biofilm production

Test adherence was positive for all strains i.e., all strains produced biofilm (Fig. 1). Of all, 20 strains (71.4%) started biofilm formation within 2 h (BFI <17), but all strains had started after 4 h experiment, and after 6 h, 25 strains (89.3%) had fully immobilized the microbeads. Strains 2, 13, and 40 reached a BFI <8 at 6 h but they were unable to completely block the beads at this time, showing a slow attachment kinetics.

### 3.6. Comparison between PJIs and material-free infections

Statistical analyses are reported in Table 1. The clinical characteristics of patients with and without prosthetic infections were not significantly different, except for body mass index that was significantly higher in patients with PJIs ($P = 0.048$). Regarding infection localization, knee infections occurred more often in patients with PJIs ($P = 0.003$), and no significant differences in other infection localizations were detected. Biological parameters at admission and at the 1-month follow-up were not significantly different between the 2 groups, except for the leukocyte count that was significantly higher in patients without PJIs ($P = 0.016$). The lugdulysin production frequency was significantly higher in patients with material-free infections ($P = 0.000$), and the presence of a clumping factor did not differ significantly between the 2 groups.

## 4. Discussion

We described the first prospective study regarding BJIs caused by *S. lugdunensis* as a secondary analysis of the VISIUSI clinical trial (Argemi et al., 2016). The high rate of osteoarticular infections, particularly total knee arthroplasty infections, was previously reported in 2 retrospective cohorts (Lourtet-Hascoët et al., 2016; Shah et al., 2010) and our data strengthened these observations. Our study did not identify a high proportion of urogenital abnormalities in patient backgrounds as previously reported, but a high incidence of diabetes was identified, indeed it affected 44% of the patients. The role of diabetes in material-free infections was quite obvious as 7 of 12 patients presented with a diabetic foot infection classified according to IDSA guidelines as PEDIS Grade 3; as recommended, patients underwent radical surgical resections of the infected tissues leading to a shorter antibiotic therapy (Lipsky et al., 2012). The role of diabetes, particularly hyperglycemia, has been reported for staphylococci bone infections, and *in vitro* biofilm production was enhanced for various staphylococci, including *S. lugdunensis* (Frank and Patel, 2007). Regarding PJIs, diabetes frequency was lower and most patients with a total knee arthroplasty infection did not

Please cite this article as: Argemi X, et al, Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. Diagn Microbiol Infect Dis (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002

Table 2
Patients with *S. lugdunensis* osteoarticular and prosthetic joint infections, treatments and outcomes.

| | ID[1] | Infection localisation | Postoperative infection (Yes/No) | Delay from surgery to infection (weeks) | Positive/total sample | Surgical treatment | Antibiotics | Duration (weeks) | Outcome | 2nd treatment |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Osteoarticular infections (no material) | 17 | 1st MTP | N | – | 1/1 | TMA[3] | Fluoroquinolone Clindamycin | 1.5 | Cured | – |
| | 36 | 1st MTP | N | – | 1/1 | MTP resection arthroplasty | Fluoroquinolone | – | Failed | TMA |
| | 43 | 3rd MCP[4] | N | – | 2/2 | Irrigation debridement | Unknown | – | Cured | |
| | 44 | 1st MTP | N | – | 2/3 | TMA | Fluoroquinolone Linezolid | 2 | Cured | |
| | 45 | Sternal | Y | 4 | 1/2 | Irrigation debridement | Fluoroquinolone Rifampicin | 6 | | |
| | 47 | Sternal | Y | 1 | 1/2 | Irrigation debridement | Piperacillin Vancomycin | 1 | Death (unrelated to the infection) | |
| | 49 | 3d MTP | N | – | 1/1 | 3d TMA | Clindamycin | 2 | Cured | |
| | 51 | 2d foot ITP[5] | N | – | 1/2 | Toe amputation | Amox/clav[6] | 1.5 | Cured | |
| | 53 | 2d hand ITP | N | – | 1/1 | Irrigation debridement | Amox/clav | 1.5 | Cured | |
| | 54 | 5th MTP | N | – | 1/1 | 5th TMA | Amox/clav | 1.5 | Cured | |
| | 56 | I5-S1 | N | – | 2/2 | – | Fluoroquinolone Clindamycin | 6 | Cured | |
| | 65 | 1st foot ITP | N | – | 3/3 | Toe amputation | Amox/clav | 6 | Cured | |
| Prosthetic and joint infections | 2 | Knee | Y | 30 | 3/4 | One-stage revision | Fusidic acid Rifampicin | 8 | Cured | |
| | 13 | Knee | N | – | 7/7 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 12 | Cured | |
| | 15 | L1-L3 | Y | 3 | 5/5 | Material removal Irrigation debridement | Fluoroquinolone Clindamycin | 6 | Cured | |
| | 10 | L2-S1 | Y | 3 | 1/4 | Material retention Irrigation debridement | Fluoroquinolone Rifampicin | 6 | Cured | |
| | 23 | L3-L4 | N | – | 3/5 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 6 | Cured | |
| | 24 | 1st MTP | Y | 4 | 1/1 | Material removal Irrigation debridement | Fluoroquinolone Rifampicin | 7 | Cured | |
| | 25 | Knee | N | – | 5/5 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 6 | Cured | |
| | 27 | Knee | N | – | 5/5 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 12 | Cured | |
| | 38 | Hip | Y | 16 | 2/5 | Material retention Irrigation debridement | Fluoroquinolone Rifampicin | 8 | Cured | |
| | 40 | Knee | N | – | 12/12 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 12 | Cured | |
| | 50 | 1st foot ITP | N | – | 2/2 | Material removal Toe amputation | Fluoroquinolone Clindamycin | 6 | Cured | |
| | 52 | 1st MTP | Y | 1 | 3/3 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 6 | Cured | |
| | 59 | Knee | Y | 2 | 2/2 | Material retention Irrigation debridement | Fluoroquinolone Rifampicin | 6 | Cured | |
| | 61 | Knee | N | – | 5/5 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 6 | Cured | |
| | 66 | Knee | N | – | 4/4 | Irrigation debridement | Fluoroquinolone Rifampicin | Sup.[7] Therapy | – | |
| | 80 | Knee | Y | 12 | 4/4 | One-stage revision | Fluoroquinolone Rifampicin | 8 | Cured | |

[1] ID — patient identification number from VESIJI clinical trial.
[2] MTP — metatarsophalangeal.
[3] TMA — transmetatarsal amputation.
[4] MCP — metacarpophalangeal.
[5] ITP — interphalangeal.
[6] Amox/clav — amoxicillin associated with clavulanate.
[7] Sup — suppressive.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: Argemi X, et al. Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. Diagn Microbiol Infect Dis (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002

Table 3
Reported studies of *Staphylococcus lugdunensis* bone and joint infections.

| | Shah et al., 2010 | Douiri et al., 2016 | Lourtet-Hascoet et al., 2016 | Seng et al., 2017 | Present study |
|---|---|---|---|---|---|
| Inclusion duration | 1998–2007 | 2010–2014 | 2000–2014 | 2002–2013 | 2013–2016 |
| Study design | Retrospective | Retrospective | Retrospective | Retrospective | Prospective |
| n— | 28 | 39 | 28 | 21 | 28 |
| Clinical characteristics at admission | | | | | |
| Age, year, mean + SD* | 72.5 (35–88) | 69 (47–79) | 67.5 (44–75) | 64 (35–82) | 65 (53–77) |
| Male | 14 (50%) | 21 (53.8%) | 20 (66.7%) | 14 (67%) | 12 (42.8%) |
| Cancer | 0 | 3 (7.7%) | 2 (7%) | 1 (5%) | 5 (17.8%) |
| Diabetes | 3 (11%) | 11 (28.2%) | 1 (4%) | 13 (62%) | 13 (46.4%) |
| Cardiovascular disease | | 6 (15.4%) | 4 (14%) | – | – |
| Chronic steroid therapy | 5 (18%) | – | – | – | – |
| Urogenital abnormality | 9 (32%) | – | – | – | – |
| Infection localisation | | | | | |
| Rachis | 0 | 3 (7.7%) | 0 | 0 | 4 (14.3%) |
| Prosthetic knee | 25 (89%) | 12 (30.8%) | 16 (57%) | 0 | 9 (32.1%) |
| Prosthetic hip | 3 (11%) | 2 (5.1%) | 10 (36%) | 0 | 1 (3.6%) |
| Diabetic foot osteomyelitis | 0 | 6 (15.4%) | 0 | 12 (57%) | 7 (25%) |
| Osteosynthesis | 0 | 6 (15.4%) | 0 | 0 | 0 |
| Other | 0 | 10 (25.6%) | 2 (7%) | 9 (43%) | 7 (25%) |
| Antibiotics susceptibility | | | | | |
| Oxacillin susceptible | 24 (86%) | 39 (100%) | 28 (100%) | 10 (50.5%) | 28 (100%) |
| Therapy | | | | | |
| Two-stage revision | 14 (50%) | 0 | 11 (39.3%) | 0 | 0 |
| Irrigation debridement | 10 (35.7%) | 14 (35.9%) | 11 (39.3%) | 4 (19%) | 7 (25%) |
| Medical treatment alone | 2 (7.1%) | 3 (7.7%) | 0 | 10 (47.6%) | 1 (3.6%) |
| One-stage revision | 1 (3.6%) | 6 (15.3%) | 6 (21.4%) | 0 | 9 (32.1%) |
| Material removal | 1 (3.6%) | 9 (23.1%) | 0 | 0 | 4 (14.3%) |
| Amputation | 0 | 4 (10.3%) | 0 | 6 (28.6%) | 4 (14.3%) |
| Other | 0 | 3 (7.7%) | 0 | 1 (4.8%) | 3 (10.7%) |
| Prognosis | | | | | |
| Treatment failure | 2 to 6 (8–22%) (2 years follow-up) | – | 3 (10.7%) (at least 1-year follow-up) | 5 (26%) (1-year follow-up) | 2 (7.1%) (1-year follow-up) |

* SD = Standard deviation.

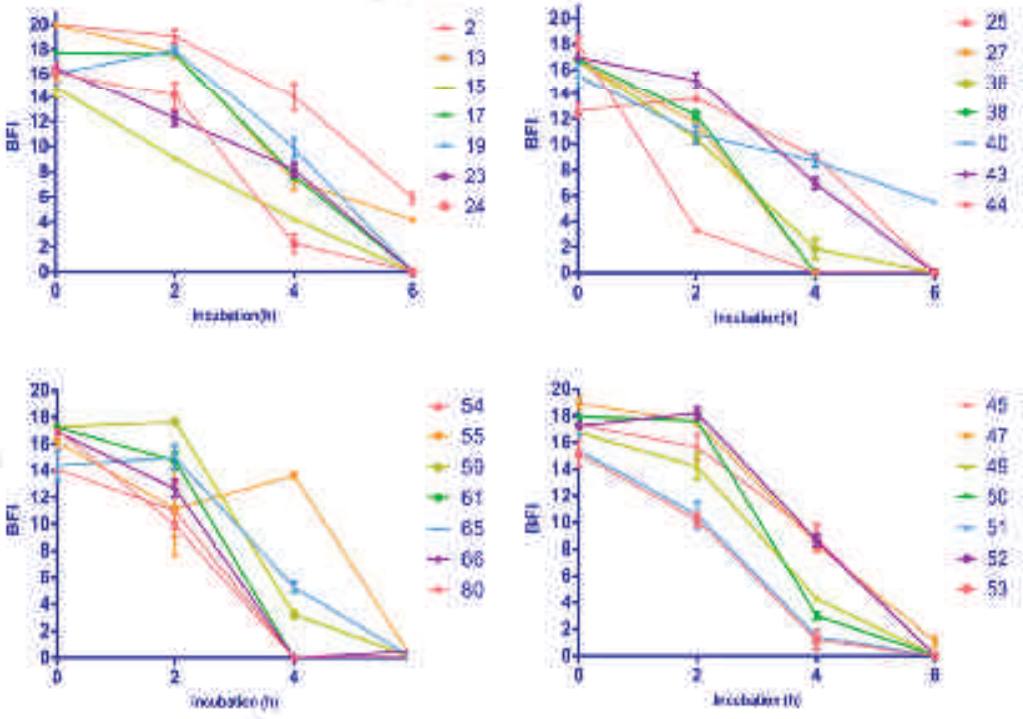



Fig. 1. Biofilm formation by 28 strains of *S. lugdunensis* issued from osteoarticular infection. Biofilm formation kinetics are displayed as BFI (Biofilm index) variations after 2, 4 and 6 hours of incubation time. Standard deviation at each time point are the results of quadruplicates. A high BFI value (>17 BFI) signs a high bead mobility under magnet action that corresponds to the absence of biofilm formation (i.e. control wells), while a low value (<2 BFI) shows a full immobilization of beads due to the sessile cells. Results were displayed at each time point with standard deviation as the results of 4 measurements corresponding to 4 different wells (quadruplicates).

Please cite this article as: Argemi X, et al, Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. Diagn Microbiol Infect Dis (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002

have very early postoperative infections (before 1 month after prosthesis implantation). A 1-stage prosthesis exchange was performed in most patients, as recommended by French guidelines, but a staged exchange is most often used in the USA, a procedure that was favored in previously reported cohorts (Lourtet-Hascoët et al., 2016; Osmon et al., 2012; Shah et al., 2010). Nevertheless, here, we report a 100% cure rate in the 7 patients concerned; 1 patient was excluded because prosthesis retention and suppressive therapy were decided because of medical contraindications for prosthesis revision. Regarding medical therapy, most patients had a prolonged treatment with fluoroquinolone plus rifampicin for approximately 6 weeks. The use of rifampicin is supported by growing *in vitro* evidence showing its ability to accumulate in bone and prevent biofilm formation (Tasse et al., 2016). Although there is no definitive evidence, similar to comparative clinical trials, several studies have emphasized the safety of this procedure for a total knee or hip replacement to favor single-stage revision (Jenny et al., 2013, 2014; Zahar et al., 2016). It provides a direct functional benefit for patients and French guidelines favor this strategy (Haute Autorité de Santé, 2014); our data also support it.

Regarding biofilm production, we observed that all strains tested were fast biofilm producers because biofilm production was detectable 4 h after incubation, and magnetic beads were fully immobilized within 6 h for 88.3% of the strains. These data confirmed that *S. lugdunensis* is a biofilm-producing species, but we showed that this phenotype was not marginal (Frank and Patel, 2007; Frank et al., 2007). It could also explain why this species has been described lately in a wide range of prosthetic joint and bone infections in which biofilm production plays a crucial role (Argemi et al., 2016; Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016). These results also directly impact PJI management, because biofilm is produced within hours after bacterial growth initiation and it justifies the immediate use of antibiotics during a 1-stage prosthesis exchange that comprises the mechanical debridement of infected tissues. Waiting for more than 6 h may be too late to perform bacterial eradication with antibiotics because the biofilm-embedded bacteria display a dramatic increase in minimum inhibitory concentrations (Frank et al., 2007; Jacqueline and Caillon, 2014; Macià et al., 2014). In our assay, 3 strains produced biofilm slower than others and they did not fully immobilize the magnetic beads. Two of those strains were SCVs. The role of SCVs in PJIs and osteoarticular infections in general has been reviewed extensively, and these metabolic staphylococci variants that usually display an increased biofilm production capacity may not be related to its rapidity (Mirani et al., 2015; Proctor et al., 2014; Singh et al., 2009).

We did not find any immune defects in patients regarding white cell counts and complement and gammaglobulin levels. Nevertheless, we observed, in this cohort, a high cancer frequency (affecting 17.9% of all patients) and the role of diabetes also seemed crucial. Therefore, we considered the population to be immunocompromised, and if *S. lugdunensis* has several virulence properties, it also probably constituted an opportunistic pathogen in a frail population.

Regarding other types of *S. lugdunensis* infections, large retrospective studies have described this pathogen in skin and soft tissue infections, although results are also sometimes difficult to interpret because of numerous biases and the absence of criteria to determine the significance of *S. lugdunensis* in clinical samples. Nevertheless, it appears that abscess formation is particularly frequent, and some authors described necrotizing infections that clearly distinguish *S. lugdunensis* from other CNS. Endocarditis and bacteremia are the second most frequently described clinical manifestations of this pathogen. Endocarditis occurred in 25%–50% of bacteremia cases, surgery was required in 40%–69% of cases with a mortality rate of up to 39%. These results also need careful interpretation because they are from retrospective reports with possible selective reporting. Nevertheless, *S. lugdunensis* seemed to behave as a particularly virulent staphylococci closer to *S. aureus* than other CNS.

This prospective cohort study also has several limitations. First, it could not give a definitive answer regarding the surgical management of PJIs and comparative clinical trials are needed. Second, biofilm production was evaluated here *in vitro* but *in vivo* studies are necessary for antibiotic susceptibility testing under such conditions.

## 5. Conclusion

This study confirmed that *S. lugdunensis* samples and infections should be managed similarly to *S. aureus* ones. IDSA guidelines for the management of vertebral osteomyelitis in adults recommend that clinicians should consider this pathogen as a virulent pathogen, as they do for *S. aureus*, and not perform an image-guided aspiration biopsy in case of positive blood cultures.

## Conflict of interests

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

## Funding

VISLISI clinical trial was funded by a grant from the Collège des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales and by public funding from EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Faculté de Médecine, Strasbourg and supported by the University Hospital of Strasbourg.

## Acknowledgments

We thank all the patients who participated in the study as well as doctors and nurses from Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. We gratefully thank BioFilm Control for providing all necessary materials to perform the biofilm experiments. The authors would like to thank Enago (www.enago.com) for the English language review, Nicolas Lefebvre and Cécile Rondé-Oustau for their precious help during manuscript revision.

## References

Argemi X, Prévost G, Riegel P, Keller D, Meyer N, Baldeyrou M, et al. VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from staphylococcus lugdunensis. Clin Microbiol Infect 2016;23. Q4

Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, et al. Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of Staphylococcus lugdunensis. J Clin Microbiol 2015;53(7):2000–2030.

Babu R, Ospelka J. Staphylococcus lugdunensis: the coagulase-negative staphylococcus you don't want to ignore. Expert Rev Anti Infect Ther 2011;9(10):901–907.

Richet L, Kahlmeter G. Staphylococcus lugdunensis in several niches of the normal skin flora. Clin Microbiol Infect 2010;16(4):385–388.

Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods 2007; 68(3):605–612.

Di Domenico EG, Toma L, Provot C, Ascenzioni F, Sperduti I, et al. Development of an in vitro assay, based on the Biofilm Ring Test®, for rapid profiling of biofilm-growing bacteria. Front Microbiol 2016;7. [Internet. cited 2017 Feb 8]. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01427/abstract].

Douiri N, Lefebvre N, Riegel P, Baldeyrou M, Prévost G, Argemi X. Staphylococcus lugdunensis: a virulent pathogen causing bone and joint infections. Clin Microbiol Infect 2016. Q5

Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol 2016;14(9):563–575.

Frank KL, Patel R. Poly-N-Acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive Staphylococcus lugdunensis isolates. Infect Immun 2007;75(10):4728–4742.

Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of Staphylococcus lugdunensis clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(3):888–895.

Haute Autorité de Santé. Prothèse de hanche ou de genou: diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation [Internet]. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1228574/fr/prothese-de-hanche-ou-de-genou-diagnostic-et-prise-en-charge-de-l-infection-dans-le-mois-suivant-l-implantation. 2014.

Heilbronner S, Holden MTG, van Tonder A, Geoghegan JA, Foster TJ, Parkhill J, et al. Genome sequence of Staphylococcus lugdunensis N920143 allows identification of

396 putative colonization and virulence factors: Staphylococcus lugdunensis genome se
397 quence. FEMS Microbiol Lett 2011;322(1):60–67.
398 Ho P-L, Leung SM-H, Chow K-H, Tse C-W-S, Cheng VC-C, Tse H, et al. Carriage niches and
399 molecular epidemiology of Staphylococcus lugdunensis and methicillin-resistant S.
400 lugdunensis among patients undergoing long term renal replacement therapy.
401 Diagn Microbiol Infect Dis 2015;81(2):141–144.
402 Hussain M, Steinbacher T, Peters G, Hellmann C, Becker K. The adhesive properties of the
403 Staphylococcus lugdunensis multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm for
404 mation and internalization. Int J Med Microbiol 2015;305(1):120–130.
405 Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint in
406 fections. J Antimicrob Chemother 2014;69(Suppl. 1):37–40.
407 Jenny J-Y, Barbe B, Gaudias J, Boeri C, Argenson J-N. High infection control rate and func
408 tion after routine one-stage exchange for chronically infected TKA. Clin Orthop 2013;
409 471(1):238–243.
410 Jenny J-Y, Lengert K, Diesinger Y, Gaudias J, Boeri C, Kempf I-Y. Routine one stage ex
411 change for chronic infection after total hip replacement. Int Orthop 2014;38(12):
412 2477–2481.
413 Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clin
414 ical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics.
415 Microbiol Mol Biol Rev 2014;78(3):510–543.
416 Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious
417 Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment
418 of diabetic foot infections. Clin Infect Dis 2012;54(12):e132–e173. id="ins310" p171.
419 Lourtet-Hascoët J, Bicart-See A, Félicé MP, Giordano G, Bonnet E. Staphylococcus
420 lugdunensis, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to
421 Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Int J Infect Dis 2016;51:56–61.
422 Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-
423 growing bacteria. Clin Microbiol Infect 2014;20(10):981–990.
424 Mirani ZA, Aziz M, Khan N. Small colony variants have a major role in stability and per
425 sistence of Staphylococcus aureus biofilms. J Antibiot (Tokyo) 2015;68(2):98–105.
426 Mitchell J. Characterization of the fibrinogen binding surface protein Ibl of Staphylococcus
427 lugdunensis. Microbiology 2004;150(11):3831–3841.
428 Nilsson M, Bjerketorp J, Wiebensjö A, Ljungh A, Frykberg L, Guss B. A von Willebrand
429 factor-binding protein from Staphylococcus lugdunensis. FEMS Microbiol Lett 2004;
430 234(1):155–161.
431 Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Jaulhac B, Prévost G, Bernardi T, et al. The BioFilm
432 Ring Test: a rapid method for routine analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm for
433 mation kinetics. J Clin Microbiol 2016;54(3):657–661.
434 Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis
435 and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the In
436 fectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2012:cis803.
437 Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Executive
438 summary: diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice
439 guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2013;56(1):
440 1–10.
441 Paulsson M, Petersson A-C, Ljungh ÅAsa. Serum and tissue protein binding and cell sur
442 face properties of Staphylococcus lugdunensis. J Med Microbiol 1993;38(2):96–102. Q6
443 Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. Staphylococcus aureus
444 Small colony variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in
445 persistent infections. Front Cell Infect Microbiol 2014;4. [Internet; cited 2017 Feb
446 10]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4117727/].
447 Seng P, Traore M, Lagier J-C, Lavigne J-P, Sotto A, Drancourt M, et al. Staphylococcus
448 lugdunensis: an underreported pathogen in osteomyelitis. J Foot Ankle Surg 2017;
449 56(2):412–413.
450 Shah NB, Osmon DR, Fadel H, Patel R, Rohrer PC, Steckelberg JM, et al. Laboratory and
451 clinical characteristics of Staphylococcus lugdunensis prosthetic joint infections. J
452 Clin Microbiol 2010;48(5):1600–1603.
453 Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic
454 resistance of planktonic and biofilm-associated Staphylococcus aureus: an in vitro
455 study. J Med Microbiol 2009;58(Pt 8):1067–1073.
456 Tasse J, Conlon D, Badel-Berchoux S, Chavanet P, Bernardi T, Provot C, et al. Preliminary
457 results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device
458 associated infections: the AntibioFilmgramM. Pathog Dis 2016;74(6). Q7
459 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The European Commit
460 tee on antimicrobial susceptibility testing recommendations [Internet]. Available
461 from: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_
462 0_2014.pdf. 2014.
463 van der Mee-Marquet N, Achard A, Meregnetti L, Danton A, Minier M, Quentin R. Staphy
464 lococcus lugdunensis infections: high frequency of inguinal area carriage. J Clin
465 Microbiol 2003;41(4):1404–1409.
466 Zahar A, Kendoff DO, Klatte TO, Gebhie TA. Can good infection control be obtained in one
467 stage exchange of the infected TKA to a rotating hinge design? 10-year results. Clin
468 Orthop 2010;474(1):81–87.
469 Zapotoczna M, Heilbronner S, Speziale P, Foster TJ. Iron-regulated surface determi
470 nant (Isd) proteins of Staphylococcus lugdunensis. J Bacteriol 2012;194(23):
471 6451–6467.


UNCORRECTED

Please cite this article as: Argemi X, et al. Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. Diagn Microbiol Infect Dis (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002

## E. Article 5 : Infection chronique de prothèse articulaire secondaire à la transformation de *Staphylococcus lugdunensis* en variant à petites colonies

**Auteurs :** Xavier Argemi, Sandrine Dahyot, Jérémie Lebeurre, Yves Hansmann, Cécile Ronde-Oustau, Gilles Prévost.

**Statut de l'article : *in press***

**Revue : Médecine et maladies Infectieuses**

**Impact Factor 2014 : 1.4**

**Rang SIGAPS : E**

**Résumé de l'article**

Nous avons voulu décrire le cas tout à fait original d'une patiente ayant présenté une infection de prothèse du genou à *S. lugdunensis* de phénotype sauvage pour laquelle un traitement conservateur avec un simple lavage articulaire suivi d'une antibiothérapie a été mené. La patiente a rechuté 1 an plus tard sous la forme d'une infection chronique de sa prothèse à *S. lugdunensis* de phénotype petites colonies. Ces variant bactériens, décrits notamment chez *S. aureus*, ont un métabolisme ralenti et émergent parfois sous la pression d'une antibiothérapie qui ne serait pas suffisamment efficace. Nous avons posé l'hypothèse du caractère clonal de la souche impliquée dans les 2 infections comme l'évoquait par ailleurs le changement d'antibiogramme. Nous avons analysé les profils spectrométriques des 2 souches bactériennes et les avons inclus dans un large dendrogramme ne montrant pas d'agrégation. Le caractère principalement ribosomal des protéines analysées en spectrométrie de masse peut expliquer cette donnée discordante dans la mesure où la machinerie protéique des souches à petites colonies diffère des souches à colonies dites « normales ». Nous avons ensuite inclus ces deux souches dans un schéma de MLST en se basant sur la séquence de 7 gènes ménagers, mais aussi dans un schéma de Multi Virulence Locus Sequence Typing (MVLST) analysant la séquence de 3 gènes de virulence (*atlR3*, *isdJ*, *SLUG_16930*). On observe alors l'agrégation conjointe des 2 souches dans le Sequence Type 1 et le Virulence Type 1, un argument fort pour supporter l'hypothèse d'une clonalité de la souche.

Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Médecine et maladies infectieuses

Médecine et maladies infectieuses xxx (2017) xxx–xxx

Case report

# *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection

## *Infection chronique de prothèse articulaire secondaire à la transformation de* Staphylococcus lugdunensis *en variant à petites colonies*

X. Argemi [a,b,*], S. Dahyot [c], J. Lebeurre [c], Y. Hansmann [a,b], C. Ronde Oustau [d], G. Prévost [b]

[a] *Maladies infectieuses et tropicales, hôpitaux universitaires, Strasbourg, France*
[b] *EA7290 virulence bactérienne précoce, fédération de médecine translationnelle, université de Strasbourg, hôpitaux universitaires, Strasbourg, France*
[c] *Laboratoire GRAM EA2656, UFR médecine pharmacie, université de Rouen, Rouen, France*
[d] *Service de chirurgie orthopédique, CCOM, hôpitaux universitaires, Strasbourg, France*

Received 21 October 2016; received in revised form 16 December 2016; accepted 23 May 2017

*Keywords:* *Staphylococcus lugdunensis*; Prosthetic joint infections; Multilocus sequence typing

*Mots clés :* *Staphylococcus lugdunensis* ; Infection ostéoarticulaire ; Typage génomique multilocus

## 1. Introduction

*Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative staphylococcus (CoNS) now considered a significant pathogen. The use of new tools such as matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for bacterial identification in laboratories has revealed that this pathogen was involved in a wide range of clinical diseases of particular severity [1]. *S. lugdunensis* has mainly been reported in skin and soft tissue infections but it also causes bacteremia with endocarditis, with an unusual rate of morbidity and mortality close to what is usually observed with *Staphylococcus aureus*. In vitro studies have shown the ability of this pathogen to produce biofilm, and several genes coding virulence factors are present including putative adhesion factors [2]. Prosthetic joint infections are not frequent manifestations of *S. lugdunensis*. Two series of patients have been reported, indicating that knee prostheses were more often affected and that prognosis was similar to other CoNS prosthetic infections if surgery was performed [3]. One case of *S. lugdunensis* small colony variant-related infection has been reported in a patient presenting with cardiac device-related infection [4]. We report a case of *S. lugdunensis* prosthetic knee infection that relapsed one year later with the same strain that changed from regular to small colony variant and became antibiotic-resistant.

## 2. Case report

A 70-year-old woman was admitted to the orthopedic department in May 2012 for a spontaneous acute arthritis of the right knee. She underwent total knee arthroplasty in 2009 for degenerative arthritis. This prosthesis was changed in 2010 because of multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* prosthetic infection treated for six weeks with daptomycin and rifampicin following surgery. Treatment was successful. However, the patient was newly admitted in May 2012 for acute arthritis of the same knee. She experienced a sudden pain in the right knee when exercising, followed by a swelling of the knee two weeks later. She did not have any skin lesion before or during this episode and did not experience any trauma of the right knee. She was addressed to her surgeon who observed an inflammatory knee with no fever. Knee X-ray was normal. Fluid joint aspiration revealed pus. *S. lugdunensis* was isolated on culture. Laboratory findings included a leukocyte count of 9600/μL, a C-reactive protein (CRP) of 164 mg/L, and sterile blood culture. At the microbiology laboratory, bacterial colony

* Corresponding author at: Maladies infectieuses et tropicales, nouvel hôpital civil, 67000 Strasbourg, France.
*E-mail address:* xavier_argemi@hotmail.com (X. Argemi).

http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2017.05.005
0399-077X/© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

UNCORRECTED PROOF

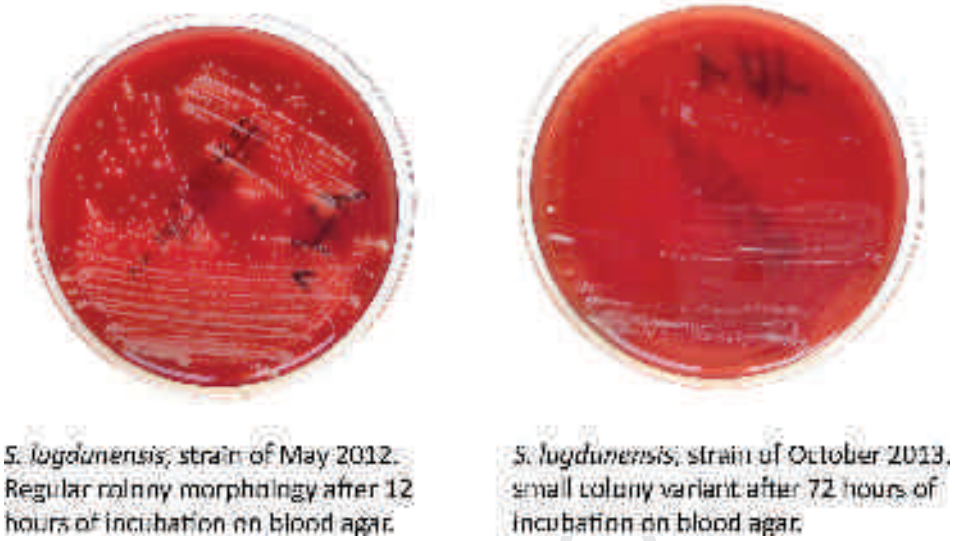



Fig. 1. Bacterial colony morphology of two *Staphylococcus lugdunensis* strains isolated from bone samples.
*Aspect morphologique de 2 cultures de Staphylococcus lugdunensis issus de prélèvements osseux.*

morphology was as usual after 12 hours of culture on a sheep blood agar solid medium (Fig. 1). Bacterial identification was performed using MALDI-TOF MS and antimicrobial susceptibility testing revealed that the strain was fully susceptible (methicillin, vancomycin, rifampicin, fusidic acid, all quinolones, amikacin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole). Decision was made to treat the patient with debridement, prosthesis retention, and exchange of the polyethylene liner associated with a three-month antibiotic therapy including ofloxacin and rifampicin. All bacteriological samples (synovial tissue, joint fluid, and polyethylene) were positive for *S. lugdunensis* with the same regular colony morphology. Treatment was initially successful but the patient experienced mechanical joint pain three months after antibiotic discontinuation that slowly worsened until October 2013 when she decided to contact the surgical team because of a sinus tract with purulent discharge. She did not have any fever; blood leukocyte count was 6200/μL, and CRP 37 mg/L. X-ray of the prosthesis did not reveal prosthesis loosening. Preoperative synovial fluid aspiration was sterile but purulent, and decision was made to perform a one-stage exchange of the prosthesis with the prescription of an empirical antibiotic therapy. Several samples were analyzed: periprosthetic biopsies, sonication of the removed material inoculated in pediatric blood culture bottle, and synovial tissue cultures. The first results came from the pediatric blood cultures after three days, followed by all samples sub-cultured on sheep blood agar solid media that yielded a small colony variant of *S. lugdunensis* (Fig. 1). Antimicrobial susceptibility testing showed that the strain was resistant to fluoroquinolones and amikacin as per EUCAST guidelines [5] (MIC 4 μg/mL for ciprofloxacin and 24 μg/mL for amikacin). The strains were compared with MALDI/TOF MS using a Microflex™ system and Biotyper™ software. A standard protein extraction from the strains with ethanol/formic acid was performed as previously described and one microliter of protein extract was then loaded into 10 different wells of a polished steel target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), covered with 1.5 μL of a saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid/MALDI-TOF matrix in 50% (v/v) acetonitrile/2.5% (v/v) trifluoroacetic acid as an electron donor. Score oriented dendrograms were generated from main spectral projection (MSP) calculated with Biotyper™ with the following parameter: hierarchical clustering, Euclidean distance, and single linkage. We included a database of 80 spectra generated in the same experimental conditions with *S. lugdunensis* coming from various clinical samples (infected patients and contaminated samples). We also included four different bacteria: *S. epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus capitis*, and *Lactobacillus*. All *S. lugdunensis* strains were from VISLISI clinical trial registered at clinicaltrial.gov under number NCT02026895; strains could thus be classified. The study and consent form were approved by the French Ethical Committee (IDCRB-2013-A01057-38). Results are detailed on Fig. 2. The 2012 strain was named I_19_2012 and the 2013 strain was I_19. Results showed that both strains did not aggregate in the same cluster. We also performed a multilocus sequence typing (MLST) analysis using intragenic sequences of seven housekeeping genes and a multi-virulence-locus sequence typing (MVLST) analysis using a trilocus sequence typing scheme based on the intragenic regions of *atlLR3*, *isdJ*, and SLUG_16930, which is more discriminant than MLST [6]. Allelic profile and sequence type (ST) were assigned using the international MLST database [7]. MLST and MVLST analysis showed that the two strains belonged to ST1 and virulence type 1.

The patient was treated with fusidic acid and rifampicin for three months. The one-year follow-up showed that the patient fully recovered (Fig. 3). Q3

## 3. Discussion

This case patient illustrates for the first time the ability of *S. lugdunensis* to switch from a normal metabolic state to a

Please cite this article in press as: Argemi X, et al. *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. Med Mal Infect (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2017.05.005

UNCORRECTED PROOF

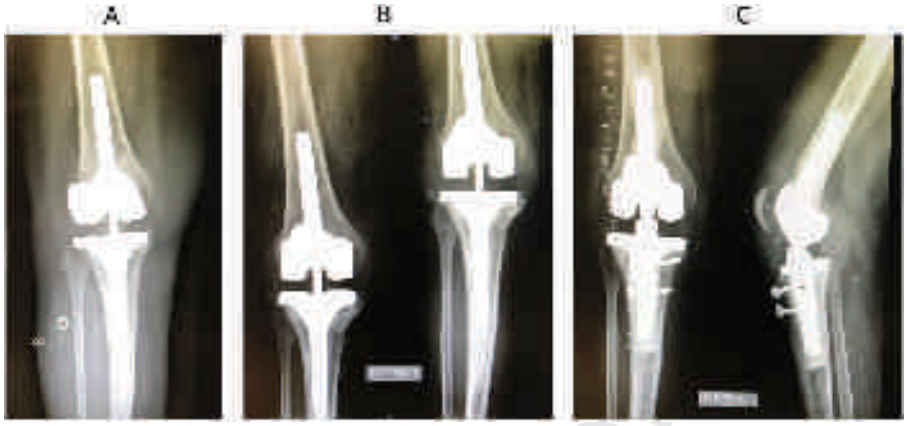



Fig. 2. Imaging of total arthroplasthy of the right knee at different surgical time.
*Aspect radiographique d'une prothèse totale de genou droit aux différents moments de sa prise en charge chirurgicale.*

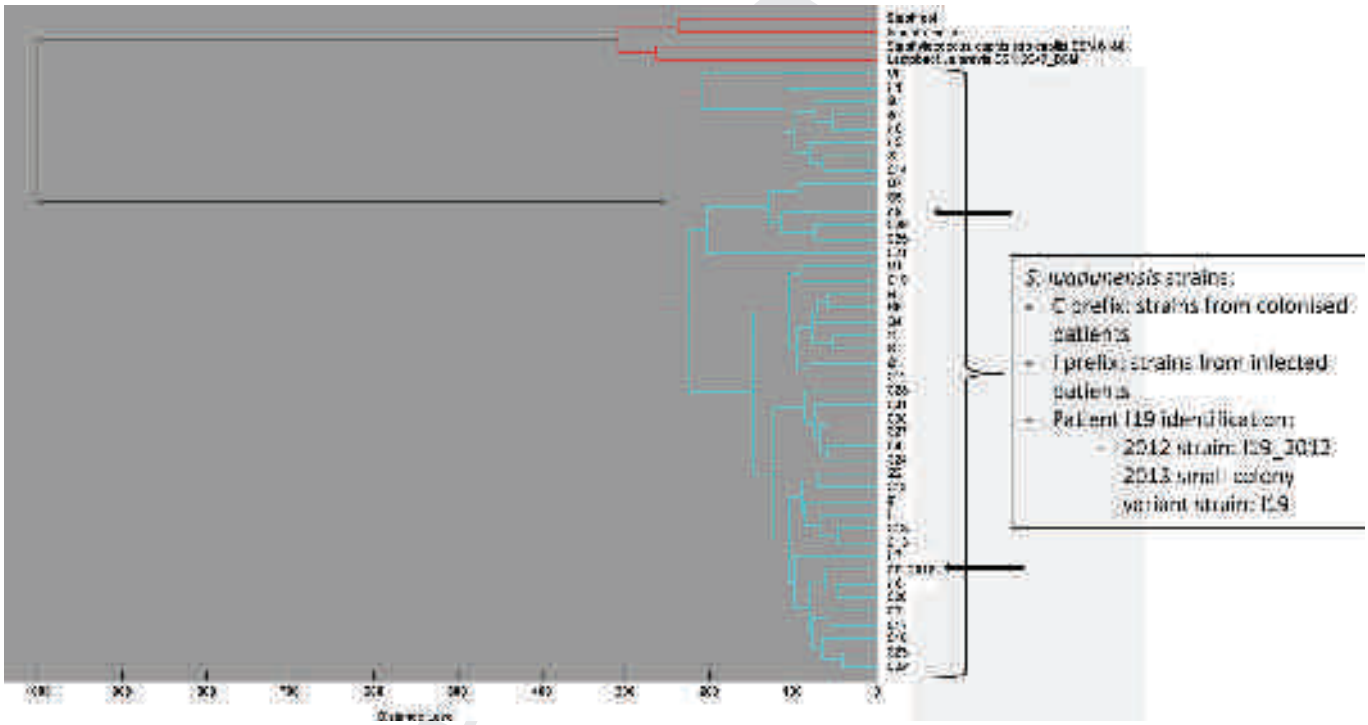



Fig. 3. MALDI-TOF analysis of 48 strains of staphylococci and score oriented dendograms generated from main spectra projection (MSP) calculated with Biotyper™.
*Analyse par MALDI-TOF de 48 souches de Staphylococcus lugdunensis et construction d'un dendogramme à partir de données issues de Biotyper™ (mode main spectra projection).*

defective metabolic form of bacteria called small colony variants (SCV) in a clinical observation resulting in antibiotic treatment failure. Although several alterations in bacterial metabolism explain this slow growth rate in SCVs, only limited numbers of defects are found in SCVs coming from clinical specimen. Persistent and relapsing infections caused by SCV variants have been reported in a wide range of infections, prosthetic joint infections being mainly caused by *S. aureus* and *S. epidermidis* SCVs [8]. Clinical studies have shown that SCVs emergence frequently occurred after antibiotic exposure, particularly aminoglycosides for *S. aureus* but several other mechanisms are probably implicated like internalization of the pathogen resulting in its exposition to cationic proteins that seem to trigger *S. aureus* SCV emergence even in the absence of antibiotics. *S. lugdunensis* SCV conversion has been reported in vitro following exposure to stress (low temperature, acidic conditions, osmotic challenge) and to antibiotics: penicillin and vancomycin [9]. Our case report revealed that *S. lugdunensis* infection persisted despite initial antibiotic treatment, and SCV conversion could have occurred because of inherent characteristics of the bacterium and because of exposure to quinolones or rifampicin. MALDI-TOF MS and cluster analysis through the dendrogram performed did not show aggregation of the strains from 2012 and 2013 even if MALDI-TOF MS has been used in the literature as a reliable tool for strain clustering during outbreak investigations. This result might not be surprising as MALDI-TOF MS as used in hospital laboratories mainly focuses its analysis on ribosomal proteins that might change even for a unique strain after SCV conversion. On the

Please cite this article in press as: Argemi X, et al. *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. Med Mal Infect (2017), http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2017.05.005

contrary, MLST analysis allows clustering using housekeeping genes that might not diverge between two related strains even after SCV conversion. This is why clustering with MLST scheme displayed the two strains in the same cluster.

This unique observation of *S. lugdunensis* relapsing infection with the same strain after SCV conversion provides new insight into the high pathogenicity of this strain, and particularly into bone and joint infections as previously reported [10].

## Funding

This work was funded by a grant from the Collège des universitaires des maladies infectieuses et tropicales (CMIT), by EA7290 virulence bactérienne précoce, faculté de médecine, Strasbourg, and supported by the University Hospital of Strasbourg and by Public funding of EA7290.

## Contribution of authors

XA and YH wrote the article. CRO and YH took care of the patient's management. SD and JL performed the MLST. XA and GP performed the MALDI-TOF.

## Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

## References

[1] Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, et al. Implementation of MALDI-TOF MS in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of Staphylococcus lugdunensis. J Clin Microbiol 2015, http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00177-15.

[2] Heilbronner S, Holden MTG, van Tonder A, Geoghegan JA, Foster TJ, Parkhill J, et al. Genome sequence of Staphylococcus lugdunensis N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: Staphylococcus lugdunensis genome sequence. FEMS Microbiol Lett 2011;322:60–7, http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x.

[3] Shah NB, Osmon DR, Fadel H, Patel R, Kohner PC, Steckelberg JM, et al. Laboratory and clinical characteristics of Staphylococcus lugdunensis prosthetic joint infections. J Clin Microbiol 2010;48:1600–3, http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01769-09.

[4] Seifert H, Oltmanns D, Becker K, Wisplinghoff H, von Eiff C. Staphylococcus lugdunensis pacemaker-related infection. Emerg Infect Dis 2005;11:1283–6, http://dx.doi.org/10.3201/eid1108.041177.

[5] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Recommendations; 2014.

[6] Didi J, Lemée L, Gibert L, Pons J-L, Pestel-Caron M. Multi-virulence locus sequence typing of Staphylococcus lugdunensis is consistent with clonal structure and reliable for epidemiological typing. J Clin Microbiol 2014, http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01370-14.

[7] Institut Pasteur MLST database; 2017 [Accessed May 2017] http://bigsdb.pasteur.fr/.

[8] Tande AJ, Osmon DR, Greenwood-Quaintance KE, Mabry TM, Hanssen AD, Patel R. Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant Staphylococci. mBio 2014;5:e01910–1914, http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01910-14.

[9] Onyango LA, Hugh Dunstan R, Roberts TK, Macdonald MM, Gottfries J. Phenotypic variants of Staphylococci and their underlying population distributions following exposure to stress. PLoS One 2013;8:e77614, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077614.

[10] Douiri N, Lefebvre N, Riegel P, Baldeyrou M, Prevost G, Argemi X. Staphylococcus lugdunensis: a virulent pathogen causing bone and joint infections. Clin Microbiol Infect 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.031.

UNCORRECTED PROOF

## F. Article 6 : Séquençage complet de 7 souches de *S. lugdunensis* et mise en évidence d'éléments génétiques mobiles

**Auteurs :** Xavier Argemi, Véronique Martin, Valentin Loux, Sandrine Dahyot, Jérémie Lebeurre, Aurélien Guffroy, Mickael Martin, Aurélie Velay, Daniel Keller, Philippe Riegel, Yves Hansmann, Nicodème Paul, Gilles Prévost.

**Statut de l'article : *in press***

**Revue : Genome Biology and Evolution**

**Impact Factor 2014 : 4,1**

**Rang SIGAPS : B**

**Résumé de l'article**

**Objectifs :** l'objectif de cette partie de l'étude VISLISI est le séquençage *de novo* 7 souches de *S. lugdunensis*, d'annoter les génomes et les caractériser à plusieurs niveaux : caractéristiques générales, analyse fonctionnelle globale des annotations, recherche des gènes de virulence décrits dans la littérature, recherche d'éléments génétiques mobiles (prophages, plasmides et îlots de pathogénicité). Nous avons pour cela réalisé un séquençage Illumina et mis en place un pipeline d'analyses bioinformatiques décrits dans le paragraphe des matériels et méthodes.

**Résultats :** nous avons pu réaliser un assemblage final sous la forme d'un chromosome unique pour les 7 génomes ainsi qu'une annotation complète. D'une manière générale on remarque la grande conservation des génomes, les uns par rapport aux autres, mais aussi par rapport aux 2 génomes complets disponibles dans la littérature. Il s'agit de génomes de 2.5 à 2.6 Mb avec un pourcentage de GC de 33.7% à 33.8% ; 94 à 97% du génome est conservé entre les souches (sans tenir compte des insertions, délétions et changements de nucléotides ponctuels). L'annotation retrouve de 2359 à 2524 séquences codantes, dont 47 à 60 ARNt, 6 à 14 ARNr et 0 à 1 ARNtm. La recherche d'éléments génétiques mobiles a permis l'identification de 4 prophages de la classe des *Siphoviridae*, caractéristique des phages infectant les staphylocoques, mesurant de 44.4 à 53.5 kb et avec un contenu en GC de 33.8 à 34.5%. Environ 1/3 des séquences codantes identifies correspondent à des protéines connues dans la base de données NCBI, ce qui est habituel chez les prophages publiés. Nous n'avons identifié aucune protéine de virulence potentielle. La comparaison aux bases de données montre qu'environ 30% des séquences codantes identifiées sont partagées avec des phages connus : StB12 (*S. hominis*) et PH15 (*S. epidermidis*). La recherche de plasmides a montré la présence de 5 possibles séquences plasmidiques. Ces 5 plasmides ont une longueur de 3110 à 12579 pb, un contenu en GC de 28.7% à 33.6% et de 3 à 13 séquences codantes. Les gènes de réplication identifiés sont : *repL, repE et repA*. Nous n'avons mis en évidence aucun gène impliqué dans le transfert potentiel des plasmides (gènes du système de sécrétion de type IV). Il n'y a pas de protéines de virulence potentielles mais le plasmide pVISLISI_1 issue de la souche VISLISI_22 présente un plasmide déjà décrit dans la littérature, pLUG10 porteur d'un gène de résistance au cadmium, *cadD*. Les

autres plasmides présentent des homologies de séquence parfois grandes pour des plasmides déjà connus, notamment pVISLISI_3 qui présente 100% d'homologies avec pRIVM6519_1, un plasmide décrit chez *S. aureus*. Cette observation ne constitue pas la preuve d'un transfert plasmidique de *S. aureus* vers *S. lugdunensis*, ce qui serait tout à fait exceptionnel dans la mesure où le transfert d'information génétique n'est décrit que des SCN vers *S. aureus*. Il s'agit néanmoins d'une observation originale quand on considère la pathogénicité de *S. lugdunensis* et la virulence de *S. aureus*. Enfin, nous n'avons pas mis en évidence d'îlots de pathogénicité.

**Conclusion :** cette étude génétique permet surtout de mettre en évidence la présence d'éléments génétiques mobiles éclairant de manière tout à fait originale sa pathogénicité. Nous n'avons pas mis en évidence de facteur de virulence potentiel sur ces éléments mobiles, mais l'hypothèse de transferts de gènes de *S. aureus* vers *S. lugdunensis* est une hypothèse qui constitue un programme de recherche à part entière compte tenu du nombre et de la variété des gènes de virulence portés par des éléments génétiques mobiles chez *S. aureus*.

# Whole-Genome Sequencing of Seven Strains of *Staphylococcus lugdunensis* Allows Identification of Mobile Genetic Elements

Xavier Argemi[1,2,*], Véronique Martin[3], Valentin Loux[3], Sandrine Dahyot[4], Jérémie Lebeurre[4], Aurélien Guffroy[5,6], Mickael Martin[5,6], Aurélie Velay[7,8], Daniel Keller[2], Philippe Riegel[2], Yves Hansmann[1,2], Nicodème Paul[9], and Gilles Prévost[2]

[1]Hôpitaux Universitaires, Maladies Infectieuses et Tropicales, Strasbourg, France

[2]Université de Strasbourg, CHRU de Strasbourg, VBP EA7290, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Institut de bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

[3]INRA – Unité Mathématiques et Informatique Appliquées, du Genome à l'Environnement (MaIAGE), Jouy-en Josas, France

[4]Laboratoire GRAM EA2656, Université de Rouen – IRIB UFR Médecine-Pharmacie Batiment Recherche, Rouen, France

[5]Service d'Immunologie Clinique et de Médecine Interne, Centre National de Référence des Maladies Auto-immunes Rares, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

[6]CNRS UPR 3572, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique/Equipe, Tolérance Cellulaire B et Auto-immunité, Laboratoire d'excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France

[7]Virology Laboratory, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

[8]2-INSERM, UMR_S1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[9]Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR_S 1109, Plateforme GENOMAX, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

*Corresponding author: E-mail: xavier.argemi@chru-strasbourg.fr.

**Accepted:** April 20, 2017

**Data Deposition:** The complete genome sequences have been deposited at GenBank under the accessions CP020769-CP020770, CP020761, CP020764-CP020765, CP020766-CP020767-CP020768, CP020735-CP020736, CP020763, CP020762. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/2548?.

## Abstract

Coagulase negative staphylococci are normal inhabitant of the human skin flora that account for an increasing number of infections, particularly hospital-acquired infections. *Staphylococcus lugdunensis* has emerged as a most virulent species causing various infections with clinical characteristics close to what clinicians usually observe with *Staphylococcus aureus* and both bacteria share more than 70% of their genome. Virulence of *S. aureus* relies on a large repertoire of virulence factors, many of which are encoded on mobile genetic elements. *S. lugdunensis* also bears various putative virulence genes but only one complete genome with extensive analysis has been published with one prophage sequence ($\phi$SL2) and a unique plasmid was previously described. In this study, we performed de novo sequencing, whole genome assembly and annotation of seven strains of *S. lugdunensis* from VISLISI clinical trial. We searched for the presence of virulence genes and mobile genetics elements using bioinformatics tools. We identified four new prophages, named $\phi$SL2 to $\phi$SL4, belonging to the *Siphoviridae* class and five plasmids, named *pVISLISI_1* to *pVISLISI_5*. Three plasmids are homologous to known plasmids that include, amongst others, one *S. aureus* plasmid. The two other plasmids were not described previously. This study provides a new context for the study of *S. lugdunensis* virulence suggesting the occurrence of several genetic recombination' with other staphylococci.

**Key words:** *Staphylococcus lugdunensis*, plasmids, prophages, virulence, next generation sequencing.

© The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

## Background

*Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase negative staphylococci (CoNS) that displays an unusual rate of virulence close to *Staphylococcus aureus* (Babu and Oropello 2011; Argemi et al. 2015; Douiri et al. 2016). This commensal bacterium has been mainly involved in nosocomial infections affecting debilitated patients with epithelial barrier breaches. But this bacteria also causes severe community-acquired infection such as endocarditis, skin, and soft tissues infections with necrosis or septic shock that might be due to virulence factors production (Delaunay et al. 2014; Hung et al. 2012; Sabe et al. 2014; Woznowski et al. 2010; Pareja et al. 1998). Until now, four complete genome sequences have been published and seven partially finished sequences using next generation sequencing (NCBI). The genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 (NCBI reference sequence NC_017353.1) by Heilbronner et al. identified various putative virulence factors, a single prophage named $\phi$SL1, and 14 insertion sequences (Heilbronner et al. 2013). One cadmium resistance plasmid named pLUG10 (NCBI reference sequence NC_002093.1) was also described in several strains of *S. lugdunensis* homologous to pOX6 *S. aureus* plasmid (Poitevin-Later et al. 1992). Mobile genetics elements (MGE) such as phages, plasmids, and pathogenicity islands have been widely studied in *S. aureus* as they encode numerous virulence factors but their occurrence in CoNS remains scarce (Malachowa and DeLeo 2010). This accessory genetic material might represent up to 25% in the *S. aureus* genome and contributes to the phenotypic plasticity of this pathogen but also its virulence as a majority of the virulence factors described in this bacteria are located on MGE (Otto 2014). Phage-encoded virulence factors have not been observed in CoNS and only few prophages have been described in clinical isolates, mainly from *Staphylococcus epidermidis* and *S. hominis* showing close relationships with *S. aureus* phages and prophages (Deghorain and Van Melderen 2012; Deghorain et al. 2012). Plasmids are implicated in the dissemination of multidrug resistance genes especially in *S. aureus* in hospital settings but can also bear toxin genes (Shintani et al. 2015; McCarthy and Lindsay 2012). Their descriptions in CoNS are rare and probably underestimated, most of the plasmids described were found in *S. epidermidis* strains (European Nucleotide Archive 2016). Finally, pathogenicity islands are widespread in *S. aureus* and usually carry one or more virulence factors such as superantigens (Sato'o et al. 2013). Although reports of toxigenic genes presence in CoNS pathogenicity islands can be found in the literature many author still question their existence and only three strains of *S. epidermidis* with an enterotoxin C-like-bearing pathogenicity island have been described (Madhusoodanan et al. 2011; Nanoukon et al. 2016). Thus, we conducted a genomic study on *S. lugdunensis* aiming to find elements that might explain its virulence. Bioinformatics tools have been developed to identify *in silico* prophages, plasmids or pathogenicity islands in newly assembled genomes (Che et al. 2014; Arndt et al. 2016; Carattoli et al. 2014). We describe then the whole-genome sequencing and annotation of seven clinical strains of *S. lugdunensis* and identification of MGE using computational approaches. We identified four new prophages with similarities with CoNS and *S. aureus* phages, but also five plasmids previously identified in other CoNS and in *S. aureus*. We did not identify pathogenicity islands bearing virulence factors, but those data give a totally new insight in CoNS genetic plasticity and argue for the possibility of horizontal genetics transfers with other CoNS and *S. aureus*.

## Materials and Methods

### Bacterial Strains

Six strains of *Staphylococcus lugdunensis* came from clinical samples issued from VISLISI trial (Virulence of *Staphylococcus lugdunensis* in Severe Infections) (Argemi et al. 2016). This prospective study was conducted from November 2013 to March 2016 at the University Hospital of Strasbourg, France that promoted the study (PRI 2013–HUS n° 5616). The study was carried out in accordance with the French Ethical Committee recommendations and written informed consent from all subjects in accordance with the Declaration of Helsinki (study registration number: IDCRB-2013-A01057-38). This study was also registered at clinicaltrial.gov under number NCT02026895. The six selected strains for whole-genome sequencing were named in accordance to the trial name and the rank of inclusion. Clinical origins of the strains are reported in table 1.

### Genome Sequencing and Annotation

Whole-genome sequencing was performed using Illumina technology: Illumina HiSeq 2500 (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany). It produced paired end sequences of 125 bp. Adapters were removed and low quality sequences excluded by GATC and final quality of the fastq files controlled with FastQC (v 0.11.4). Then, sequence assemblies were performed using SPAdes (v 2.9.0) with the following kmer: 21-33-55 (Bankevich et al. 2012). SPAdes output contigs $<$ 500 pb or with coverage $<10\times$ were removed. Sequences were finished using PAGIT toolkit from Sanger Institute (Swain et al. 2012). ABACAS (Algorithm-Based Automatic Contiguation of Assembled Sequences) software (v 1.3.1) was used to orientate and order contigs using a reference genome N920143 (NCBI reference sequence NC_017353.1) (Assefa et al. 2009). IMAGE (Iterative Mapping and Assembly for Gap Elimination) software (v 2.4.1) allowed gap closing using raw fastq files and scaffolding in a second step (Tsai et al. 2010). Final sequence annotation was performed using AGMIAL pipeline (Bryson et al. 2006). This workflow produced *in fine* a unique chromosome for each sequence and short

**Table 1**

Whole-Genome Sequencing of Seven Strains of *Staphylococcus lugdunensis* (Paired-Base Sequencing, Illumina HiSeq 2500) and Comparison with *S. lugdunensis* Reference Strain N920143 (NCBI Reference Sequence: NC_017353.1)

| Strain | Ref N920143 | VISLISI_21 | VISLISI_22 | VISLISI_25 | VISLISI_27 | VISLISI_33 | VISLISI_37 | C33 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Clinical origin | Breast abscess | Bacteremia | Endocarditis | Knee prosthesis | Knee prosthesis | Liver abscess | Endocarditis | Cutaneous swab |
| Contigs number | 69 (V) | 34 (S) | 27 (S) | 19 (S) | 26 (S) | 26 (S) | 24 (S) | 40 (S) |
| N50 (kb) | 72 | 167 | 352 | 599 | 402 | 245 | 444 | 170 |
| Full length of the scaffold (bp) | 2.595.888 | 2.546.158 | 2.567.776 | 2.491.642 | 2.594.484 | 2.662.421 | 2.579.522 | 2.529.316 |
| GC content (%) | 33.8 | 33.7 | 33.7 | 33.8 | 33.6 | 33.7 | 33.7 | 33.8 |
| Genome fraction VS reference (%) | — | 94.7 | 97.4 | 93.7 | 97.1 | 97.3 | 98.9 | 94.3 |
| Coding sequences | 2359 | 2451 | 2483 | 2422 | 2427 | 2524 | 2415 | 2429 |
| tRNA | 56 | 47 | 59 | 48 | 60 | 56 | 52 | 58 |
| rRNA | 14 | 6 | 7 | 4 | 7 | 5 | 6 | 7 |
| tmRNA | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Functional annotations | | | | | | | | |
| All proteins | — | 2438 | 2476 | 2416 | 2498 | 2599 | 2483 | 2420 |
| GO terms | — | 1610 (66%) | 1608 (64.5%) | 1596 (66.1%) | 1632 (65.3%) | 1649 (63.4%) | 1622 (65.3%) | 1602 (66.2%) |

NOTE.—Ref, reference; V, velvet and S, Spades; kb, kilobase; bp, base pairs; tRNA, transfer RNA; rRNA, ribosomal RNA; tmRNA, transfer-messenger RNA; GO terms, number of gene ontology terms found by InterProScan software.

nonaligned contigs that were further analysed to search for plasmids, or any other genetic elements of interest. Each nonaligned contig was loaded into ARTEMIS software (v 16.0.0) to identify open reading frames (ORF) that were successively analyzed using protein BLAST (Carver et al. 2008). Genomes functional annotations were performed using InterProScan (v 4.8) (Jones et al. 2014).

### Genome Comparison and MGE Search

CSI Phylogeny (v 1.4) from the Center for Genomic Epidemiology (Lyngby, Danemark) was used to produce a phylogenetic tree of both sequenced strains and available annotated genomes. This web based tool calls and filters single nucleotide polymorphisms (SNP), does site validation and infers a phylogeny based on the concatenated alignment of the high quality SNPs (Kaas et al. 2014). The reference strain chosen to compare with was *S. lugdunensis* N920143 (NCBI Reference Sequence: NC_017353.1) and we also included in the tree the three other fully sequenced and annotated genomes of *S. lugdunensis*: HKU09-01 (NCBI Reference Sequence: NC_013893.1), FDAARGOS_141 (NCBI Reference Sequence: NZ_CP014022.1), and FDAARGOS_143 (NCBI Reference Sequence: NZ_CP014023.1). Detailed parameters and command line of the tools used are available in supplementary material part S1, Supplementary Material online.

Prophage search and annotation was performed using PHASTER (Phage Search Tool Enhanced release) (Zhou et al. 2011; Arndt et al. 2016). This web-based tool allows rapid identification of putative prophages sequences and provides annotations. A quality score $>$ 90 defined an intact prophage sequence. PHASTER also provided sequence analysis parameters: region length and position, GC content and the most common related prophages, and phages with available sequences.

Plasmid search was performed on all nonaligned contigs remaining after genome assembly particularly in contigs displaying an unusual high level of coverage possibly linked to sequence duplication in bacterial genome as it might be seen with plasmids. Those additional contigs were annotated using PROKKA (v 1.11) and sequence similarities were searched through BLAST® database. Plasmids categorization was done in accordance to the terminology used by Smillie et al. that distinguish mobilizable from conjugative plasmids depending on the presence of a type IV secretion system (T4SS) (Smillie et al. 2010). Homogeneity of the coverage depth of each contig was controlled by mapping the reads from the raw fastq files against the assembly itself using Bowtie2 (v 2.2.6) and IGV (v 2.3) for alignments visualization (Robinson et al. 2011; Langmead and Salzberg 2012).

Pathogenicity island identification was performed using IslandViewer3 (Dhillon et al. 2015). This web based tool associates IslandPick, SIGI-HMM, and IslandPath-DIMOB for pathogenicity islands identification and displays results in circular graphical images (Langille et al. 2008). Input data are *de novo* annotated genomes issued from AGMIAL pipeline.

## Results

### Genome Sequences

Genome sequences are detailed in table 1. Illumina paired end sequencing produced 98.8–99.3% high quality reads covering more than 94% of the reference genome with an average depth of 590 $\times$ Total reads range from 10.9 to 14.5 M per sample. Discarded reads remain scarce, representing 1.1–3.2%

of all reads. SPAdes assembly produced seven genomes with 19–34 contigs and N50 ranging from 167 to 444 kb after removing contigs < 500 pb or with coverage <10×. ABACAS contigs ordering and IMAGE gap closing followed by scaffolding produced seven final genomes with sequence length ranging from 2.4 to 2.6 Mbp with GC content comprised between 33.6% and 33.8%. All genome assemblies shared from 93.7 to 98.9% of their sequence with *S. lugdunensis* N920143.

## Genome Annotations

Annotations reports are displayed in table 1. All strains contain 2373 to 2524 coding sequences (CDS), with 47–60 tRNA, 5–7 rRNA, and 1 tmRNA for each strain. Those results are closed to annotations reports available for the previously sequenced strains. InterProScan identified 63.4–66.2% ontologies among all identified putative proteins Regarding biological process, 49% of GO terms did not belong to any GO slims terms, 17% of proteins were dedicated to metabolic processes, 5% to biosynthetic processes, 5% to carbohydrate metabolic processes and 24% to various other processes. For cellular component 31% were integral membrane proteins, 31% membrane proteins, 23% cytoplasmic, and 15% were from various locations. Finally, regarding molecular functions, 41% of the proteins did not belong to GO slim terms, 12% displayed catalytic activity, 9% were ATP binding proteins, 6% nucleotide binding, 6% DNA binding, and 26% had various molecular functions. Detailed results are displayed in supplementary material part S2, Supplementary Material online.

## Genome Comparisons

All seven genomes were loaded into CSI Phylogeny with the three available genomes and the reference strain as described in the method section. Results are displayed in supplementary material part S3, Supplementary Material online. It shows that the seven strains from VISLISI trial are not isolated in a cluster compared to the strains coming from the literature. VISLISI_21 and FDAARGOS_141 belong to the same cluster, close to VISLISI_25 and a cluster comprising VISLISI_22 and FDAARGOS_143. C33 and VISLISI_37 belong to two separate and distant clusters, as VISLISI_277, VISLISI_33, and HKU09-01 that are closely related.

## Prophage Identifications

PHASTER allowed the identification of four putative prophages in assembled genomes: one prophage in VISLISI_22, two in VISLISI_33, and one in VISLISI_37. Prophage annotations and similarities search with other phages/prophages are displayed in table 2. Those prophages were named $\phi$SL2–$\phi$SL5 due to the existence of a unique prophage in the literature, $\phi$SL1 (Heilbronner et al. 2011). All four prophages displayed quite similar lengths from 44.4 to 53.5 Kb and a GC content from 33.8% to 34.5%. Those characteristics and their modular organization is characteristics of phages from the *Siphoviridae* class according to the classification proposed by Kwan et al. (2005). The five functional modules described in this class of phages are observed in those four annotated sequences: lysogeny, DNA metabolism, DNA packaging, and head, tail, and finally a lysis module that is absent from $\phi$SL4 (Deghorain and Van Melderen 2012). All annotated sequences are flanked by two attachment sites (left and right). The DNA packaging and head module are organized similarly in the four prophages with a small and large subunit of the terminase, then a portal protein followed by a minor head protein, two hypothetical proteins, one scaffold protein, a major head protein and finally a DNA packaging then another minor head protein. The lysis module was absent in $\phi$SL4 but included in the three other strains amidase and holing proteins. In the tail module, $\phi$SL2, 3, and 5 displayed similar ORF product with major tail protein, an endopeptidase and a $Zn^{2+}$ carboxypeptidase. $\phi$SL3 and 5 contain in this module a putative peptidoglycan hydrolase. In the lysogeny module four integrase sequences were identified with the presence of a putative cro-like repressor in $\phi$SL3. Cro repressors work in temperate bacteriophages in opposition to the phage' repressor that controls the genetic switch and determines whether a lytic or lysogenic cycle will happen after infection (Schubert et al. 2007). Virulence factors were not identified in all four sequences.

## Plasmid Identifications

We identified one full plasmid sequence in VISLISI_22 and VISLISI_27, one full plasmid sequence and one partial sequence in VISLISI_33 and two full plasmids sequences in C33. As expected, GC content of the plasmids sequences are lower than *S. lugdunensis*, ranging from 28.7% to 31.8% except pVISLISI3 from VISLISI_33 that display a 33.6% GC content as seen in *S. lugdunensis* (Shintani et al. 2015). The plasmid sizes range from 3,310 to 12,579 bp, what is usually observed in firmicutes plasmids (Shintani et al. 2015). Results are displayed in table 2.

## Pathogenicity Island Identifications

All seven annotated genomes were loaded into Island Viewer3 but fail to identify any pathogenicity island in all sequences. Several putative genomic islands were identified with IslandPath-DIMOB that search for genes that are functionally related to mobile elements but IslandPick and SIGI-HMM failed to identify such motifs. IslandPick is a tool that identifies putative genomic islands using comparative methods considering related species and already known genomic islands. SIGI-HMM is a prediction method that uses a Hidden Markov Model and measures codon usage. After careful examination of each genomic region signaled by IslandPath-DIMOB, we confirm the absence of any pathogenicity island in our seven assembled genomes of *S. lugdunensis*.

**Table 2**

Prophages and Plasmids Identification after Whole-Genome Sequencing of *Stpahylococcus lugdunensis*

| | Plasmids | | | | | Prophages | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Name** | ***pVISLISI_1*** | ***pVISLISI_2*** | ***pVISLISI_3*** | ***pVISLISI_4*** | ***pVISLISI_5*** | ***ϕSL2*** | ***ϕSL3*** | ***ϕSL4*** | ***ϕSL5*** |
| Host | VISLISI_22 | VISLISI_27 | VISLISI_33 | C33 | C33 | VISLISI_22 | VISLISI_33 | VISLISI_33 | VISLISI_37 |
| Genome size (kb) | 3.1 | 6.5 | 4.3 | 7 | 12.6 | 49.4 | 44.4 | 53.5 | 47 |
| GC content (%) | 29.9 | 31.8 | 33.6 | 31.11 | 28.7 | 34.3 | 33.8 | 34.4 | 34.9 |
| CDS | 3 | 7 | 5 | 6 | 13 | 66 | 59 | 52 | 65 |
| Virulence factor | None | None | None | None | None | None | None | None | None |
| Resistance gene | *cadD* | None | None | None | None | None | None | None | None |
| Related phage | — | — | — | — | — | StB12 (*S. hominis*) | StB12 (*S. hominis*) | PH15 (*S. epidermidis*) | StB12 (*S. hominis*) |
| Shared proteins | — | — | — | — | — | 23 | 23 | 13 | 29 |
| Replication gene | *repL* | *repE* | *repL* | *repE* | *repA* | — | — | — | — |
| Mobilization module | None | MOBc | MOBc | None | MobA/MobL | — | — | — | — |
| T4CP/T4SS genes | None | None | None | None | None | — | — | — | — |
| Plasmid category | Nonmobilizable | Mobilizable | Mobilizable | Nonmobilizable | Mobilizable | — | — | — | — |
| Related plasmid (strain, nucleotide length, CDS) | pLUG 10 (*S. lugdunensis*, 3117 bp, 3CDS) | SAP108B (*S. epidermidis*, 6206 bp, 7 CDS) | pRIVM6519_1 (*S. aureus*, 4264 bp, 6 CDS) | PM221 p-3 (*S. epidermidis*, 11252 bp, 17) | VRSAp (*S. aureus*, 25107 bp, 30) | — | — | — | — |
| Nucleotide similarities: | | | | | | | | | |
| Sequence cov (%) | 98 | 97 | 100 | 41 | 44 | — | — | — | — |
| Identities (%) | 98 | 97 | 100 | 94 | 91 | | | | |
| *E*-value | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | | | |

NOTE.—kb, kilo bases; CDS, number of coding sequences; cov, coverage.

## Discussion

The whole-genome sequencing of seven strains of *S. lugdunensis* reveal several unexpected characteristics for this virulent CoNS which clinical significance is probably close to *S. aureus*. The core genome of staphylococci is well conserved and nearly 80% of coding sequences from *S. lugdunensis* have reciprocal FASTA matches with *S. aureus* or other CoNS (Heilbronner et al. 2011). Conservation between *S. lugdunensis* strains was expected to be high and this study shows that 94–99% of this genome is conserved in comparison to the actual reference genome available from strain N920143. We identified several mobile genetic elements. Regarding phages, their description in CoNS remain scarce compared to *S. aureus* and if their relationship with *S. aureus* phages was suggested with the characterization of StB12, StB20, and StB27 the possibility of direct genetic transfer *in vivo* from *S. aureus* to CoNS was not proven (Deghorain et al. 2012). Our study identified four new prophages in the seven sequenced strains using computational approaches. Those prophages belong as expected to the *Siphoviridae* family with a GC content close to their host and a usual modules organization (Deghorain and Van Melderen 2012). We did not identify any virulence factor in the CDS but it is of interest to note that the closest prophages sequence from $\phi$SL4 of VISLISI_33 come from two phages: PH15 from *S. epidermidis* and 187 from *S. aureus*, sharing, respectively, 13 and 12 proteins, respectively, supporting the existence of reciprocal exchange between phages originating from *S. aureus* and *S. lugdunensis* (Kwan et al. 2005; Daniel et al. 2007). This observation is of high importance because even if we did not identify any pathogenicity islands in our genome assemblies this sort of MGE in *S. aureus* are supported by phage helper sequences which provide the genetic machinery for their horizontal transfer (Novick et al. 2010). The *in silico* approach for prophage sequences identification in bacteria is a promising tool and will probably show that phages are not only widespread in *S. aureus*, but also in CoNS, providing them a fundamental tool to evolve and adapt themselves to the environment for example in hospital settings (Xia and Wolz 2014). Plasmids play a major role particularly in bacteria for horizontal genetic transfers such as for antibiotic resistance genes particularly in *Firmicutes* where extrachromosomal replicons are frequently involved in the transmission of antibiotics resistance genes (Shintani et al. 2015). Most of the plasmids described in Staphylococci belong to *S. aureus* (European Nucleotide Archive 2016). *S. epidermidis* has been the most studied CoNS regarding its pathogenicity and up to now, 21 plasmids have been identified. The second CoNS coming after in terms of known plasmids are *S. haemolyticus* and *S. simulans* with five known plasmids. Regarding *S. epidermidis*, the transfer of MGE from *S. epidermidis* to *S. aureus* have been frequently described but in return *S. aureus* did not seem able to transfer genetic material to CoNS (Otto 2009). Nevertheless, the description of a pathogenicity island like regions bearing enterotoxin gene in *S. epidermidis* might suggest the possibility of such events (Madhusoodanan et al. 2011; Méric et al. 2015). Surprisingly, we identified in our study the plasmid pVISLISI_3 (strain VISLISI_33) that has 100% homologies with pRIVM_1, a *S. aureus* plasmid of 4,264 bp, and a second plasmid pVISLISI_5 (strain C33) covering nearly half of the sequence of VRSAp, another *S. aureus* plasmid of 25,107 bp. Those data are limited by the computational approach used to get them, but this emphasizes the need to extend the search of the ability of *S. aureus* to transfer genetic materials to CoNS, an eventuality of the highest importance owing to the capacity of this strain to bear virulence factors on MGE.

Finally, this study allows the identification of several putative mobile genetic elements as prophages and plasmids in a virulent CoNS, *S. lugdunensis*. It did not allow the identification of virulence factors other than already described, but the prophages and plasmids we describe here are important to consider horizontal gene transfer, potentially from *S. aureus* to *S. lugdunensis* as a way for these commensal bacteria to gain its pathogenicity. It reveals the central role than could play NGS for a rapid detection of those MGE. We believe that underrepresentation of those MGE in CoNS compare to *S. aureus* might change rapidly with those fast and reliable methods with a decreasing cost. It cannot replace direct identification of plasmids or prophages, because finding a gene does not mean that this gene will be expressed and how, but this provides a significant gain of time for future research.

## Supplementary Material

Supplementary data are available at *Genome Biology and Evolution* online.

## Author contributions

X.A., Y.H., P.R., and G.P. designed the experiment, X.A. assembled the genomes, V.M. and V.L. annotated the genomes, N.P. performed ontologies analyses, S.D., J.L., M.M., and A.G. analyzed whole genomic data, D.K. performed DNA extractions, A.V. assisted for data format manipulations.

## Acknowledgments

This work was funded by grants from the Collège des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT), from EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Faculté de Médecine, Strasbourg and supported both by the University Hospital of Strasbourg and Public funding of EA7290.

## Literature Cited

Argemi X, et al. 2015. Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin Microbiol. 53:2030–2036.

Argemi X, et al. 2016. VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*. Clin Microbiol Infect. doi: 10.1016/j.cmi.2016.12.018.
Arndt D, et al. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 44:W16–W21.
Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. 2009. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. Bioinformatics 25:1968–1969.
Babu E, Oropello J. 2011. *Staphylococcus lugdunensis*: the coagulase-negative staphylococcus you don't want to ignore. Expert Rev Anti Infect Ther. 9:901–907.
Bankevich A, et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 19:455–477.
Bryson K, et al. 2006. AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system. Nucleic Acids Res. 34:3533–3545.
Carattoli A, et al. 2014. *In silico* detection and typing of plasmids using plasmid finder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 58:3895–3903.
Carver T, et al. 2008. Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. Bioinformatics 24:2672–2676.
Che D, Hasan MS, Chen B. 2014. Identifying pathogenicity islands in bacterial pathogenomics using computational approaches. Pathogens 3:36–56.
Daniel A, Bonnen PE, Fischetti VA. 2007. First complete genome sequence of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages. J Bacteriol. 189:2086–2100.
Deghorain M, et al. 2012. Characterization of novel phages isolated in coagulase-negative staphylococci reveals evolutionary relationships with *Staphylococcus aureus* phages. J Bacteriol. 194:5829–5839.
Deghorain M, Van Melderen L. 2012. The Staphylococci phages family: an overview. Viruses 4:3316–3335.
Delaunay F, Pegot A, Coquerel-Beghin D, Aktouf A, Auquit-Auckbur I. 2014. *Staphylococcus lugdunensis* necrotizing fasciitis after abdominal dermolipectomy: report of two cases and review of the literature. Ann Chir Plast Esthet. 59:136–139.
Dhillon BK, et al. 2015. IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. Nucleic Acids Res. 43:W104–W108.
Douiri N, et al. 2016. *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections. Clin Microbiol Infect. 22:747–748.
European Nucleotide Archive. 2016. Genomes pages: plasmid [cited 2016 Sep 29] Available from: http://www.ebi.ac.uk/genomes/plasmid.html
Heilbronner S, et al. 2011. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence. FEMS Microbiol Lett. 322:60–67.
Heilbronner S, Monk IR, Foster TJ. 2013. The phage integrase vector pIPI03 allows RecA-independent, site-specific labelling of *Staphylococcus lugdunensis* strains. Plasmid 70:377–384.
Hung T, Zaghi S, Yousefzadeh J, Leibowitz M. 2012. Necrotizing fasciitis associated with *Staphylococcus lugdunensis*. Case Rep Infect Dis. 2012:453685.
Jones P, et al. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics 30:1236–1240.
Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. 2014. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. PLoS One 9:e104984.
Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. 2005. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:5174–5179.
Langille MG, Hsiao WW, Brinkman FS. 2008. Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. BMC Bioinformatics 9:329.
Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 9:357–359.
Madhusoodanan J, et al. 2011. An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. J Bacteriol. 193:1854–1862.
Malachowa N, DeLeo FR. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci. 67:3057–3071.
McCarthy AJ, Lindsay JA. 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. BMC Microbiol. 12:104.
Méric G, et al. 2015. Ecological overlap and horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Genome Biol Evol. 7:1313–1328.
Nanoukon C, et al. 2016. Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. Int J Med Microbiol. 307:75–82.
NCBI. Genomes. NCBI [cited 2016 Sep 29]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/2548?
Novick RP, Christie GE, Penadés JR. 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. Nat Rev Microbiol. 8:541–551.
Otto M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins. Curr Opin Microbiol. 17:32–37.
Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*: the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 7:555–567.
Pareja J, Gupta K, Koziel H. 1998. The toxic shock syndrome and *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia. Ann Intern Med. 128:603–604.
Poitevin-Later F, Vandenesch F, Dyke K, Fleurette J, Etienne J. 1992. Cadmium-resistance plasmid in *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol Lett. 78:59–63.
Robinson JT, et al. 2011. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol. 29:24–26.
Sabe MA, Shrestha NK, Gordon S, Menon V. 2014. *Staphylococcus lugdunensis*: a rare but destructive cause of coagulase-negative staphylococcus infective endocarditis. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care 3:275–280.
Sato'o Y, Omoe K, Ono HK, Nakane A, Hu D-L. 2013. A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. Microbiol Immunol. 57:91–99.
Schubert RA, Dodd IB, Egan JB, Shearwin KE. 2007. Cro's role in the CI-Cro bistable switch is critical for λ's transition from lysogeny to lytic development. Genes Dev. 21:2461–2472.
Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. 2015. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Front Microbiol. 6:242.
Smillie C, et al. 2010. Mobility of plasmids. Microbiol Mol Biol Rev. 74:434–452.
Swain MT, et al. 2012. A post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. Nat Protoc. 7:1260–1284.
Tsai IJ, Otto TD, Berriman M. 2010. Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps. Genome Biol. 11:R41.
Woznowski M, et al. 2010. Fulminant *Staphylococcus lugdunensis* septicaemia following a pelvic varicella-zoster virus infection in an immune-deficient patient: a case report. Eur J Med Res. 15:410–414.
Xia G, Wolz C. 2014. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. 21:593–601.
Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: a fast phage search tool. Nucleic Acids Res. 39:W347–W352.

**Associate editor:** Howard Ochman

**Supplementary material part 1**

**SPAdes genome assembler parameters:** software was run through Galaxy server from INRA (Galaxy Migale, INRA, Jouy en Josas, France) with the following parameters:
Single cell project
Read error correction: ON
Careful correction: ON
K-mer choices: 21, 33 and 55
Library type: paired end reads

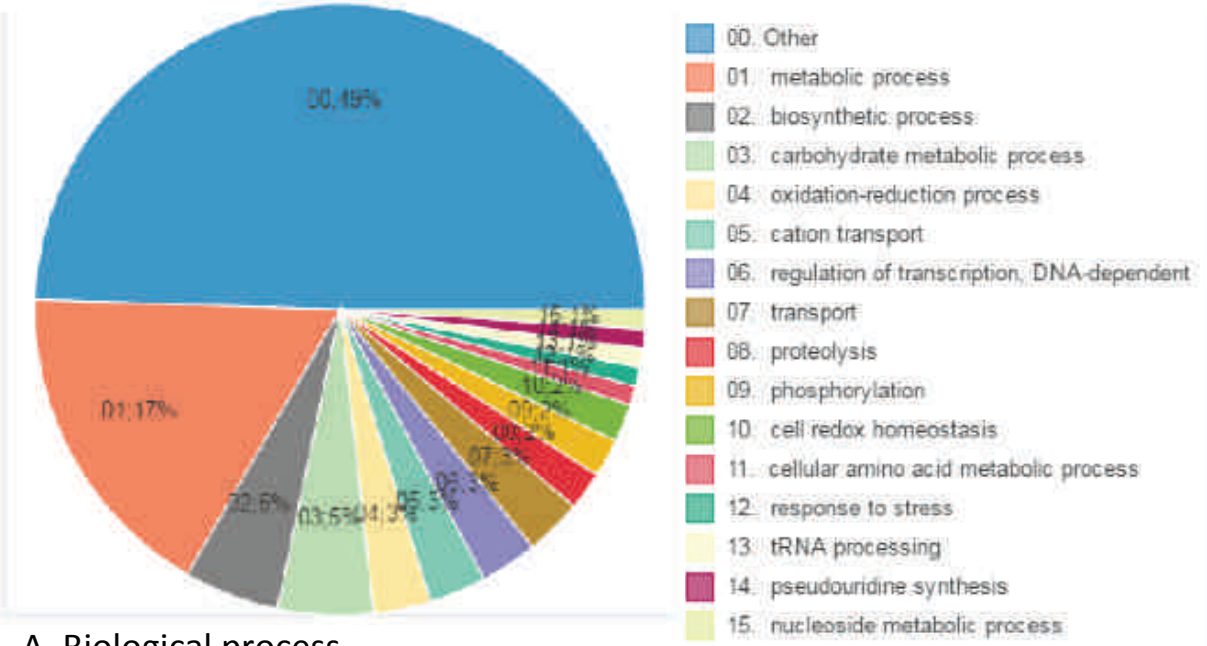
**ABACAS** was used for mapping and ordering contigs to the reference *S. lugdunensis* N920143 (NCBI reference sequence NC_017353.1). Following command line was used:
« perl $PAGIT_HOME/ABACAS/abacas.pl -r N920143.fasta –q assembly.fasta -p nucmer -m –b –o VISLISI_prefix –v 30 »

**IMAGE** was used for gap closing and scaffolding. Following command lines was used for gap closing:
« perl $PAGIT_HOME/IMAGE/image.pl -scaffolds orderedcontigs.fasta -prefix pairedendReadsPart -iteration 1 -all_iteration 9 -dir_prefix ite –kmer 55 »
Gap closing was improved when necessary using a range of different kmers (31, 51, 71, 91) and successive iterations.
Following command line was used for scaffolding with the resulting files:
« perl $PAGIT_HOME/IMAGE/contigs2scaffolds.pl gap_closedfile.fa gap_closedfile.placed 300 0 scaffolds »

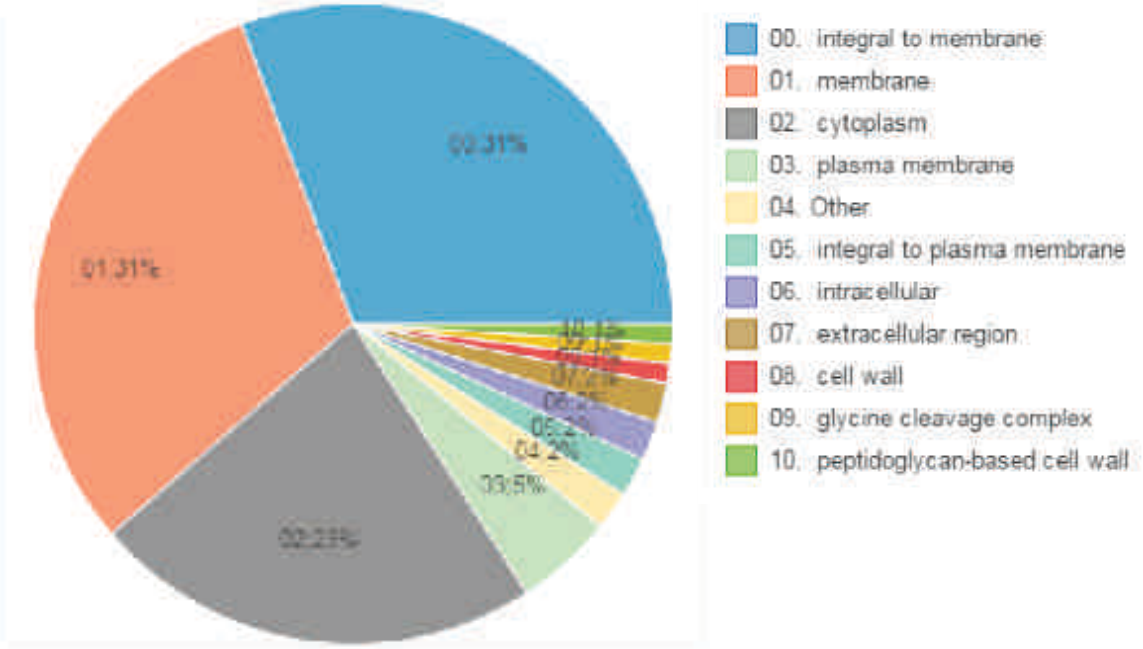
**CSI phylogeny** web based tool parameters to produce phylogenic trees :
minimum depth at SNP position : 10x ; minimum relative depth at SNP position : 10% ; minimum distance between SNP : 10 bp ; minimum SNP quality : 30 ; minnimum read mapping quality 25 ; minimum Z score : 1.96.

**Supplementary material part 2**

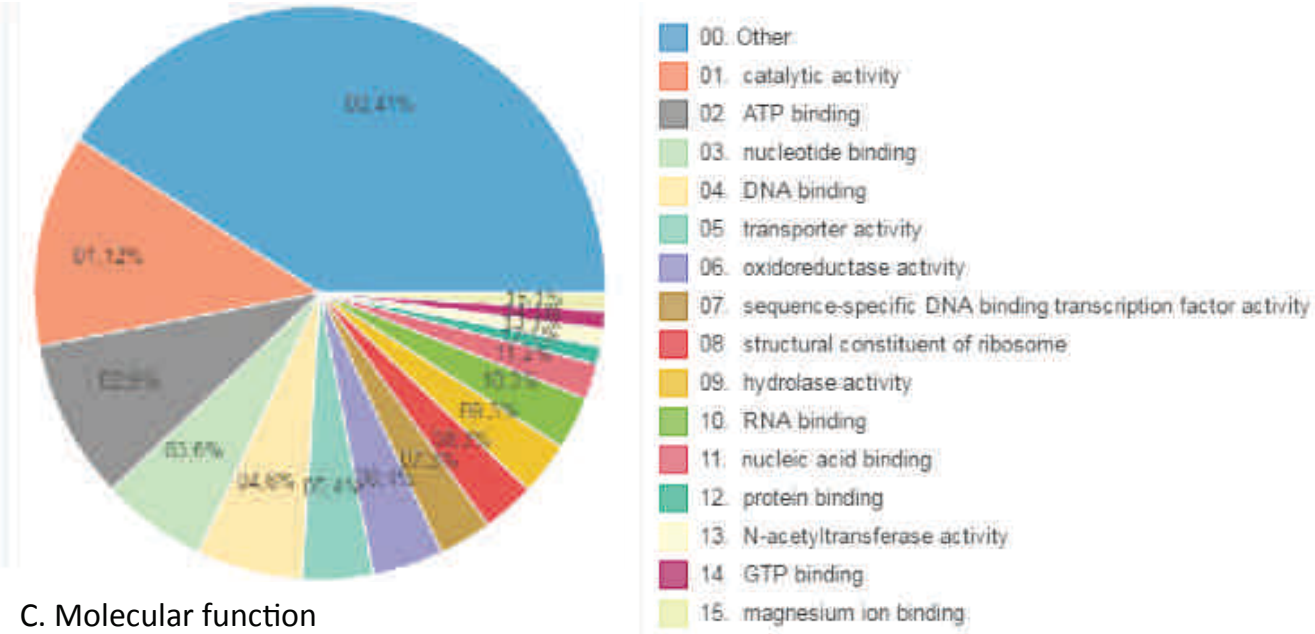
Gene ontology slims from *Staphylococcus lugdunensis* genome after InterProScan analysis of annotated gene files. Ontologies are based on the 3 classes defined by the gene ontology consortium: biological process (Panel A), cellular component (Panel B) and molecular function (panel C).



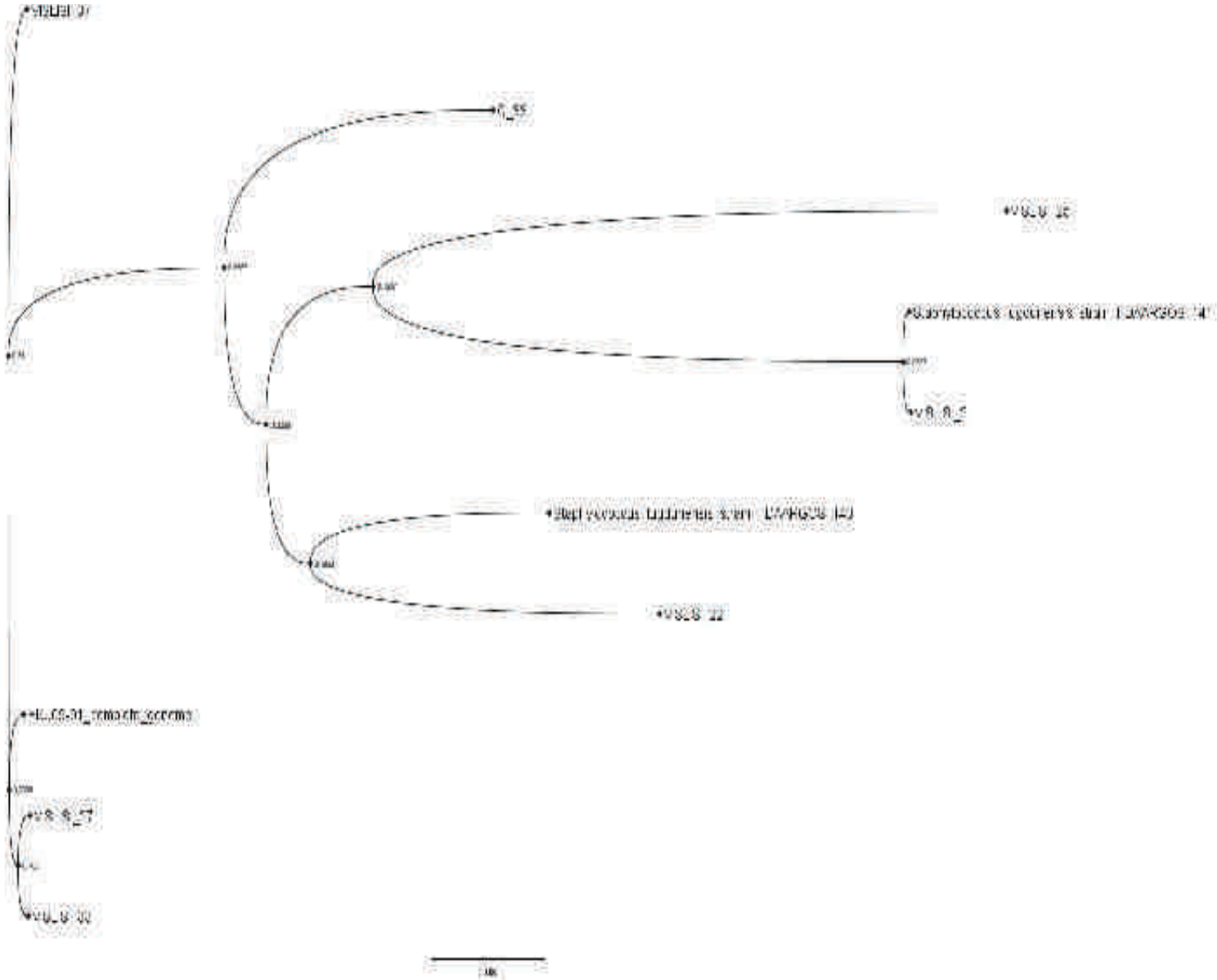

A. Biological process




B. Cellular component




C. Molecular function



Phylogenic tree of 7 strains of *Staphylococcus lugdunensis* and 3 other available genomes compared to a published *S. lugdunensis* genome, strain N920143 (NCBI Reference Sequence: NC_017353.1). Phylogenic relationships are based on concatenated alignment of the high quality single nucleotide polymorphisms (CSI Phylogeny, online web tool, Center for Genomic Epidemiology). The 7 strains from VISLISI trial are not isolated in a cluster compared to the strains coming from the literature. VISLISI_21 and FDAARGOS_141 belong to the same cluster as VISLISI_22 and FDAARGOS_143 and VISLISI_33, VISLISI_27 along with HKU09-1.

**Résultats supplémentaires non publiés de l'article 6**

## 1. Analyses qualitatives des séquençages Illumina

Nous avons initialement séquencé 10 souches, mais une séquence n'est pas exploitable, celle issue de la souche C_34, car contaminée par de l'ADN exogène et les données ne sont pas fiables. Deux autres séquences sont en cours d'analyse, mais l'assemblage pose encore problème sur le plan bioinformatique, ce sont les souches C_47 et VISLISI_38. Néanmoins, les analyses qualitatives des séquences brutes sont disponibles pour les 10 souches séquencées et sont présentés dans le Tableau A et B suivant.

**Tableau A.** Qualité de séquençage Illumina de chaque souche. (Données produites par le prestataire GATC Biotech).

| Sample Name | Total Reads | Discarded Reads | Clean Reads (single) | Total HQ Reads |
|---|---|---|---|---|
| C33 | 14,524,434 | 127,784 (0.9%) | 6,222 (0.0%) | 14,390,428 (99.1%) |
| C34 | 27,698,942 | 667,940 (2.4%) | 30,958 (0.1%) | 27,000,044 (97.5%) |
| C47 | 21,185,210 | 251,344 (1.2%) | 75,164 (0.4%) | 20,858,702 (98.5%) |
| VISLISI_21 | 10,967,786 | 346,462 (3.2%) | 10,774 (0.1%) | 10,610,550 (96.7%) |
| VISLISI_22 | 17,755,730 | 111,382 (0.6%) | 5,872 (0.0%) | 17,638,476 (99.3%) |
| VISLISI_25 | 11,230,804 | 117,764 (1.0%) | 6,072 (0.1%) | 11,106,968 (98.9%) |
| VISLISI_27 | 12,471,056 | 140,604 (1.1%) | 6,826 (0.1%) | 12,323,626 (98.8%) |
| VISLISI_33 | 12,410,494 | 136,350 (1.1%) | 7,836 (0.1%) | 12,266,308 (98.8%) |
| VISLISI_37 | 12,484,918 | 87,708 (0.7%) | 4,772 (0.0%) | 12,392,438 (99.3%) |
| VISLISI_38 | 17,938,468 | 1,501,234 (8.4%) | 24,656 (0.1%) | 16,411,578 (91.5%) |

**Tableau B.** Pourcentage d'alignement des reads de chaque séquence produite par rapport à la référence *S. lugdunensis* N920143. (Données produites par le prestataire GATC Biotech).

| Sample Name | Total HQ Reads | Mapped Reads |
|---|---|---|
| C33 | 14,390,428 | 12,236,853 (85.03%) |
| C34 | 27,000,044 | 13,250,570 (49.08%) |
| C47 | 20,858,702 | 19,454,070 (93.27%) |
| VISLISI_21 | 10,610,550 | 9,999,799 (94.24%) |
| VISLISI_22 | 17,638,476 | 17,023,302 (96.51%) |
| VISLISI_25 | 11,106,968 | 10,756,057 (96.84%) |
| VISLISI_27 | 12,323,626 | 10,860,948 (88.13%) |
| VISLISI_33 | 12,266,308 | 10,002,078 (81.54%) |

L'objectif initial était de produire des séquences fiables ayant donc une couverture de séquençage suffisante fixée à 150 minimum par souche. Ce paramètre peut s'analyser en étudiant le nombre de reads moyens couvrant le génome de référence pour chaque souche séquencée. Ces données sont représentées dans la Figure A.

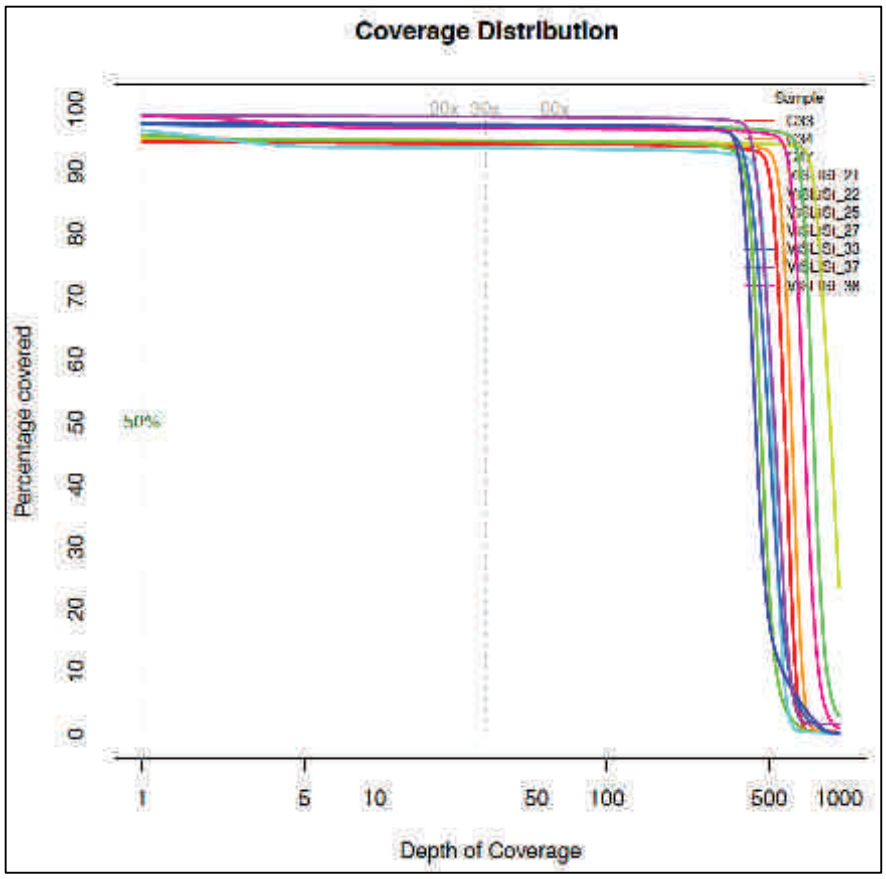
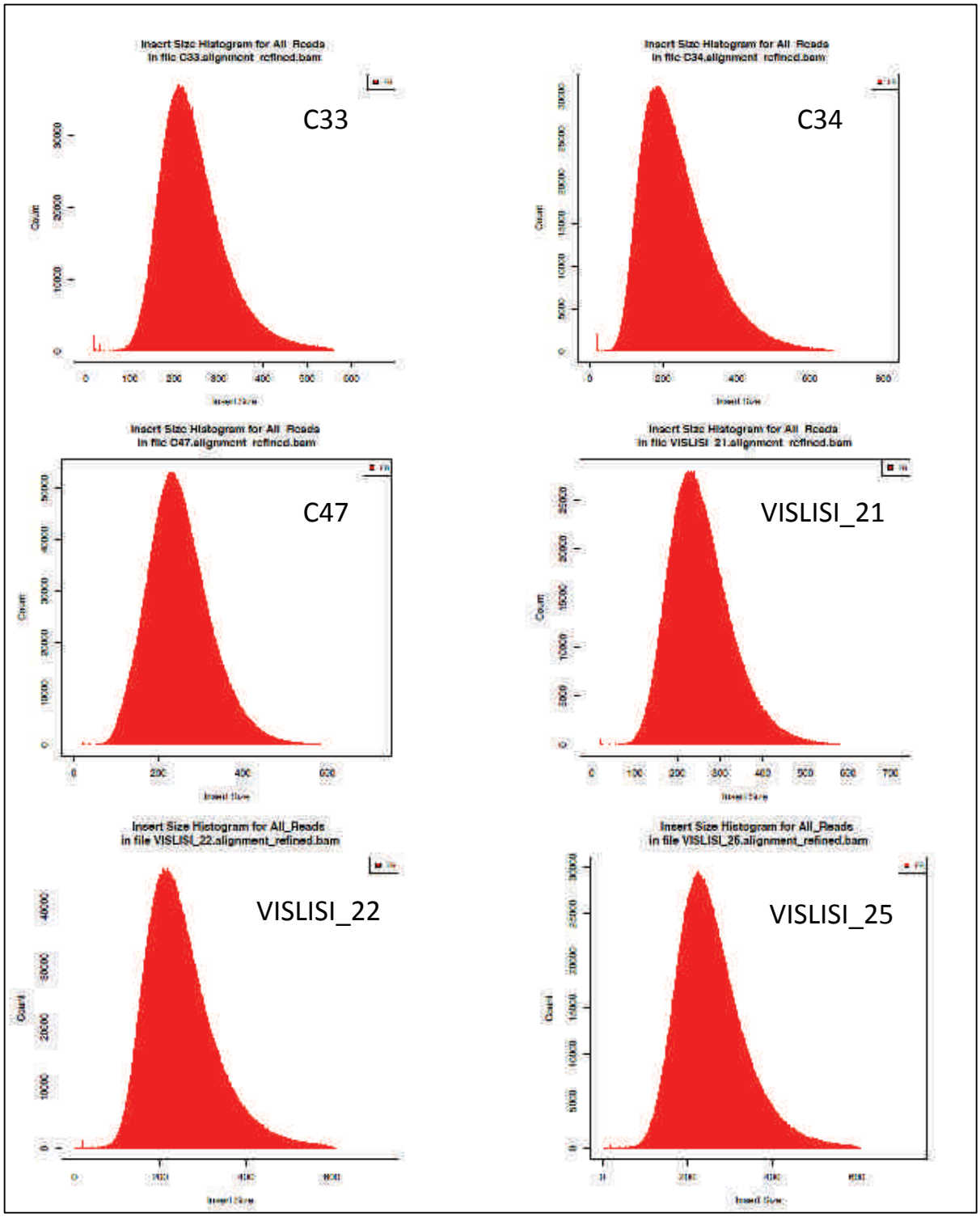



**Figure A.** Profondeur de séquençage et couverture de la référence *S. lugdunensis* N920143. (Données produites par le prestataire GATC Biotech).

Enfin, nous avons déterminé une longueur de reads nécessaires, fixée à 125 pb aboutissant à des fragments moyens potentiellement longs de 250 pb dans le cadre d'un séquençage par pair. Ce paramètre est aussi évalué pour chaque souche dans la Figure B.


Insert Size Histogram for All_Reads
in file C33.alignment_refined.bam
C33
Insert Size Histogram for All_Reads
in file C34.alignment_refined.bam
C34
Insert Size Histogram for All_Reads
in file C47.alignment_refined.bam
C47
Insert Size Histogram for All_Reads
in file VISLISI_21.alignment_refined.bam
VISLISI_21
Insert Size Histogram for All_Reads
in file VISLISI_22.alignment_refined.bam
VISLISI_22
Insert Size Histogram for All_Reads
in file VISLISI_25.alignment_refined.bam
VISLISI_25

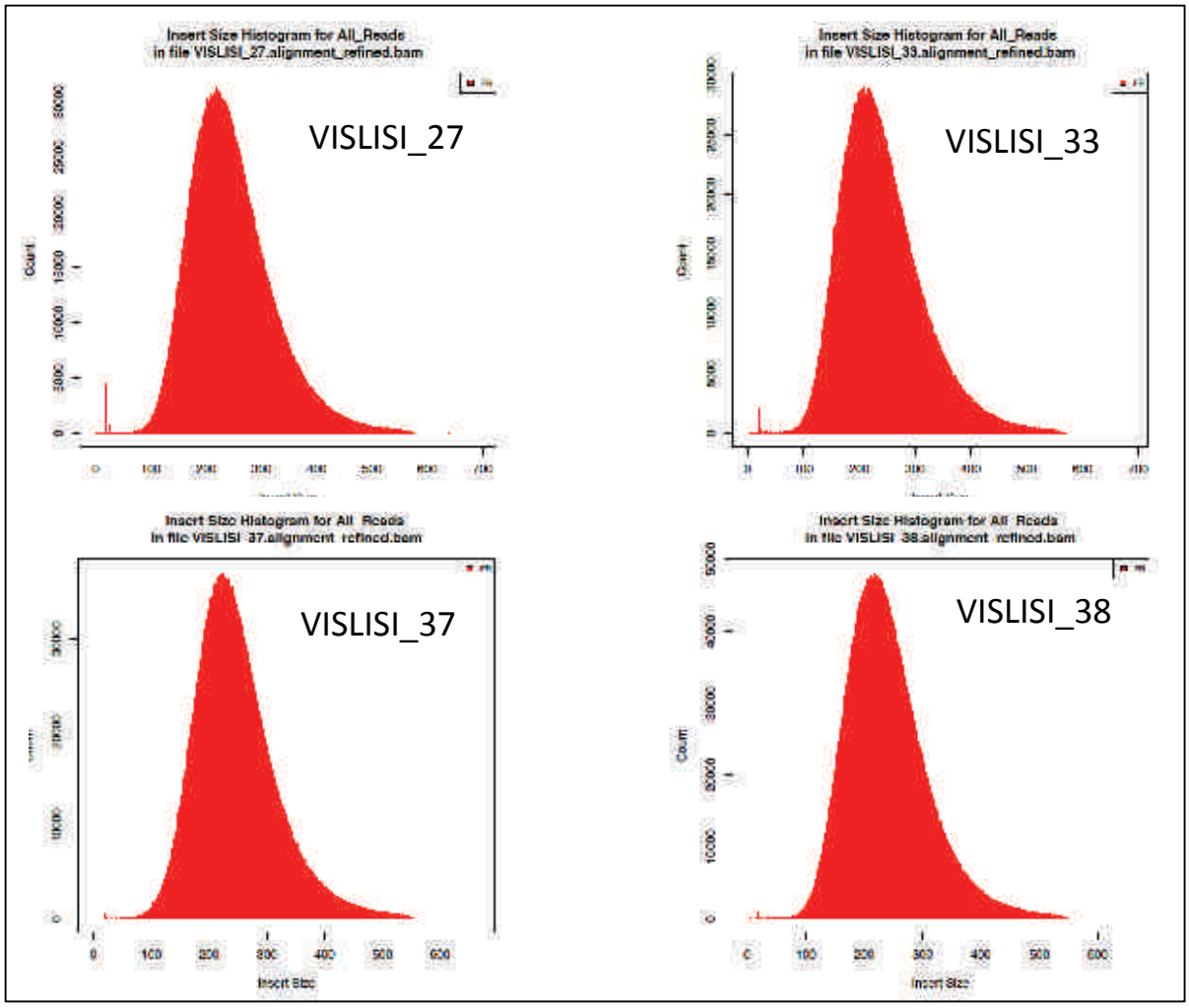



**Figure B.** Dispersion de la longueur des fragments issus d'un séquençage par pair pour chaque souche. (Données produites par le prestataire GATC Biotech).

## 2. Alignement des assemblages

Nous avons réalisé dans la Figure C un alignement des séquences assemblées avec la séquence de référence N920143 (référence NCBI : NC_017353.1) à l'aide du logiciel BRIG, BLAST Ring Image Generator (v 0.95) qui permet de produire des alignements de séquences circularisées. Comme nous l'avons décrit dans la publication ces génomes partagent 93 à 99% de leur séquence avec le génome N920143. Les zones non partagées du génome apparaissent dans la figure comme des zones blanches.

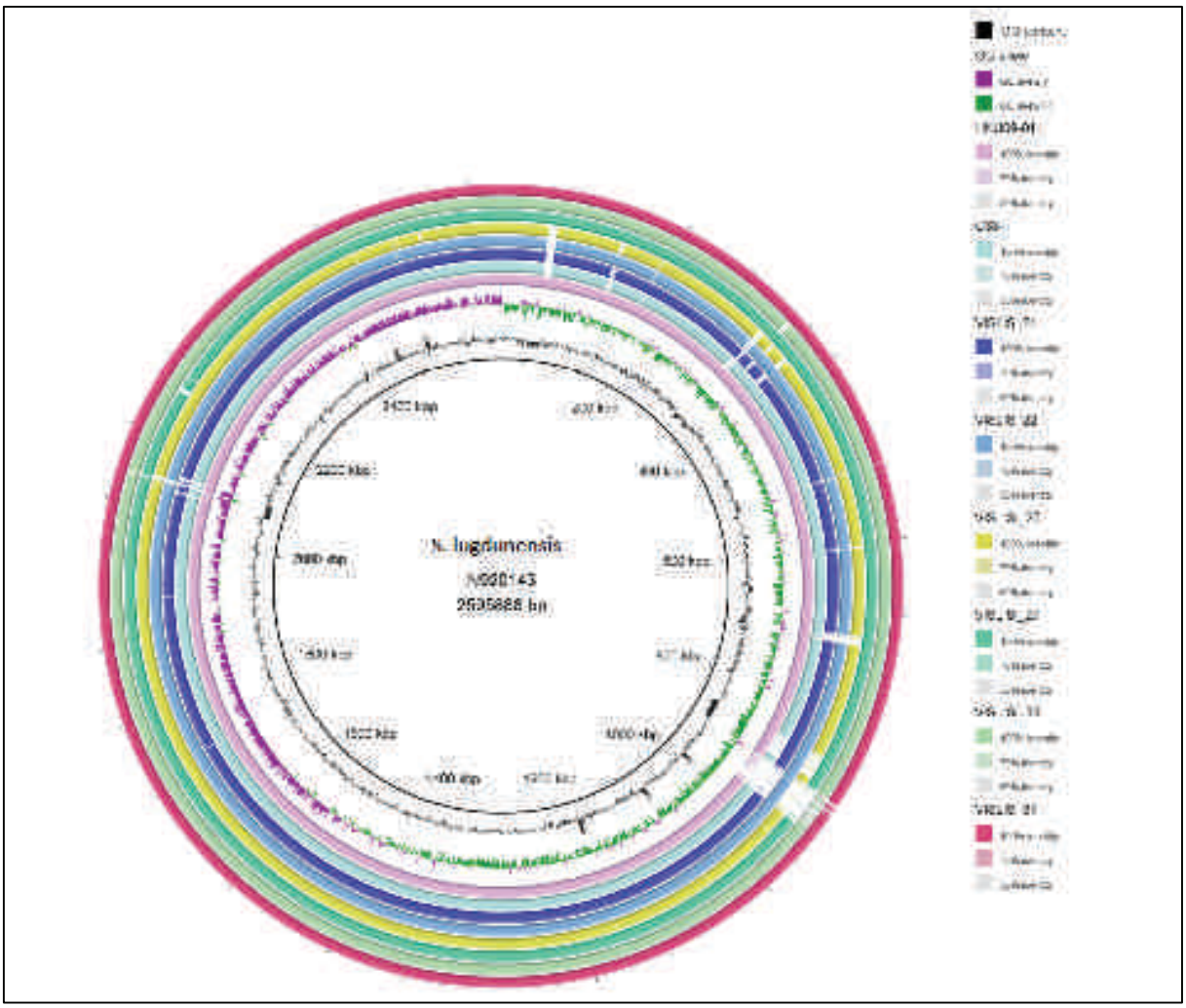



**Figure C.** Alignement de 7 génomes de *S. lugdunensis* issus de l'étude VISLISI et du génome HKU09-01, sur le génome de référence N920143.

### 3. Représentation des plasmides

Nous avons idéntifié 5 séquences plasmidiques potentielles dans les 7 génomes de *S. lugdunensis* issus de l'étude VISLISI. Nous avons pu annoter ces séquences et les aligner avec les plasmides connus les plus proches à l'aide du logiciel BRIG décrit ci dessus (Figure D).

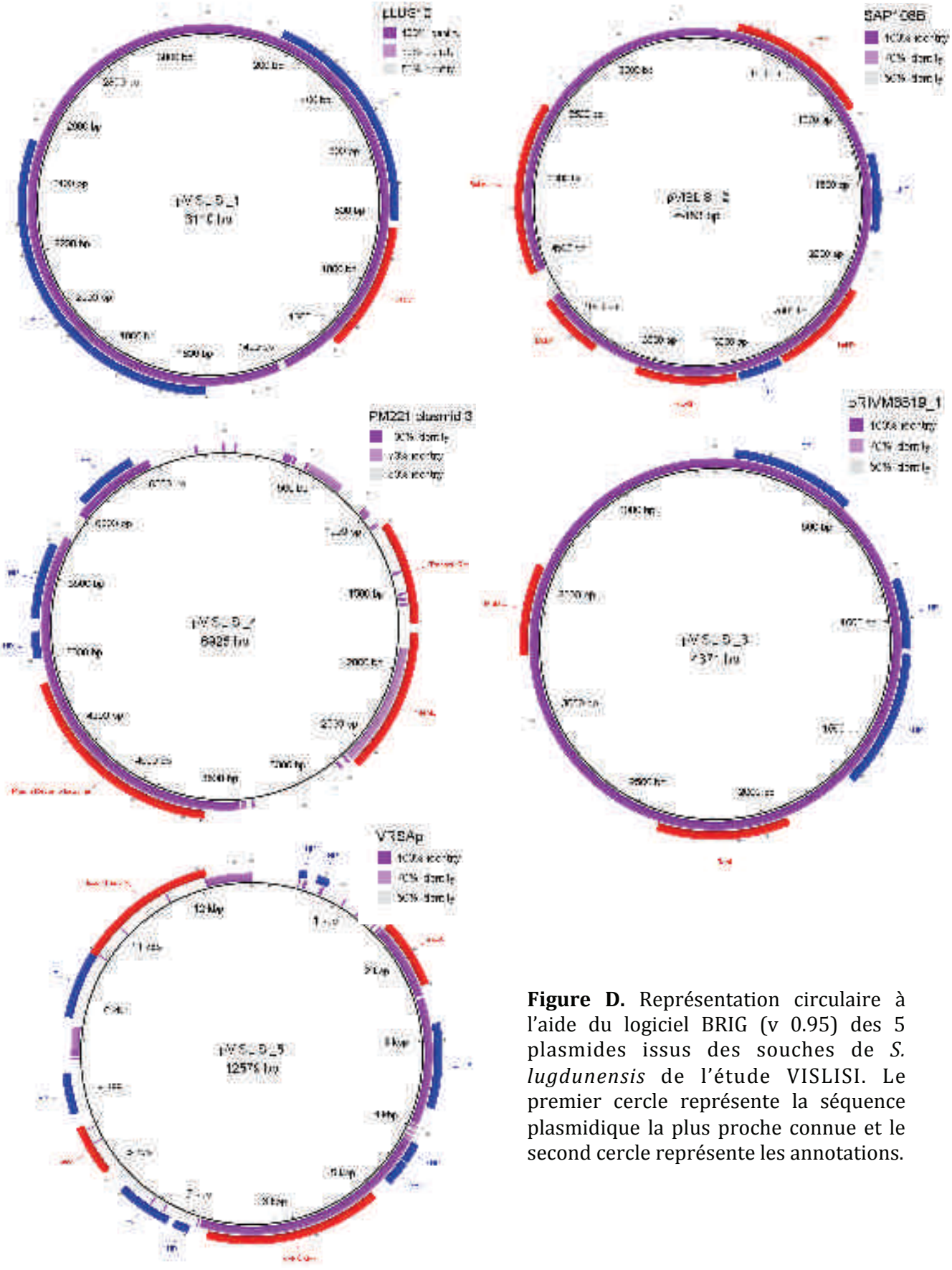


**Figure D.** Représentation circulaire à l'aide du logiciel BRIG (v 0.95) des 5 plasmides issus des souches de *S. lugdunensis* de l'étude VISLISI. Le premier cercle représente la séquence plasmidique la plus proche connue et le second cercle représente les annotations.

# IV. Discussion

## A. Synthèse des résultats et des perspectives de travail

Cette étude de la virulence de *S. lugdunensis* menée dans le cadre d'une approche translationnelle a permis d'apporter une réponse à la question formulée initialement :

*S. lugdunensis* sécrète une métalloprotéase (la lugdulysine) possiblement impliquée dans la survenue d'infections ostéeo-articulaires.

Dans le cadre des objectifs secondaires de ce travail nous pouvons formuler d'autres conclusions :

- *S. lugdunensis* présente une pathogénicité tout à fait exceptionnelle au sein des SCN.

- *S. lugdunensis* est principalement responsable d'infections ostéo-articulaires en particulier sur matériel.

- Il s'agit d'une bactérie commensale mais opportuniste qui devient pathogène en cas de rupture de la barrière cutanée, de pose de matériel étranger et chez les patients diabétiques.

- Le niveau de résistance aux antibiotiques de *S. lugdunensis* est quasi nul.

- *S. lugdunensis* est porteur d'un grand nombre d'éléments génétiques mobiles, mais qui ne semblent pas être les vecteurs de facteurs de virulence connus.

Ce travail a donc des conséquences cliniques déjà envisageables et ouvre des perspectives de travail à plusieurs niveaux :

Conséquences cliniques applicables :

- *S. lugdunensis* doit être considéré comme une bactérie virulente et la présence d'un seul prélèvement positif dans un prélèvement profond ne doit pas être interprété à priori comme une contamination, une colonisation, jusqu'à preuve du contraire.

- Il faut interpréter avec plus de prudences les prélèvements venant des zones de portage naturel de *S. lugdunensis* : pli inguinal, creux axillaire, nez

- L'antibiothérapie dans le cadre de changements de matériels prothétiques infectés à *S. lugdunensis* doit être per-opératoire et immédiate afin d'éviter la formation rapide de biofilm.

Perspectives cliniques :

- La recherche rapide de la sécrétion de lugdulysine dans les prélèvements cliniques comme un prélèvement ostéoarticulaire ou prothétique peut-elle changer l'interprétation qui en faite ?

- Quels antibiotiques pourraient prévenir la formation de biofilm ?

- Existent-ils des inhibiteurs de cette protéase qui auraient un intérêt thérapeutique ?

Perspectives plus fondamentales :

- Quels sont les substrats d'hydrolyse de la lugdulysine ?

- Sa virulence se confirme-t-elle sur un modèle animal ?

- L'utilisation de la spectrométrie de masse avec des fenêtres supérieures à 20000 Da permet-elle d'identifier des « clusters virulents » voir même d'identifier des protéines d'intérpêt comme la lugduysine ?

- Les éléments génétiques mobiles portés par *S. lugdunensis* sur le plan génétique sont-ils exprimés ?

- Existe-t-il un transfert de matériel *de S. aureus* vers *S. lugdunensis* ?

## B. *Staphylococcus lugdunensis* et infections ostéo articulaires

### 1. Rôle de la lugdulysine et des facteurs d'adhésion

La découverte d'une protéase et d'une association statistiquement significative avec les infections ostéo-articulaires ne démontre pas formellement l'existence d'un lien de causalité. La littérature permet néanmoins d'éclairer favorablement cette hypothèse. La physiopathologie des infections ostéo-articulaires est particulièrement bien explorée chez *S. aureus*. James E. Cassat et ses collaborateurs ont pu démontrer le rôle joué par l'auréolysine, une métalloprotéase sécrétée par *S. aureus* [151]. Cette protéase n'a pas un rôle direct dans le remodelage osseux, mais elle agit comme un régulateur de l'expression des autres facteurs ayant eux un rôle dans le remodelage osseux. Sa sécrétion est sous la dépendance du locus *Sae* qui, comme *Agr,* qui est un régulateur de la sécrétion des facteurs de virulence de *S. aureus*. Dans ce travail, les auteurs ne décrivent pas le mécanisme par lequel l'auréolysine agit sur les autres facteurs de virulence, mais elle apparaît comme un co-régulateur étroitement associé à *Sae.* Le rôle direct des métalloprotéases dans le remodelage osseux est aussi décrit dans plusieurs modèles *in vitro* et de souris comme pour la protéases M10.0013 (selon la nomenclature de la base de données MEROPS), une métalloprotéase sécrétée chez la souris [181–183][184][185,186].

Remarquons par ailleurs que les nombreux facteurs d'adhésion identifiés chez *S. lugdunensis* participent probablement aussi à l'émergence d'infections ostéo-articulaires. Chez *S. aureus*, les facteurs d'adhésion à la matrice extracellulaire osseuse constituent la première étape indispensable à l'établissement d'une infection au niveau de ce tissus particulier, où la bactérie une fois fixée peut pénétrer dans le cytoplasme des ostéoblastes, échapper en grande partie au système immunitaire et entrainer une cascade de dégradation/synthèse de la matrice osseuse dans un contexte inflammatoire locorégional propice à l'apport de nutriments [187].

### 2. Diabète, biofilm et infections ostéo-articulaires

Le diabète est une comorbidité observée fréquemment dans la littérature chez les patients ayant présenté une infection ostéo-articulaire à *S. lugdunensis* et notre étude

prospective le confirme, car cette pathologie affecte presque 50% des patients ayant présenté une infection ostéo-articulaire. Le lien entre diabète et risque infectieux est connu depuis longtemps par les cliniciens et repose sur une association complexe de risques mécaniques liés à la perte de sensibilité superficielle et profonde, ainsi que sur l'immunodépression liée à l'hyperglycémie [188]. Plusieurs travaux ont ainsi montré que l'hyperglycémie altère les fonctions immunitaires innées, comme la dégranulation des polynucléaires neutrophiles, c'est à dire leur capacité de sécrétion de protéases destinées à l'élimination microbienne, mais aussi leurs capacités de migration au niveau d'un tissus infecté [189]. Elle induit aussi l'expression de récepteurs membranaires Toll-like perturbant les fonctions apoptotiques des neutrophiles [190,191]. La glycosylation directe du complément induite par l'hyperglycémie peut aussi perturber les fonctions d'opsonisation/phagocytose des bactéries par les cellules phagocytaires professionnelles [192]. Certaines complications ostéo-articulaires sont habituelles dans le diabète comme le mal perforant plantaire évolué avec atteinte osseuse, mais cette comorbidité constitue aussi un facteur de risque d'infections sur matériel et notamment sur prothèse articulaires [193].

Le biofilm constitue un autre déterminant majeur de la survenue d'infections ostéo-articulaires et sur matériel prothétique, *S. aureus* et *S. epidermidis* en sont les principaux pourvoyeurs [194–197]. *S. lugdunensis* est une bactérie fortement productrice de biofilm et nos travaux démontrent sa capacité à fabriquer un biofilm en quelques heures à peine, un élément probablement pertinent pour expliquer nos observations cliniques, puisque 100% des 28 souches impliquées dans ces infections en étaient productrices en 4 h maximum. Par ailleurs, certains travaux ont montré que la production de biofilm était augmentée *in vitro* en présence de glucose, ce qui établirait un lien direct entre diabète, biofilm et infections ostéo-articulaires [198]. Le biofilm pose par ailleurs un problème thérapeutique majeur compte tenu de la barrière qu'il représente pour les éléments du système immunitaire mais aussi pour les antibiotiques. Par conséquent, la prise en charge chirurgicale de patients ayant une infection prothétique paraît difficilement contournable [199][200]. Par ailleurs, la rapidité avec laquelle il s'établit renforce l'idée selon laquelle la première administration d'antibiotiques lors d'un changement de prothèse articulaire infectée à *S. lugdunensis* doit être per opératoire, immédiate, juste après les prélèvements à visée bactériologiques.

### 3. Infections chroniques et variant à petites colonies

Nous avons mis en évidence au cours de l'étude VISLISI plusieurs variant à petites colonies, en particulier 3 souches impliquées dans des infections ostéo-articulaires. Plusieurs auteurs ont décrit la capacité accrue de ces souches à entrainer des infections chroniques, sur matériel mais ont aussi montré leur coexistence fréquente avec des souches « sauvages » dans des structures de type biofilm [201]. Il existe probablement une interaction étroite entre l'état métabolique de ces souches qui est généralement le résultat d'une pression environnementale comme une restriction en nutriments ou la présence d'antibiotiques, et le biofilm qui réagit lui aussi à ces mêmes facteurs. Zulfiqar Ali Mirani et ses collaborateurs ont ainsi montré que *S. aureus* pouvait exister au sein du

biofilm sous la forme de variants à petites colonies et de souches de phénotype sauvage avec un passage d'un état métabolique à l'autre et que la stabilité du biofilm était directement dépendante de ces changements d'état [67].

## 4. Perspectives

La lugdulysine est une métalloprotéase dont le rôle exact reste à déterminer mais plusieurs éléments devraient permettre d'apporter des réponses plus définitives à l'hypothèse que nous formulons ici. Il faut tout d'abord identifier les zones de clivages et les substrats potentiels. Son activité sur les éléments de la matrice extracellulaire osseuse serait concordante. Il faut ensuite mettre au point un modèle de bactérie Knock Out pour le gène *lugdulysine* et réaliser ensuite un modèle animal d'infection ostéo-articulaire. L'étude du protéome de cette souche permettrait peut-être aussi d'envisager le niveau auquel la lugdulysine pourrait jouer un rôle, comme cela a été fait pour l'auréolysine.

Les métalloprotéases présentent d'une manière générale des effets pléiotropes et constituent des cibles thérapeutiques privilégiées dans le domaine de la cancérologie, mais aussi en odontologie ou leurs effets destructeurs sur le parodonte osseux a permis le développement de molécules inhibitrices dont l'efficacité clinique reste à prouver [202–205].

On peut aussi envisager d'intégrer la sécrétion d'un tel facteur de virulence comme une cible diagnostique potentielle. La détection d'une souche sécrétrice de Lugdulysine au sein par exemple d'un prélèvement ostéo-articulaire, d'une prothèse, pourrait amener le clinicien à moduler sa thérapeutique et même le microbiologiste son diagnostic. Même dans l'hypothèse de prélèvements polymicrobiens ou la positivité d'un seul échantillon sur plusieurs doit encore rendre les médecins prudents, on peut considérer que la présence d'une souche protéolytique peut faire l'objet d'une interprétation plus radicale et être considérée comme pathogène. Ce type d'interprétation est novateur car les facteurs de virulence sont exceptionellement utilisés dans le domaine du diagnostic microbiologique afin d'établir la significativité microbiologique des prélèvements. Mais sur le plan clinique, une telle approche a du sens et change l'attitude thérapeutique. Cela suppose la mise au point, par exemple, de tests de diagnostics rapides de la protéase afin de rendre au clinicien un résultat associé à la culture : souche sécrétrice de Lugdulysine. C'est ce qui est fait aujourd'hui pour les souches de *Claustridium difficile*, une bactérie commensale, qui devient pathogène lorsqu'elle est sécrétrice de toxines qui font l'objet de tests de détection rapide qui modulent radicalement l'attitude thérapeutique.

Sur le plan microbiologique encore, l'utilisation de nouveaux outils comme le BioFilm Ring Test (Biofilm Control, Saint-Beauzire, France) pourraient permettre d'évaluer plus précisément la sensibilité réelle des bactéries au sein du biofilm et orienter au mieux l'antibiothérapie en réalisant un antibiogramme sur biofilm. Jason Tasse et ses collaborateurs ont ainsi montré que la sensibilité de *S. aureus* aux antibiotiques était plus grande en phase planctonique qu'au sein du biofilm où on observe une augmentation des concentrations inhibitrices pour certains antibiotiques comme la

daptomycine, la fosfomcyine et l'ofloxacine alors que d'autres antibiotiques gardent une activité constante comme la clindamycine, l'acide fusidique et la rifampicine [206].

Une partie seulement, des souches issues de l'étude VISLISI, est productrice de lugdulysine alors que toutes sont porteuses du gène. Cette observation repose, peut-être, sur la mutation G299S que nous avons identifié chez 57% des souches non productrices de la protéase. Cette mutation a probablement peu d'impact sur le plan fonctionnel mais pourrait modifier la structure de la zone catalytique de la protéine. Il faut donc maintenant déterminer la structure tridimensionnelle réelle de la protéase pour évaluer l'impact réel de cette mutation sur le plan structural.

## C. Eléments génétiques mobiles de *Staphylococcus lugdunensis*

### 1. Génome accessoire de *Staphylococcus lugdunensis*

La mise en évidence d'éléments génétiques mobiles multiples chez *S. lugdunensis* est nouvelle, mais pas surprenante. En effet il semble de plus en plus évident que le génome accessoire des staphylocoques occupe une place fondamentale dans leur évolution et leur adaptation à l'environnement comme à l'homme. *S. aureus* porte sur ces éléments mobiles de nombreux facteurs de virulence ce qui n'est pas prouvé chez *S. lugdunensis* et reste globalement très rare et peu documenté chez les SCN. Néanmoins la présence de phages et de plasmides doit faire envisager la possibilité d'échanges de matériel génétique de *S. aureus* vers les SCN, ce qui n'est pas encore admis ou clairement démontré, alors que les échanges dans le sens opposé sont fréquents. Il existe plusieurs systèmes de restriction du transfert de matériel génétique d'une espèce de staphylocoque à l'autre et cela explique entre autre les difficultés à transférer même *in vitro* des plasmides de *S. aureus* vers un SCN [97]. Les moyens mécaniques comme l'électroporation perméabilisent de force la membrane plasmique bactérienne, mais d'une manière générale il faut le plus souvent, contourner ces mécanismes de restriction pour obtenir des transferts de gènes entre staphylocoques [98].

### 2. Biofilms et transferts génétiques horizontaux

Le biofilm est apparu ces dernières années comme un lieu privilégié pour l'établissement d'échanges de matériels génétiques qui modulent directement le métabolisme du biofilm selon un ensemble de mécanismes dont Jonas Stenløkke Madsen et ses collaborateurs ont récemment publié une revue complète [207]. Les bactéries se retrouvent dans une situation de grande proximité qui facilite leurs contacts physiques et les transferts conjugatifs de plasmides, mais aussi l'activité d'enzymes issues de cadavres bactériens sur de l'ADN exogène. La libération d'ADN extracellulaire dont le rôle est fondamental dans la persistance du biofilm constitue aussi une source de matériel génétique transférable par un mécanisme de transformation, alors que la compétence bactérienne semble être directement régulée par cet ADNe. Ces échanges constituent d'une manière générale un des mécanismes adaptatifs fondamentaux de la population bactérienne au sein du biofilm qui doit être considéré comme un ensemble

coopératif et adaptatif aux conditions environnementales [47,207]. La mise en évidence de plusieurs plasmides chez *S. lugdunensis* et sa grande capacité à fabriquer un biofilm constituent ainsi un champ de recherche conjoint tout à fait pertinent.

### 3. Perspectives

Plusieurs travaux restent à mener pour amener des réponses valables aux questions que nous soulevons ici. Il faut tout d'abord explorer le niveau d'expression de ces éléments génétiques mobiles. Concernant les phages la première étape serait d'étudier leur inductibilité, c'est à dire la capacité du phage à s'engager vers un cycle lytique en utilisant par exemple la mitomycine C [208]. Il serait ensuite nécessaire de caractériser ces phages sur le plan structural mais aussi leur contenu génique pour savoir s'il s'agit d'un phage exerçant une transduction spécialisée ou généralisée. Il faudrait finalement déterminer les bactéries infectables. Concernant les plasmides il faudrait confirmer leur existence en isolant expérimentalement le chromosome bactérien de celui du plasmide par des méthodes de précipitation et centrifugation dont il existe plusieurs modalités [209,210]. Une fois isolé, l'ADN plasmidique pourrait ensuite faire l'objet d'un séquençage à part entière. La méthode que nous avons utilisée reste en effet exploratoire et uniquement basée sur des données bioinformatiques qui doivent absolument être confirmées. Il serait aussi nécessaire d'étudier le transfert vers d'autres types bactériens comme *S. aureus* ou d'autres SCN et déterminer le caractère conjugatif ou abortif de ces transferts.

## D. Application de la spectrométrie de masse à l'étude de la virulence bactérienne

### 1. Spectrométrie de masse et analyse hiérarchique

Nos travaux n'ont pas permis de mettre en évidence de liens cohérents entre les souches issues d'infections et de contaminations ou encore selon l'origine clinique des souches. Notre projet initial reposait sur la publication de plusieurs travaux montrant que la spectrométrie de masse était un outil viable pour l'étude indirecte des relations phylogénétiques entre des souches bactériennes et pouvait remplacer l'étude de gènes ménagers, de profils de restriction voir de génomes entiers dans cette perspective là [82,83]. Ces travaux encourageants menés sur des bactéries à Gram négatif ont été conduit chez *S. aureus*, mais le seul résultat probant est la capacité à établir des profils spectrométriques permettant de distinguer les souches sensibles ou résistantes à la méticilline, ce qui est loin de notre objectif initial et surtout peu intéressant chez *S. lugdunensis* qui n'est quasiment jamais résistant à la méticilline [211–213]. Ces travaux présentaient pourtant l'intérêt d'avoir ont été menés sur des spectromètres de masse de type MALDI-TOF MS avec des fenêtres d'analyse entre 2 et 20 kDa, ce qui correspond aux conditions réunies dans la plupart des laboratoires de diagnostic. Inversement, Peter Lasch et ses collaborateurs ont récemment montré que la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS était incapable de mettre en évidence des complexes clonaux plus généraux comme ceux établis à l'aide de profils de restriction ou d'analyse de gènes ménagers [214]. La spectrométrie de masse utilisée dans le cadre du diagnostic de

routine présente de nombreuses limites qui expliquent probablement ces résultats. Les profils obtenus sont relativement stables au fil des dépôts, mais restent soumis à une certaine variabilité inhérente au processus d'ionisation et de désorption qui complique probablement le typage bactérien alors que le processus d'identification reste fiable, car il repose sur les quelques pics les plus intenses et abondants. Par ailleurs, l'utilisation de dépôts directs bactériens est insuffisante pour avoir des tracés assez riches et reproductibles pour des analyses plus fines que l'identification, et il faut recourir à l'analyse de protéines cytoplasmiques qui se limite très majoritairement aux protéines ribosomales qui sont habituellement très conservées au sein d'une espèce. Au final, le typage de *S. lugdunensis* et peut être des staphylocoques en général (si l'on excepte la question de la sensibilité à la méticilline) n'est pour le moment pas réalisable dans les conditions expérimentales du diagnostic de routine.

### 2. Spectrométrie de masse et analyse de facteurs de virulence

Nous avons vu en introduction que la spectrométrie de masse a pu être utilisée avec succès pour l'identification de la δ-hémolysine de *S. aureus* probablement parce que le poids moléculaire de cette protéine (environ 3 kDa) est compatible avec la fenêtre d'analyse des spectromètres en routine (2 à 20 kDa) [79]. Inversement la recherche de Leucocidine de Panton Valentine s'est révélée infructueuse dans les mêmes conditions sachant que cette protéine fait plus de 60 kDa [77]. On peut finalement penser que dans ces fenêtres de détection la recherche de facteurs de virulence sera probablement décevante en dehors de quelques exceptions et ce pour plusieurs raisons. Le poids moléculaire représente une première limite et une grande partie des facteurs de virulence fait plus de 20 kDa en particulier chez *S. aureus*. Par ailleurs, il ne s'agit pas toujours de protéines cytoplasmiques ou sécrétées et les conditions expérimentales sont alors totalement différentes. La recherche de facteurs d'adhésion est par exemple fortement compromise, car l'analyse de dépôts bactériens directs produit des tracés très variables, difficilement comparables dans le détail même si les principaux pics eux restent constants. Enfin, les facteurs de virulence ne sont pas nécessairement facilement ionisés, autrement dit l'amplitude des pics n'est pas nécessairement grande même si la protéine considérée est présente en grande quantité. Au final, l'utilisation du MALDI-TOF MS dans une fenêtre de 2 à 20 kDa est probablement insuffisante pour l'identification de facteurs de virulences chez les staphylocoques. Concernant la lugdulysine, cette protéine excrétée est trop lourde pour être détectée (37 kDa).

### 3. Perspectives

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS est maintenant bien installée dans les laboratoires de diagnostic et les bases de données qui y sont reliées sont riches, l'identification bactérienne est beaucoup plus simple et fiable, il est peu probable que les laboratoires changent dans les prochaines années radicalement de matériel ou de protocoles. En recherche, la solution viendra peut être de l'utilisation d'autres analyses

spectrométriques plus discriminantes ou encore dans des fenêtres d'analyse plus larges qui peuvent aller jusqu'à 150 kDa [215,216]. Concernant *S. lugdunensis*, il serait probablement utile de reproduire ces analyses de comparaison de souches en fonction de leurs provenances en comparant les profils spectrométriques dans des fenêtres allant de 20 à 150 kDa en se basant sur les protéines cytoplasmiques, mais aussi sur les surnageants de culture c'est à dire le sécrétome. Cette dernière analyse est rendue difficile par l'utilisation de milieux de cultures eux même riches en protéines qu'il peut être difficile de distinguer des protéines produites par la bactérie dans le cadre d'une approche globale.

# V. Conclusions

Ce travail de thèse a permis de confirmer la pathogénicité de *S. lugdunensis* en s'appuyant sur une base méthodologique forte c'est à dire une analyse clinique prospective. Nous avons ainsi pu montrer que ce SCN ne se comporte pas comme les autres espèces de SCN et possède une virulence qui lui est propre et le rapproche sur le plan clinique, mais aussi microbiologique et génétique de *S. aureus*. Ces observations remettent en cause la dichotomie habituelle *S. aureus vs* SCN et notamment l'interprétation des prélèvements microbiologiques en sachant que la fréquence de colonisation par *S. aureus* et *S. lugdunensis* est proche, de l'ordre de 30%. Nous pensons donc qu'au même titre que *S. aureus S. lugdunensis* ne devrait, à priori, jamais être considéré comme un contaminant dans une hémoculture, un prélèvement profond ou encore un fragment de matériel ou osseux, même si un seul prélèvement est positif parmi plusieurs. Nous avons aussi mis en évidence une nouvelle protéase de la classe des métalloprotéases, et qui constitue un possible facteur de virulence impliqué dans les infections ostéo-articulaires bien que des travaux restent à mener pour le démontrer formellement. Nous observons à l'issue de ce travail translationnel un tableau général expliquant la survenue d'infections avec une bactérie qui le plus souvent vit en symbiose avec son hôte : des patients fragilisés par une porte d'entrée cutanée, un système immunitaire altéré par l'âge, le diabète ou un cancer et un pathogène virulent par la production de facteurs d'adhésion et au moins d'une protéase. Ces éléments réunis suffisent certainement à expliquer le constat clinique que nous faisons. D'autres éléments impliqués dans la virulence de ce pathogène, mais aussi des autres staphylocoques restent certainement à découvrir. Nous avons enfin pu montrer l'importance du génome accessoire chez un SCN, ce qui le rapproche encore de *S. aureus* avec qui il partage une partie importante de son génome. L'utilisation de plus en plus large du séquençage à haut débit nous donne un regard totalement inédit sur les agents infectieux et en particulier sur ces souches commensales qui vivent sur notre épiderme, mais qui ont la capacité d'échanger, et d'apprendre à mesure que nous fabriquons des bactéries de plus en plus résistantes par un usage trop large des antibiotiques.

# VI. Synthèse des publications, posters et présentations

## A. Articles

**Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis.***
**Argemi X**, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, Jaulhac B, Prévost G, Schramm F.
Journal of Clinical Microbiology. 2015. Jul;53(7):2030-6.

***Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections.**
Douiri N, Hansmann Y, Lefebvre N, Riegel P, Martin M, Baldeyrou M, Christmann D, Prevost G, **Argemi X**.
Clinical Microbiology and Infection. 2016. Aug;22(8):747-8.

**VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*.**
**Argemi X**, Prévost G, Riegel P, Keller D, Meyer N, Baldeyrou M, Douiri N, Lefebvre N, Meghit K, Ronde Oustau C, Christmann D, Sarah C, Strub JM, Hansmann Y.
Clinical Microbiology and Infection. 2016. Dec 22.

***Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection.**
**Argemi X**, Dahyot S, Lebeurre J, Hansmann Y, Ronde Oustau C, Prévost G.
Médecine Maladies Infectieuses. 2017. *In press*.

**Whole genome sequencing of 7 strains of Staphylococcus lugdunensis allows identification of mobile genetic elements.**
**Argemi X,** Martin V, Loux V, Dahyot S, Lebeurre J, Guffory A, Martin M, Velay A, Riegel P, Keller D, Hansmann Y, Paul N, Prévost G.
Genome Biology and Evolution. 2017**.** *In press*.

**Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections.**
**Argemi X**, Prévost G, Riegel P, Keller D, Provot C, Badel-Berchoux S, Jehl F, Olivares E, Hansmann Y.
Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. 2017. Accepted, awaiting proofs.

## B. Présentations orales

### 1. Congrès régionaux

- **FMTS, Journées de la Fédération de Médecine Transrationnelle de Strasbourg, 2016** : « Virulence et génétique de *Staphylococcus lugdunensis*, un pathogène mal connu, étude VISLISI ».

**Argemi X**, Douiri N, Keller D, Lefebvre N, Riegel P, Christmann D, Jaulhac B, Hansmann Y, Prévost G.

**- FMTS, Journées de la Fédération de Médecine Transrationnelle de Strasbourg, 2017** : « *Staphylococcus lugdunensis*, de la prothèse à la protéase ».
**Argemi X**, Hansmann Y, Riegel P, Ronde-Oustau C, Prévost G.

### 2. Congrès nationaux

**- JNI, Journées Nationales d'Infectiologie, 2015 :** « Virulence de *S. lugdunensis* dans les infections sévères, étude VISLISI ».
**Argemi X**, Prévost G, Riegel P, Keller D, Meyer N, Baldeyrou M, Douiri N, Lefebvre N, Meghit K, Ronde-Oousteau C, Christmann D, Cianfarani S, Strub JM, Hansmann Y.

**- RICAI, Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti Infectieuse, 2016 :** « Virulence et génétique de *Staphylococcus lugdunensis*. Identification d'une nouvelle protéase comme possible facteur de Virulence ».
**Argemi X**, Prévost G, Riegel P, Keller D, Meyer N, Baldeyrou M, Douiri N, Lefebvre N, Meghit K, Ronde-Oousteau C, Christmann D, Cianfarani S, Strub JM, Hansmann Y.

## C. Posters

### 1. Congrès nationaux

**- JNI, Journées Nationales d'Infectiologie, 2014** : « Infections à *S. lugdunensis*, une bactérie virulente ? ».
**Argemi X,** Keller D, Riegel P, Umer F, Masseron A, Hansmann Y, Prévost G.

### 2. Congrès internationaux

**- ICCMG, International Conference on Clinical Metagenomics, 2016** : « Identification of Mobile Genetics Elements in *Staphylococcus lugdunensis*, a virulent coagulase negative staphylococci ».
**Argemi X**, Hansmann Y, Riegel P, Prévost G.

# VII. Annexes

**Tableau annexe 1.** Synthèse bibliographique de chronologie croissante des séries cliniques référencées dans Pubmed de patients infectés par *S. lugdunensis* et présentant une infection de la peau et des tissus mous (PTM), une endocardite (End), une bactériémie (Bact), une infection ostéo-articulaire (IOA) ou un autre type d'infection (Aut).

| N° | n[1] | PTM | End | Bac | IOA | Aut | Comorbidités | Age[2] | Antibiogramme | Trmt[3] | Pronostic | Remarque | R |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **14** | 12 | 0 | 2 | 0 | 0 | 79% diabètes<br>14% cancers | 25-78 | 100% Oxacilline S<br>14% β-lactamases | ND[4] | ND | | [20] |
| 2 | **6** | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | ND | ND | 25% Oxacilline R<br>50% β-lactamases | ND | ND | | [217] |
| 3 | **10** | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10% cirrhose éthylique<br>40% pace maker<br>40% valves natives<br>20% bioprothèses aortiques | ND | ND | 70% des End opérées | 50% de mortalité | Série de toutes les endocardites dans 2 centres, n=408, le taux de mortalité le plus important est celui des endocardites à *S. lugdunensis* et c'est le deuxième SCN le plus fréquent après *S. epidermidis.* | [26] |
| 4 | **48** | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | ND | ND | ND | ND | 91% des souches de *S. lugdunensis* recueillies se sont révélées correspondre à une infection clinique VS 52% pour *S. epidermidis*. | [218] |
| 5 | **38** | 33 | 1 | 6 | 0 | 0 | ND | 7-89 | 95% Oxacilline S<br>5% Oxacilline R<br>16% β-lactamases | ND | ND | | [219] |
| 6 | **8** | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | ND | | 100% Oxacilline S | ND | ND | | [28] |
| 7 | **28** | 0 | 13 | 28 | 0 | 0 | ND | 25-77 | 18% β-lactamases | 80% des End opérées | 23% de mortalité pour les End | Les 13 endocardites sont inclues dans les 28 bactériémies : 46%. | [22] |
| 8 | **491** | 413 | 0 | 0 | 2 | 76 | ND | ND | 100% Oxacilline S<br>20% β-lactamases | ND | ND | Série clinique très hétérogène sans critères d'inclusion microbiologiques. | [19] |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | **28** | 0 | 0 | 0 | 28 | 0 | 18% corticoïdes<br>11% diabétiques | 35-88 | 86% Oxacilline S<br>21% β-lactamases | | 18% de rechutes | Un à 6 prélèvements positifs selon les patients.<br>Infections sur prothèses. | [30] |
| 10 | **15** | 0 | 4 | 15 | 0 | 0 | 33% diabètiques<br>20% cancers | 21-85 | ND | 75% des End opérées | 20% de décès | Les 4 endocardites sont inclues dans les bactériémies : 25%. | [23] |
| 11 | **36** | 30 | 0 | 1 | 2 | 3 | 47% aucune<br>17% diabètes | 19-65 | 3% Oxacilline R (*mecA* +)<br>47% β-lactamases | 23% des SST opérées | ND | | [220] |
| 12 | **20** | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25% sans porte d'entrée | | 20 Oxacilline S | | 100% de guérison | | [221] |
| 13 | **67** | 0 | 67 | 0 | 0 | 0 | 45% sans porte d'entrée<br>24% sans comorbidité<br>80% sur valve native | 7-82 | ND | 60% des End opérées | 39% de décès | Analyse des facteurs de risque de mortalité en multivarié: absence de chirurgie cardiaque.<br>A noter 16% d'emboles septiques 86% sur cœur gauche. | [25] |
| 14 | **13** | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 8% diabète<br>50% cancers<br>23% sans porte d'entrée | 30-89 | ND | ND | ND | Septicémies avec 1 seule hémoculture positive. | [135] |
| 15 | **70** | 0 | 5 | 21 | 4 | 0 | ND | ND | ND | ND | 3% de mortalité pour les End | | [24] |
| 16 | **48** | 44 | 0 | 3 | 0 | 0 | 23% diabètes<br>10% insuffisant rénaux<br>13% cancers | ND | 96% Oxacilline S<br>66% β-lactamase | ND | 2% de décès | | [222] |
| 17 | **11** | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | ND | ND | ND | 33% des End opérées | 9% de décès | Survenue d'une fasciite nécrosante. | [223] |
| 18 | **11** | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 18% diabètes<br>18% insuffisants rénaux | 41-68 | ND | ND | 18% de décès | Infections de pace maker chez tous les patients. | [224] |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 19 | **5** | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | ND | 0-56 | 100% Oxacilline S<br>20% *mec A* +<br>75% β-lactamases | | 100% de guérison | | [225] |
| 20 | **87** | 27 | 0 | 12 | 19 | 12 | ND | | 30% β-lactamases | ND | ND | | [86] |
| 21 | **16** | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30% aucune<br>25% diabète | 30-62 | 100% oxacilline S<br>30% β-lactamases | 19% des SST opérées | 100% de guérison | | [21] |
| 22 | **17** | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 58% insuffisance cardiaque | ND | ND | ND | 64% opérées<br>47% de mortalité | 70% des endocardites sur valve native. | [226] |
| 23 | **48** | 0 | 0 | 41 | 2 | 5 | ND | ND | ND | ND | 21% de mortalité | Sources des bactériémies:<br>primaire 43,8%<br>liée au cathéter 18,8%<br>matériel vasculaire 12.5% | [29] |
| 24 | **15** | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | ND | ND | ND | 40% des End opérées | 100% de guérison | 67% des endocardites sur valve native, 13% sur prothèse et 20% sur pace maker. A noter 30% de perforations et 20% d'abcès. | [15] |
| 25 | **38** | 22 | 0 | 3 | 6 | 7 | ND | ND | 100% oxacilline S | ND | ND | | [227] |
| 26 | **11** | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | ND | ND | 83% Oxacilline S | ND | ND | | [228] |
| 27 | **28** | 0 | 0 | 0 | 28 | 0 | ND | ND | ND | 100% des IOA opérées | 89% de guérison | Prothèses totales de genou 57%, chirurgie en 2 temps 39%, antibiothérapie par quinolones et rifampicine 57% | [31] |

[1] n, nombre de patients inclus dans l'étude

[2] Age, en années

[3] Trmt, traitement

[4] ND, non documenté

**Tableau annexe 2.** Synthèse bibliographique de chronologie croissante des des facteurs de virulence potentiels identifiés chez *S. lugdunensis* au niveau génique, protéique et fonctionnel.

| N° | Facteur de virulence | Méthode d'identification 1 | Méthode d'identification 2 | n | Résultats | Interprétations | Remarques | R |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | δ-like hémolysine | Fonctionnelle (gélose au sang) | | 5 | 95% des souches +[1] | | **δ-hémolysine:** toxine hémolytique de *S. aureus* lytique pour les globules rouges et les globules blancs. **β-lactamases:** ensemble de protéines lytiques pour la pénicilline. | [146] |
| | β-lactamase | Fonctionnelle (gélose au sang) | | | 29% des souches + | | | |
| 2 | δ-like hémolysine thermostable | Fonctionnelle (globules rouges de lapin) | | 28 | 100% des souches + | | | [75] |
| | | DNA-DNA hybridation avec *S. aureus* | | | | | | |
| 3 | *agr* | Présence du gène par Southern Blot | | 13 | 100% des souches + | Contrairement à *S. aureus*, la δ-like hémolysine n'est pas codée par l'ARNIII chez *S. lugdunensis*. | **Locus *agr* chez *S. aureus* :** fait de 5 gènes (*hld, agrB-D-C-A*). Il régule l'expression de nombreux facteurs de virulence par un ARN régulateur : l'ARNIII (codé par *hld*) qui est aussi un ARN messager qui code pour la δ-hémolysine. | [229] |
| | RNAIII (δ hémolysine de *S. aureus*) | Présence de l'ARN par Northern blot | | 6 | 50% des souches + | | | |
| | δ-like hémolysine | Fonctionnelle | | 3 | 100% des souches + mais indépendamment de l'ARNIII | | | |
| 4 | Adhésines | Tests d'adhésion à la MEC[2] | | 11 | 100% des souches adhèrent à la matrice extra cellualaire | Les composants testés ici : Collagène I-IV Fibrinogène, Vitronectine, Laminine, Thrombospondine, Plasminoène, IgG | | [230] |
| 5 | δ-like hémolysine | Fonctionnelle (globules rouges de lapin) | | 1 | Identification de 3 peptides qui sont à l'origine de l'activité δ hémolytique. Appelés SLUSH A, B et C. Gène en dehors du locus *agr*. | La δ-like hémolysine de *S. lugdunensis* est bien codée par un gène distinct du locus *agr* et ce malgré la présence d'ARNIII chez *S. lugdunensis.* | | [147] |
| | | Identification protéique par RP-HPLC[3] | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Séquence par RT PCR[4] | | | | | | |
| 6 | *vWf* | Séquençage par phage display | | 12 | Gène codant pour une protéine de 2060 acides aminés correspondant au vWf. | Présence d'une protéine d'adhésion au facteur de Von Willebrand impliqué dans l'adhésion plaquettaire | | [231] |
| 7 | *fbl* | Séquençage *par* PCR[5] | Tests fonctionnels d'adhésion au fibrinogène | 8 | Séquence du gène *fbl*: 58% d'homologie de séquence avec le clumping facteur A de *S. aureus.*<br>Adhésion au fibrinogène: 100% de fixation, 100% inhibée par des anticorps anti fibrinogène. | Confirmation des fortes capacités d'adhésion au fibrinogène. De *S. lugdunensis..* | **Clumping factor :** coagulase liée à la membrane plasmique de *S. aureus* qui lie le fibrinogène et coagule le plasma. | [232] |
| 8 | *fbl* | Séquençage par Southern Blot | | 12 | Gène présent dans 100% des souches.<br>62% d'homologie de séquence avec le clumping factor A de *S. aureus* en terme de séquence d'acides aminés. | | | [233] |
| 9 | *icaADBC* | Recherche de l'opéron par PCR | Analyse constitutionnelle du biofilm | 15 | 100% de souches font du biofilm et sont porteuses de l'opéron *icaADBC* mais le biofilm de *S. lugdunensis* est protéique. | | ***icaADBC*** : opéron impliqué dans la synthèse d'un biofilm polysacharidique chez *S. aureus* et chez *S. epidermidis..* | *[198]* |
| 10 | Fbl | Réalisation d'une protéine Fbl tronquée | | | Identification des sous domaines N2 et N3 comme principalement impliqués dans l'adhésion au fibrinogène. | | | [234] |
| 11 | Entérotoxines E-G-H-I | RT-PCR | | 3 | 66% des souches + pour l'entérotoxine I<br>34% des souches + pour l'entérotoxine G et I | L'identification de gènes codant pour des entérotoxines est surprenante et isolée dans la littérature. | | [235] |
| 12 | *fbl* | PCR | Recherche de Clumping Factor | 58 | 100% des souches + pour le gène<br>30% des souches + pour le Clumping Factor | Les souches sont issues de patients mais :<br>- patients infectés et colonisés mélangés<br>- Le phénotype "fibrinogene binding/clumping factor +" n'est pas corrélé avec la provenance des souches (hémocultures ou cutanées).<br>- Pas de corrélation entre hémolyse et provenance des souches. | | [145] |
| | *SLGD_01696 (fbpA)* | PCR | | | 100% des souches + | | | |
| | *vWf* | PCR | | | 98% des souches + | | | |
| | *SLUSH A, B, C* | PCR | | | 50% des souches + | | | |
| | *SLGD_00006 (β hémolysine)* | PCR | Recherche d'une hémolyse β | | 95% des souches + pour le gène<br>10% d'hémolyse β à 24 h<br>93% d'hémolyse β à 48 h | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *SLGD_00847 (Hemolysine III)* | PCR | | | 100% des souches + | | | |
| 13 | *isd* | Séquençage complet souche N920143 | | 1 | Opéron *isd*: 7 gènes | **Locus *isd*:** opéron avec plusieurs loci: *B-J-C-K-E-F-G. Ces* protéines de surface sont ancrées dans le peptidoglycanne et ont la capacité d'extraire l'hème de l'hémoglobine. | Pas de gène codant pour: coagulase, protéine A, superantigenes, exfoliatine, toxines formant des pores, protéines d'évasion immunitaire (map, efb, chp, scn, ssl, sak). | [66] |
| | *Sls* | | | | 7 gènes identifiés | **Locus *Sls:*** protéines liées à la membrane de manière covalente avec des fonctions probable d'adhésion (protéines Fbl et vWbl). | | |
| | *sst* | | | | Locus duppliqué | **Locus *sst:*** commun à tous les staphylocoques, code pour un système de sidérophore (capture du fer et internalisation). | | |
| | *agr* | | | | Locus présent | | | |
| | *streptolysine S-like toxine* | | | | Locus présent | **Sterptolysines:** toxines formant des pores dans la paroi cellulaire. | | |
| | *esx* | | | | Locus présent | **esx-ESAT 6:** système de sécrétion décrit chez *Mycobacterium tuberculosis* pour délivrer des facteurs de virulence à une cellule cible, c'est un complexe formant un pore avec la cible. | | |
| | *IcaADBC* | | | | Locus présent | | | |
| | *NRPS* | | | | Locus présent | **NRPS:** enzymes permettant la synthèse de peptides sans passer par les ribosomes. | | |
| | *cap* | | | | Locus présent | **Locus *cap* :** synthèse de la capsule bactérienne. | | |
| | *mprf/dlt* | | | | Locus présent | **mprF/dlt:** protéines changeant la charge de surface et diminuant la sensibilité aux peptides antimicrobiens. | | |
| | *CRISPR* | | | | Locus présent | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | *IsdG* | Colnage du gène (plasmide *E. coli*) | Purification de protéine<br>Tests de liaison et dégradation à l'hème | 1 | | | **IsdG :** hème oxygénase qui dégrade l'hème, appellée IsdG chez *S. lugdunensis* car elle a le plus d'homologies avec l'hème oxygénase de *S. aureus* appelée IsdG. *S. aureus* a deux hème oxygénase, IsdG et Isd I. | [236] |
| 15 | *fbl* | Mutants KO | | 8 | Les mutants KO pour le gène *fbl* pénètrent tout de même les cellules épithéliales. | La pénétration des cellules épithéliales passe soit par l'adhésion au fibrinogène soit la fibronectine ? | | [237] |
| 16 | *fbl* | Mutants KO | | 3 | Abolition complète de l'adhésion au fibrinogène | Le lgène *fbl* code bien pour une protéine d'adhésion au fibrinogène et cette fonction n'est pas possible sans cela. | | [238] |
| 17 | *isd* | Clonage du gène (plasmide *E. coli*) | Purification des protéines<br>Western Blot<br>Mutants KO pour chaque protéine | 5 | Identification du fonctionnement dd'un véritable complexe protéiqu IsdB-C-J-K qui coopère pour permettre la captation du fer de l'hémoglobine. | La présence d'un tel système est unique chez les SCN, même si ponctuellement de nombreuses protéines avec des domaines protéiques ayant la propriété de se lier au fer ont été décrites (NEAT-like domain, Near Iron transporter). | **Protéines IsdA-B-C-H de *S. aureus* :** sont liées au peptidoglycanne et coopèrent pour aboutir à la captation et l'utilisation du fer de l'hémoglobine. | [239] |
| 18 | catalase | Activité catalase (péroxyde d'hydrogène à 3%) | Séquençage du gène | 1 | Absence d'activité catalase.<br>Séquençage : mutation non-sens. | Première souche catalase négative décrite et premier séquençage de ce gène chez *S. lugdunensis.* | **Catalase :** considérée comme un facteur de virulence pour sa propriété à entrainer la production de radicaux libres par dégradation du péroxyde d'hydrgène. | [240] |
| 19 | *srtA*<br>(sortase A) | Mutants KO | Modèle d'endocardite murine | 1 | Souris infectées par une souche *srtA* KO font des endocardites moins sévères que si le gène est fonctionnel. | Les sortases seraient un élément clés de la virulence de *S. lugdunensis* par leurs propriétés d'adhésion. | **Sortases :** transpeptidases liées à la membrane cytoplasmique qui reconnaissent des protéines particulières possédant des motifs spécifiques, appelées protéines à motif LPXTG. Elles créaient des liaisons covalentes entre la protéine à motif LPXTG et la paroi ou une autre protéine à motif LPxTG. | [241] |
| 20 | *atlL*<br>(autolysine L) | Mutants KO | Etude de la virulence chez Caenorhabditis elegans | | Les mutants KO élaborent un peptidoglycanne altéré et la virulence de la bactérie est diminuée. | Ces résultats suggèrent l'importance du peptidoglycane dans la virulence. (Article non disponible entièremen). | **Autolysines :** hydrolases clivant certaines liaisons du peptidoglycanne dont elles permettent le renouvellement sans | [242] |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | quoi ce dernier s'altère (aminci, fragile). | |
| 21 | *IsdB-C-J-K* | Mutants KO pour chaque gène | Etude de la production de biofilm | | La production de biofilm est abolie chez les mutants KO pour les 4 gènes.<br>La production de biofilm est normale pour les KO *IsdB-J-K.*<br>La production de biofilm est abolie pour les KO *IsdC.* | *IsdC* est indispensable à la synthèse du biofilm dont les auteurs ont précédemment montré qu'il est principalement protéique et pas polysacharidique. | | [243] |
| 22 | Biofilm | Quantitative microtittre plate | | 38 | 36.8% font du biofilm | | **Locus *ermC*:** locus de résistance chez les staphylocoques aux lincomycines, kétolides et macrolides. | [227] |
| | *fbl* | PCR | | | 100% + pour le gène | | | |
| | *atlL* | PCR | | | 94.7% + pour le gène | | | |
| | *vwbl* | PCR | | | 81.6% + pour le gène | | | |
| | *ica* | PCR | | | 68.4% + pour le gène | | | |
| | *slush* | PCR | | | 39.5% + pour le gène | | | |
| | *ermc* | PCR | | | 19% + pour le gène | | | |
| 23 | *atlL* | Mutants KO | Quantitative microtittre plate assay | 1 | Diminution de la production de biofilm. | Ces résultats sont concordants avec les études précédentes quant au rôle possible de cette autolysine dans la virulence bactérienne.<br>Les auteurs proposent un modèle théorique d'interaction de cette autolysine avec les cellules endothéliales conduisant à l'internalisation de la bactérie.<br>Par contre il n'y a pas d'explications sur le rôle de cette autolysine dans la formation du biofilm. | **AtlL :** est une autolysine qui hydrolyse le peptidoglycanne mais possède aussi des propriétés d'adhésions à de nombreuses molécules comme celles de la matrice extracellulaire ou à des protéines membranaires de cellules eucaryotes comme els cellules humaines. | [244] |
| | | | Interaction avec les protéines de la MEC | | Diminution des capacités d'adhésions aux molécules de la MEC (vitronectine, fibrinogène, fibronectine). | | | |
| | | | Internalisation dans les cellules endothéliales | | Diminution de l'internalisation dans les cellules endothéliales. | | | |
| 24 | Protéolyse | Gélose au lait | | 11 | 92% des souches protéolytiques. | | | [228] |
| | Biofilm | Crystal violet | | | Niveaux de production de biofilm très variables pour chaque souche sans influence de la concentration en glucose dans le milieu. | | | |
| | Hémolyse | Sang de lapins | | | 100% hémolytiques mais au bout de plusieurs heures d'incubation (3 à 10 heures) | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 26 | *IsdP* | Clonage | Spectrométrie de masse | 1 | Identification du rôle d'une nouvelle protéine adjacente à l'opéron *Isd*. C'est une protéine régulée par le fer qui joue le rôle d'autolysine. IsdP clive IsdC et diminue l'acquisition d'hème et donc de fer par la bactérie. | Cette étude fournit un modèle très complet de fonctionnement de l'opéron *Isd*. | | [245] |
| 27 | *comEB* | Mutants KO | Quantitative microtittre plate assay | 1 | Diminution de la capacité de fabrication du biofilm après mutation de ce gène. | | **comEB :** protéine responsable d'une lyse cellulaire entrainant le relargage d'ADN bactérien et cet ADN libre est essentiel à al formation de biofilm. | [246] |
| 28 | *vWF* | Etude d'adhésion au vWF en chambre de flux. | Modèle d'endocardite de souris | 1 | *S. lugdunensis* adhère à l'endothélium par l'intermédiaire du vWF, du fibrinogène malgré le flux. | Cette étude est intéressante pour la physiopathologie des endocardites. | | [247] |
| 29 | *Isd* | Mutant avec dupplication du locus | Etude des capacités de fixation du fer | 1 | Augmentation de la captation du fer et des capacités de croissance *in vitro* de *S. lugdunensis*. | Cette étude montre les conséquences fonctionnelles d'une duplication génique. | | [248] |

[1] souche +, souche positive pour le facteur considéré

[2] MEC, matrice extra cellulaire

[3] RP-HPLC, chromatographie liquide à haute performance en inversion de phase

[4] RT PCR, Reverse Transcriptase PCR

[5] PCR, Polymérase Chain Reaction

# Index des Figures

***Figure 1.*** *Régulation de la production de facteurs de virulence par le locus agr. (Reproduit et traduit de Kong C et coll., 2016).* 19
***Figure 2.*** *Aspects culturaux de S. lugdunensis sur gélose au sang de mouton : colonies sauvages (Panel A), variant à petites colonies (Panel B), variant rugueux (Panel C).* 28
***Figure 3.*** *Relations phylogénétiques entre tous les génomes des souches de S. lugdunensis publiés au 01 avril 2017 (dendrogramme réalisé directement à partir d'un BLAST génétique).* 35
***Figure 4.*** *Principaux mécanismes de transfert de l'information génétique chez les bactéries. (Reproduit et traduit de Soucy S.M. et coll., 2015).* 39
***Figure 5.*** *Catégories fonctionnelles de plasmides (Panel A et B) et répartition numérique en fonction de leur taille (Panel C). (Reproduit et traduit de Smillie et coll., 2010).* 43
***Figure 6.*** *Cycle lytique et lysogénique des phages. (Reproduit et traduit de Georges PC Salmond et coll., 2015).* 45
***Figure 7.*** *Caractéristiques des familles de phages le plus souvent observées chez les staphylocoques. (Reproduit et traduit de Deghorain et coll., 2012).* 46
***Figure 8.*** *Îlots de pathogénicité des staphylocoques. (Reproduit et traduit de Richard P. Novick et coll., 2010).* 49
***Figure 9.*** *Ilots génomiques et intégration des différents éléments génétiques mobiles chez les staphylocoques.* 51
***Figure 10.*** *Représentation schématique de la spectrométrie de masse : dépôt de l'échantillon (Panel A) et calcul du temps de vol (Panel B). (Reproduit et traduit de Andrew E. Clarck et coll., 2013).* 70
***Figure 11.*** *Exemple de représentation d'un profil spectrométrique d'une souche de S. lugdunensis obtenu par MALDI TOF/MS et comparaison en fenêtre à deux tracés de S. aureus et E. coli.* 72
***Figure 12.*** *Spectromètre de masse utilisé au laboratoire de Microbiologie de Strasbourg et dans le cadre de cette étude (MALDI-TOF MS, Microflex LT, Bruker Daltonics).* 73
***Figure 13.*** *Analyse d'un alignement de spectres de souches de S. lugdunensis centrés sur une échelle de taille à l'aide du logiciel d'analyse FlexAnalysis (v 3.4, Bruker Daltonics) et montrant un spectre discrimant la moitié des souches à 6800 Da.* 75
***Figure 14.*** *Utilisation du test pastorex Staph Plus pour la détection du facteur d'adhésion au fibrinogène (clumping factor) de S. lugdunensis.* 78
***Figure 15.*** *Réalisation schématique du CAMP test avec S. lugdunensis à la recherche d'une hémolyse synergique.* 79
***Figure 16.*** *Nombre de nouveaux projets de séquençage par année (panel A) et répartition de ces projets en fonction du phylum des Bacteria (Panel B). (Adapté et traduit du Joint Genome Institute, https://gold.jgi.doe.gov/statistics , accès le 17 janvier 2017).* 92
***Figure 17.*** *Principes du séquençage Illumina avec une étape d'amplification (Panel A) puis une étape de séquençage (panel B). (Adapté et traduit de Sara Goodwin et coll., 2016).* 95
***Figure 18.*** *Représentation schématique d'une séquence consensus à partir de reads issus d'un séquençage.* 99
***Figure 19.*** *Découpage d'un read de 10 pb en ensemble de 3-mers. (Adapté de Illumina De Novo Sequencing Technical Note, http://support.illumina.com/sequencing/literature.html, accès le 17 janvier 2017).* 100

# Index des Tables

***Tableau 1.*** *Classification des staphylocoques sur la base des relations phylogénétiques établies entre plusieurs loci (gène codant pour l'ARNr 16S, dnaJ, rpoB, tuf). (Reproduit et traduit de Karsten Becker et coll., 2014).* 14
***Tableau 2.*** *Etudes sur la colonisation à S. lugdunensis.* 17
***Tableau 3.*** *Synthèse des principaux facteurs de virulence de S. aureus et de leurs cibles principales.* 21
***Tableau 4.*** *Caractéristiques phénotypiques et biochimiques des staphylocoques. (Adapté de Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol 4).* 30
***Tableau 5.*** *Génomes complets de S. lugdunensis disponibles dans la base de données NCBI au 01 avril 2017.* 34
***Tableau 6.*** *Critères microbiologiques de l'EMCM pour déterminer la significativité des prélèvements microbiologiques.* 57
***Tableau 7.*** *Critères permettant de définir le statut clinique des patients présentant un prélèvement positif à S. lugdunensis* 59
***Tableau 8.*** *Investigateurs cliniques de l'étude VISLISI* 60
***Tableau 9.*** *Laboratoires et équipes scientifiques associées à l'étude clinique VISLISI* 61
***Tableau 10.*** *Critères permettant de définir lune infection certaine à S. lugdunensis dans le cadre de l'étude VISLISI.* 63
***Tableau 11.*** *Plan expérimental de l'étude VISLISI.* 65
***Tableau 12.*** *Matrices les plus souvent utilisées en spectrométrie de masse lorsqu'une ionisation indirecte des échantillons est nécessaire.* 71
***Tableau 13.*** *Chromatographies sur colonne utilisées pour la purification de protéines.* 85
***Tableau 14.*** *Exemple de 2 plateformes de séquençage disponible en 2017 : Illumina (2ème génération) et Oxford Nanopore (3ème génération).* 93
***Tableau 15.*** *Synthèse des logiciels utilisés pour l'assemblage et l'analyse des génomes de S. lugdunensis.* 108

# Références bibliographiques


1. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. Nat. Rev. Microbiol. **2009**; 7:555–567.

2. Duthie ES. Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. J. Gen. Microbiol. **1954**; 10:427–436.

3. McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. J. Innate Immun. **2012**; 4:141–148.

4. Palma M, Shannon O, Quezada HC, Berg A, Flock JI. Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. J. Biol. Chem. **2001**; 276:31691–31697.

5. Que Y-A, Haefliger J-A, Piroth L, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. J. Exp. Med. **2005**; 201:1627–1635.

6. Ko Y-P, Kuipers A, Freitag CM, et al. Phagocytosis Escape by a *Staphylococcus aureus* Protein That Connects Complement and Coagulation Proteins at the Bacterial Surface. PLOS Pathog. **2013**; 9:e1003816.

7. Flick MJ, Du X, Prasad JM, et al. Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *S. aureus* virulence factor ClfA improves host survival in septicemia. Blood **2013**; 121:1783–1794.

8. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. **2014**; 27:870–926.

9. Freney J, Brun Y, Bes M, et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and Staphylococcus schleiferi sp. nov., Two Species from Human Clinical Specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. **1988**; 38:168–172.

10. Lamers RP, Muthukrishnan G, Castoe TA, Tafur S, Cole AM, Parkinson CL. Phylogenetic relationships among Staphylococcus species and refinement of cluster groups based on multilocus data. BMC Evol. Biol. **2012**; 12:171.

11. Glaeser SP, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. Syst. Appl. Microbiol. **2015**; 38:237–245.

12. Pareja J, Gupta K, Koziel H. The toxic shock syndrome and *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia. Ann. Intern. Med. **1998**; 128:603–604.

13. Woznowski M, Quack I, Bölke E, et al. Fulminant *Staphylococcus lugdunensis* septicaemia following a pelvic varicella-zoster virus infection in an immune-deficient patient: a case report. Eur. J. Med. Res. **2010**; 15:410–414.

14. Pecoraro R, Tuttolomondo A, Parrinello G, Pinto A, Licata G. *Staphylococcus lugdunensis* Endocarditis Complicated by Embolism in an 18-Year-Old Woman with Mitral Valve Prolapse. Case Rep. Infect. Dis. **2013**; 2013:730924.

15. Sabe MA, Shrestha NK, Gordon S, Menon V. *Staphylococcus lugdunensis*: a rare but destructive cause of coagulase-negative staphylococcus infective endocarditis. Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care **2014**;

16. Matthews PC, Lazarus R, Protheroe A, Milford C, Bowler ICJW. Acute necrotizing sinusitis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. J. Clin. Microbiol. **2011**; 49:2740–2742.

17. Hung T, Zaghi S, Yousefzadeh J, Leibowitz M. Necrotizing Fasciitis Associated with *Staphylococcus lugdunensis*. Case Rep. Infect. Dis. **2012**; 2012:453685.

18. Delaunay F, Pegot A, Coquerel-Beghin D, Aktouf A, Auquit-Auckbur I. Fasciites nécrosantes à *Staphylococcus lugdunensis* après dermolipectomie abdominale : à propos de deux cas et revue de la littérature. Ann. Chir. Plast. Esthét. **2014**; 59:136–139.

19. Bocher S, Tonning B, Skov RL, Prag J. *Staphylococcus lugdunensis*, a Common Cause of Skin and Soft Tissue Infections in the Community. J. Clin. Microbiol. **2009**; 47:946–950.

20. Bellamy R, Barkham T. *Staphylococcus lugdunensis* infection sites: predominance of abscesses in the pelvic girdle region. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2002**; 35:E32-34.

21. Papapetropoulos N, Papapetropoulou M, Vantarakis A. Abscesses and wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 16 cases. Infection **2012**; 41:525–528.

22. Zinkernagel AS, Zinkernagel MS, Elzi MV, et al. Significance of *Staphylococcus lugdunensis* Bacteremia: Report of 28 Cases and Review of the Literature. Infection **2008**; 36:314–321.

23. Choi S-H, Chung J-W, Lee EJ, et al. Incidence, Characteristics, and Outcomes of *Staphylococcus lugdunensis* Bacteremia. J. Clin. Microbiol. **2010**; 48:3346–3349.

24. Klotchko A, Wallace MR, Licitra C, Sieger B. *Staphylococcus lugdunensis*: an emerging pathogen. South. Med. J. **2011**; 104:509–514.

25. Liu P-Y, Huang Y-F, Tang C-W, et al. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis- a literature review and analysis of risk factors. J. Microbiol. Immunol. Infect. **2010**; 43:478–484.

26. Miro JM, Anguera I, Cabell CH, et al. *Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2005**; 41:507–514.

27. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management.

Clin. Microbiol. Rev. **2015**; 28:603–661.

28. Petti CA, Simmon KE, Miro JM, et al. Genotypic Diversity of Coagulase-Negative Staphylococci Causing Endocarditis: a Global Perspective. J. Clin. Microbiol. **2008**; 46:1780–1784.

29. Lin J-F, Cheng C-W, Kuo A-J, et al. Clinical experience and microbiologic characteristics of invasive *Staphylococcus lugdunensis* infection in a tertiary center in northern Taiwan. J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi **2015**; 48:406–412.

30. Shah NB, Osmon DR, Fadel H, et al. Laboratory and Clinical Characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* Prosthetic Joint Infections. J. Clin. Microbiol. **2010**; 48:1600–1603.

31. Lourtet-Hascoët J, Bicart-See A, Félicé MP, Giordano G, Bonnet E. *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. **2016**; 51:56–61.

32. Li YM, Blaskiewicz DJ, Hall WA. Shunt-related intracranial abscess caused by *Staphylococcus lugdunensis* in a hydranencephalic patient. World Neurosurg. **2013**; 80:e387-389.

33. Bhumbra S, Mahboubi M, Blackwood RA. *Staphylococcus lugdunensis*: Novel Organism causing Cochlear Implant Infection. Infect. Dis. Rep. **2014**; 6:5406.

34. Tibebu M. Severe hospital acquired pneumonia and septicemia due TO methicillin resistant *Staphylococcus lugdunensis* in a newborn in Northwestern Ethiopia. Ethiop. Med. J. **2014**; 52:99–101.

35. Hayakawa I, Hataya H, Yamanouchi H, Sakakibara H, Terakawa T. Neonatal *Staphylococcus lugdunensis* urinary tract infection. Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc. **2015**; 57:783–785.

36. Bieber L, Kahlmeter G. *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. Clin. Microbiol. Infect. **2010**; 16:385–388.

37. van der Mee-Marquet N, Achard A, Mereghetti L, Danton A, Minier M, Quentin R. *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. J. Clin. Microbiol. **2003**; 41:1404–1409.

38. Ho P-L, Leung SM-H, Chow K-H, et al. Carriage niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **2015**; 81:141–144.

39. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect. Dis. **2012**; 13:43-54.

40. Kong C, Neoh H, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. Toxins **2016**; 15;8(3).

41. Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. Nat. Rev. Microbiol. **2015**; 13:529–543.

42. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? Front. Cell. Infect. Microbiol. **2012**; 16;2:12.

43. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. RFL. **2008**; 38:61-69.

44. Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS Microbiol. Rev. **2004**; 28:183–200.

45. Dunman PM, Murphy E, Haney S, et al. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. J. Bacteriol. **2001**; 183:7341–7353.

46. Tsompanidou E, Sibbald MJJB, Chlebowicz MA, et al. Requirement of the agr Locus for Colony Spreading of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **2011**; 193:1267–1272.

47. Singh R, Ray P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. Future Microbiol. **2014**; 9:669–681.

48. CNR Staphylocoques. Centre National de Référence des Staphylocoques - Détection des gènes de toxines. 2017. Available at: http://cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr/webapp/website/website.html?id=2021394&pageId=129381. Accessed 31 January 2017.

49. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Rev. Francoph. Lab. **2008**; 2008:61–69.

50. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. Curr. Opin. Microbiol. **2014**; 17:32–37.

51. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat. Rev. Microbiol. **2014**; 12:49–62.

52. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin. Microbiol. Rev. **2013**; 26:422–447.

53. Lacey KA, Geoghegan JA, McLoughlin RM. The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. Pathog. Basel Switz. **2016**; 5.

54. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Annu. Rev. Microbiol. **2010**; 64:143–162.

55. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. The Lancet **2002**; 359:753–759.

56. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science **2007**; 315:1130–1133.

57. Tseng CW, Biancotti JC, Berg BL, et al. Increased Susceptibility of Humanized NSG Mice to Panton-Valentine Leukocidin and *Staphylococcus aureus* Skin Infection. PLOS Pathog. **2015**; 11:e1005292.

58. Alonzo F, Torres VJ. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR **2014**; 78:199–230.

59. Koop G, Vrieling M, Storisteanu DML, et al. Identification of LukPQ, a novel, equid-adapted leukocidin of *Staphylococcus aureus*. Sci. Rep. **2017**; 20;7:40660.

60. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat. Rev. Microbiol. **2005**; 3:948–958.

61. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin. Immunopathol. **2011**; 34:201–214.

62. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kränzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. Int. J. Antimicrob. Agents **2006**; 28:14–20.

63. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat. Rev. Microbiol. **2006**; 4:295–305.

64. Crompton MJ, Dunstan RH, Macdonald MM, Gottfries J, von Eiff C, Roberts TK. Small Changes in Environmental Parameters Lead to Alterations in Antibiotic Resistance, Cell Morphology and Membrane Fatty Acid Composition in *Staphylococcus lugdunensis*. PLoS ONE **2014**; 8;9:e92296.

65. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. **2006**; 19:491–511.

66. Heilbronner S, Holden MTG, van Tonder A, et al. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence. FEMS Microbiol. Lett. **2011**; 322:60–67.

67. Mirani ZA, Aziz M, Khan SI. Small colony variants have a major role in stability and persistence of *Staphylococcus aureus* biofilms. J. Antibiot. (Tokyo) **2015**; 68:98–105.

68. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N. Engl. J. Med. **2007**; 357:654–663.

69. Hughes JG, Vetter EA, Patel R, et al. Culture with BACTEC Peds Plus/F Bottle

Compared with Conventional Methods for Detection of Bacteria in Synovial Fluid. J. Clin. Microbiol. **2001**; 39:4468–4471.

70. Lynne Shore Garcia, Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. 3th edition. ASM Press, 2007.

71. Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. Clin. Microbiol. Rev. **2008**; 21:111–133.

72. Pinsky BA, Samson D, Ghafghaichi L, Baron EJ, Banaei N. Comparison of Real-Time PCR and Conventional Biochemical Methods for Identification of *Staphylococcus lugdunensis*. J. Clin. Microbiol. **2009**; 47:3472–3477.

73. Elamin WF, Ball D, Millar M. Unbiased Species-Level Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci: Does It Change the Perspective on *Staphylococcus lugdunensis*? J. Clin. Microbiol. **2015**; 53:292–294.

74. O'Neill AJ, McLaws F, Kahlmeter G, Henriksen AS, Chopra I. Genetic Basis of Resistance to Fusidic Acid in Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**; 51:1737–1740.

75. Tse H, Tsoi HW, Leung SP, Lau SKP, Woo PCY, Yuen KY. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus lugdunensis* Strain HKU09-01. J. Bacteriol. **2010**; 192:1471–1472.

76. Chassain B, Lemee L, Didi J, et al. Multilocus Sequence Typing Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Implies a Clonal Population Structure. J. Clin. Microbiol. **2012**; 50:3003–3009.

77. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of*Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **2000**; 38:1008–1015.

78. Larsen J, Enright MC, Godoy D, Spratt BG, Larsen AR, Skov RL. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus aureus*: Revision of the gmk Locus. J. Clin. Microbiol. **2012**; 50:2538–2539.

79. Didi J, Lemée L, Gibert L, Pons J-L, Pestel-Caron M. Multi-Virulence Locus Sequence Typing of *Staphylococcus lugdunensis* is consistent with clonal structure and reliable for epidemiological typing. J. Clin. Microbiol. **2014**;

80. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain J-M. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. Int. J. Antimicrob. Agents **2009**; 34:467–470.

81. Dauwalder O, Carbonnelle E, Benito Y, et al. Detection of Panton-Valentine toxin in *Staphylococcus aureus* by mass spectrometry directly from colony: time has not yet come. Int. J. Antimicrob. Agents **2010**; 36:193–194.

82. Szabados F, Becker K, von Eiff C, Kaase M, Gatermann S. The matrix-assisted laser

desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Panton-Valentine leukocidin. Int. J. Med. Microbiol. IJMM **2011**; 301:58–63.

83. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. PloS One **2012**; 7:e40660.

84. Valour F, Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, et al. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2015**; 21:568.e1-11.

85. Egli A, Tschudin-Sutter S, Oberle M, Goldenberger D, Frei R, Widmer AF. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing of Extended-Spectrum β-Lactamase Producing E. coli – A Novel Tool for Real-Time Outbreak Investigation. PLoS ONE **2015**; 10;10:e0120624.

86. Christner M, Trusch M, Rohde H, et al. Rapid MALDI-TOF Mass Spectrometry Strain Typing during a Large Outbreak of Shiga-Toxigenic Escherichia coli. PLoS ONE **2014**; 8;9:e101924.

87. Mencacci A, Monari C, Leli C, et al. Typing of Nosocomial Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. **2013**; 51:603–606.

88. Moussaoui L. Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques. Strasbourg, 2012. Available at: http://www.theses.fr/2012STRAJ124. Accessed 3 February 2017.

89. M. Fraser C. Microbial Genomes. Springer, Available at: http://www.springer.com/us/book/9781588291899. Accessed 4 February 2017.

90. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life. Nat. Rev. Genet. **2015**; 16:472–482.

91. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat. Rev. Microbiol. **2005**; 3:711–721.

92. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect. Genet. Evol. **2008**; 8:747–763.

93. Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. Int. J. Med. Microbiol. **2014**; 304:103–109.

94. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. **2010**; 300:98–103.

95. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life Sci. CMLS **2010**; 67:3057–3071.

96. Sadykov MR. Restriction-Modification Systems as a Barrier for Genetic Manipulation of *Staphylococcus aureus*. Methods Mol. Biol. Clifton NJ **2016**; 1373:9–23.

97. Monk IR, Foster TJ. Genetic manipulation of Staphylococci—breaking through the barrier. Front. Cell. Infect. Microbiol. **2012**; 12;2:49.

98. Ramsay JP, Kwong SM, Murphy RJT, et al. An updated view of plasmid conjugation and mobilization in Staphylococcus. Mob. Genet. Elem. **2016**; 1;6:e1208317.

99. Xia G, Wolz C. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. **2014**; 21:593–601.

100. Lang AS, Zhaxybayeva O, Beatty JT. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. Nat. Rev. Microbiol. **2012**; 10:472–482.

101. Novick RP, Christie GE, Penadés JR. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. Nat. Rev. Microbiol. **2010**; 8:541–551.

102. Bosi E, Monk JM, Aziz RK, Fondi M, Nizet V, Palsson BØ. Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. **2016**; 113:E3801–E3809.

103. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, Cruz F de la. Mobility of Plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **2010**; 74:434–452.

104. Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. FEMS Microbiol. Rev. **2011**; 35:936–956.

105. European Nucleotide Archive. Genomes Pages - Plasmid. 2016. Available at: http://www.ebi.ac.uk/genomes/plasmid.html. Accessed 29 September 2016.

106. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Front. Microbiol. **2015**; 31;6:242.

107. Poitevin-Later F, Vandenesch F, Dyke K, Fleurette J, Etienne J. Cadmium-resistance plasmid in *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol. Lett. **1992**; 78:59–63.

108. Jensen LB, Garcia-Migura L, Valenzuela AJS, Løhr M, Hasman H, Aarestrup FM. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. J. Microbiol. Methods **2010**; 80:25–43.

109. Guglielmini J, Néron B, Abby SS, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EPC. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. Nucleic Acids Res. **2014**; 42:5715–5727.

110. Goessweiner-Mohr N, Arends K, Keller W, Grohmann E. Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. Plasmid **2013**; 70:289–302.

111. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR **2009**; 73:775–808.

112. McCarthy AJ, Lindsay JA. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. BMC Microbiol. **2012**; 12:104.

113. San Millan A, Peña-Miller R, Toll-Riera M, et al. Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. Nat. Commun. **2014**; 5:5208.

114. O'Brien FG, Yui Eto K, Murphy RJT, et al. Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res. **2015**; 43:7971–7983.

115. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017. Available at: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/. Accessed 6 February 2017.

116. Deghorain M, Van Melderen L. The Staphylococci phages family: an overview. Viruses **2012**; 4:3316–3335.

117. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. Nat. Rev. Microbiol. **2013**; 11:675–687.

118. Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. Nat. Rev. Microbiol. **2015**; 13:777–786.

119. Deghorain M, Van Melderen L. The Staphylococci Phages Family: An Overview. Viruses **2012**; 4:3316–3335.

120. McCarthy AJ, Loeffler A, Witney AA, Gould KA, Lloyd DH, Lindsay JA. Extensive horizontal gene transfer during *Staphylococcus aureus* co-colonization in vivo. Genome Biol. Evol. **2014**; 6:2697–2708.

121. Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. FEMS Microbiol. Rev. **2014**; 38:865–891.

122. Muñoz-López M, García-Pérez JL. DNA transposons: nature and applications in genomics. Curr. Genomics **2010**; 11:115–128.

123. Carraro N, Burrus V. The dualistic nature of integrative and conjugative elements. Mob. Genet. Elem. **2015**; 5:98–102.

124. Wozniak RAF, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nat. Rev. Microbiol. **2010**; 8:552–563.

125. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights. Int. J. Med. Microbiol. IJMM **2013**; 303:350–359.

126. Garza-González E, Morfín-Otero R, Llaca-Díaz JM, Rodriguez-Noriega E. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. Epidemiol. Infect. **2010**; 138:645–654.

127. Garza-González E, López D, Pezina C, et al. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance. J. Med. Microbiol. **2010**; 59:323–329.

128. Langille MGI, Hsiao WWL, Brinkman FSL. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. Nat. Rev. Microbiol. **2010**; 8:373–382.

129. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. Fems Microbiol. Rev. **2009**; 33:376–393.

130. Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2008. Available at: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm_2008.pdf.

131. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Recommandations. 2014. Available at: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_0_2014.pdf.

132. European Society of Clinical Microbiolog and Infectious Diseases. European Manual of Clinical Microbiology. 2012. Available at: http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/124.html.

133. Souvenir D, Anderson DE, Palpant S, et al. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. J. Clin. Microbiol. **1998**; 36:1923–1926.

134. Fadel HJ, Patel R, Vetter EA, Baddour LM. Clinical Significance of a Single *Staphylococcus lugdunensis*-Positive Blood Culture. J. Clin. Microbiol. **2011**; 49:1697–1699.

135. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, et al. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. **2012**; :cis803.

136. Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ. Quantitative Culture of Intravenous Catheters and Other Intravascular Inserts. J. Infect. Dis. **1980**; 141:781–786.

137. Brunbuisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of Central Venous Catheter-Related Sepsis - Critical-Level of Quantitative Tip Cultures. Arch. Intern. Med. **1987**; 147:873–877.

138. de Decker L. L'indice de co-morbidité de Charlson. Ann. Gérontologie **2009**; 2:159–160.

139. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. **2013**; 26:547–603.

140. Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

spectrometry in clinical microbiology. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2013**; 57:564–572.

141. Lloyd S, Mohseni M, Rebentrost P. Quantum principal component analysis. Nat. Phys. **2014**; 10:631–633.

142. Arrecubieta C, Matsunaga I, Asai T, Naka Y, Deng MC, Lowy FD. Vaccination with clumping factor A and fibronectin binding protein A to prevent *Staphylococcus aureus* infection of an aortic patch in mice. J. Infect. Dis. **2008**; 198:571–575.

143. Kocianova S, Vuong C, Yao Y, et al. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. J. Clin. Invest. **2005**; 115:688–694.

144. Szabados F, Nowotny Y, Marlinghaus L, et al. Occurrence of genes of putative fibrinogen binding proteins and hemolysins, as well as of their phenotypic correlates in isolates of *S. lugdunensis* of different origins. BMC Res. Notes **2011**; 4:113.

145. Hébert GA. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and Staphylococcus schleiferi. J. Clin. Microbiol. **1990**; 28:2425–2431.

146. Vandenesch F, Storrs MJ, Poitevin-Later F, Etienne J, Courvalin P, Fleurette J. Delta-like haemolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol. Lett. **1991**; 62:65–68.

147. Donvito B, Etienne J, Denoroy L, Greenland T, Benito Y, Vandenesch F. Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. Infect. Immun. **1997**; 65:95–100.

148. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **1976**; 72:248–254.

149. Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, Strijp JAG van, Horswill AR, Rooijakkers SHM. *Staphylococcus aureus* Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 To Mediate Immune Evasion. J. Immunol. **2011**; 186:6445–6453.

150. Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, et al. Two allelic forms of the aureolysin gene (aur) within *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **2000**; 68:973–976.

151. 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**; 13:759–772.

152. Co&#xea, Lho DF, Saturnino TP, et al. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. BioMed Res. Int. **2016**; 2016:e8409183.

153. Paget MS, Helmann JD. The σ70 family of sigma factors. Genome Biol. **2003**; 4:203.

154. Shine J, Dalgarno L. The 3′-Terminal Sequence of Escherichia coli 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1974**; 71:1342–1346.

155. Ciampi MS. Rho-dependent terminators and transcription termination. Microbiology **2006**; 152:2515–2528.

156. André E, Bastide L, Michaux-Charachon S, et al. Novel synthetic molecules targeting the bacterial RNA polymerase assembly. J. Antimicrob. Chemother. **2006**; 57:245–251.

157. Chang T-H, Huang H-Y, Hsu JB-K, Weng S-L, Horng J-T, Huang H-D. An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. BMC Bioinformatics **2013**; 14:S4.

158. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods **2011**; 8:785–786.

159. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat. Rev. Genet. **2016**; 17:333–351.

160. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Galaxy Team. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. Genome Biol. **2010**; 11:R86.

161. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol. **2012**; 19:455–477.

162. Swain MT, Tsai IJ, Assefa SA, Newbold C, Berriman M, Otto TD. A Post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. Nat. Protoc. **2012**; 7:1260–1284.

163. Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. Bioinforma. Oxf. Engl. **2009**; 25:1968–1969.

164. Tsai IJ, Otto TD, Berriman M. Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps. Genome Biol. **2010**; 11:R41.

165. Otto TD, Sanders M, Berriman M, Newbold C. Iterative Correction of Reference Nucleotides (iCORN) using second generation sequencing technology. Bioinforma. Oxf. Engl. **2010**; 26:1704–1707.

166. Carver T, Berriman M, Tivey A, et al. Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. Bioinformatics **2008**; 24:2672–2676.

167. Bryson K, Loux V, Bossy R, et al. AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system. Nucleic Acids Res. **2006**; 34:3533–3545.

168. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. Integrative Genomics Viewer. Nat. Biotechnol. **2011**; 29:24–26.

169. GO consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. Nucleic Acids Res. **2004**; 32:D258–D261.

170. GO consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. Nucleic Acids Res. **2015**; 43:D1049–D1056.

171. GO consortium. GO Slim and Subset Guide | Gene Ontology Consortium. Available at: http://www.geneontology.org/page/go-slim-and-subset-guide. Accessed 30 January 2017.

172. Jones P, Binns D, Chang H-Y, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinforma. Oxf. Engl. **2014**; 30:1236–1240.

173. Mitchell A, Chang H-Y, Daugherty L, et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. Nucleic Acids Res. **2015**; 43:D213-221.

174. Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. BMC Genomics **2011**; 12:402.

175. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. PLOS ONE **2014**; 9:e104984.

176. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. Nucleic Acids Res. **2011**; 39:W347-352.

177. Arndt D, Grant JR, Marcu A, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. **2016**; 44:W16-21.

178. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. **2009**; 10:R25.

179. Che D, Hasan MS, Chen B. Identifying Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenomics Using Computational Approaches. Pathogens **2014**; 3:36–56.

180. Dhillon BK, Laird MR, Shay JA, et al. IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. Nucleic Acids Res. **2015**; 43:W104–W108.

181. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2007**; 8:221–233.

182. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases: role in skeletal development and growth plate disorders. Front. Biosci. J. Virtual Libr. **2006**; 11:1702–1715.

183. Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. How proteases regulate bone morphogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. **2003**; 995:109–116.

184. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of

proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res. **2014**; 42:D503–D509.

185. Tang SY, Herber R-P, Ho SP, Alliston T. Matrix metalloproteinase-13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. **2012**; 27:1936–1950.

186. Lynch CC. Matrix metalloproteinases as master regulators of the vicious cycle of bone metastasis. Bone **2011**; 48:44–53.

187. Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. Front. Cell. Infect. Microbiol. **2015**; 5:85.

188. Jafar N, Edriss H, Nugent K. The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System. Am. J. Med. Sci. **2016**; 351:201–211.

189. Stegenga ME, van der Crabben SN, Blümer RME, et al. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. Blood **2008**; 112:82–89.

190. Pahwa R, Nallasamy P, Jialal I. Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial cell inflammation and perturbation of the endothelial glycocalyx. J. Diabetes Complications **2016**; 30:563–572.

191. Rajamani U, Jialal I. Hyperglycemia induces Toll-like receptor-2 and -4 expression and activity in human microvascular retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. J. Diabetes Res. **2014**; 2014:790902.

192. Ghosh P, Sahoo R, Vaidya A, Chorev M, Halperin JA. Role of Complement and Complement Regulatory Proteins in the Complications of Diabetes. Endocr. Rev. **2015**; 36:272–288.

193. Eka A, Chen AF. Patient-related medical risk factors for periprosthetic joint infection of the hip and knee. Ann. Transl. Med. **2015**; 3:233.

194. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat. Rev. Microbiol. **2016**; 14:563–575.

195. Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. Acta Orthop. **2015**; 86:147–158.

196. Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. J. Antimicrob. Chemother. **2014**; 69 Suppl 1:i37-40.

197. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. **2004**; 2:95–108.

198. Frank KL, Patel R. Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by icaADBC-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. Infect. Immun. **2007**; 75:4728–4742.

199. Jenny J-Y, Barbe B, Gaudias J, Boeri C, Argenson J-N. High infection control rate

and function after routine one-stage exchange for chronically infected TKA. Clin. Orthop. **2013**; 471:238–243.

200. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2014**; 20:981–990.

201. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. **2014**; 28;4:99.

202. Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. J. Dent. Res. **2003**; 82:687–691.

203. Ross JS, Kaur P, Sheehan CE, Fisher HAG, Kaufman RA, Kallakury BVS. Prognostic Significance of Matrix Metalloproteinase 2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 Expression in Prostate Cancer. Mod. Pathol. **2003**; 16:198–205.

204. Hu J, Van den Steen PE, Sang Q-XA, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. Nat. Rev. Drug Discov. **2007**; 6:480–498.

205. Honibald EN, Mathew S, Padmanaban J, Sundaram E, Ramamoorthy RD. Perioceutics: Matrix metalloproteinase inhibitors as an adjunctive therapy for inflammatory periodontal disease. J. Pharm. Bioallied Sci. **2012**; 4:S417–S421.

206. Tasse J, Croisier D, Badel-Berchoux S, et al. Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®. Pathog. Dis. **2016**; 74.

207. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **2012**; 65:183–195.

208. Raya RR, H'bert EM. Isolation of Phage via Induction of Lysogens. Methods Mol. Biol. Clifton NJ **2009**; 501:23–32.

209. Zhu K, Jin H, He Z, Zhu Q, Wang B. A continuous method for the large-scale extraction of plasmid DNA by modified boiling lysis. Nat. Protoc. **2006**; 1:3088–3093.

210. Andreou L-V. Isolation of plasmid DNA from bacteria. Methods Enzymol. **2013**; 529:135–142.

211. Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2016**; 22:161.e1-7.

212. Josten M, Reif M, Szekat C, et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations

that allow differentiation of the main clonal lineages. J. Clin. Microbiol. **2013**; 51:1809–1817.

213. Wolters M, Rohde H, Maier T, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. Int. J. Med. Microbiol. IJMM **2011**; 301:64–68.

214. Lasch P, Fleige C, Stämmler M, et al. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of Enterococcus faecium and *Staphylococcus aureus* isolates. J. Microbiol. Methods **2014**; 100:58–69.

215. Mainini V, Bovo G, Chinello C, et al. Detection of high molecular weight proteins by MALDI imaging mass spectrometry. Mol. BioSyst. **2013**; 9:1101–1107.

216. Meetani MA, Voorhees KJ. MALDI mass spectrometry analysis of high molecular weight proteins from whole bacterial cells: pretreatment of samples with surfactants. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2005**; 16:1422–1426.

217. Ebright JR, Penugonda N, Brown W. Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **2004**; 48:17–21.

218. Tan TY, Ng SY, Ng WX. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci recovered from nonsterile sites. J. Clin. Microbiol. **2006**; 44:3413–3414.

219. Hellbacher C, Törnqvist E, Söderquist B. *Staphylococcus lugdunensis*: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2006**; 12:43–49.

220. Kleiner E, Monk AB, Archer GL, Forbes BA. Clinical Significance of *Staphylococcus lugdunensis* Isolated from Routine Cultures. Clin. Infect. Dis. **2010**; 51:801–803.

221. Arias M, Tena D, Apellániz M, et al. Skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus lugdunensis*: report of 20 cases. Scand. J. Infect. Dis. **2010**; 42:879–884.

222. Wu A-B, Wang M-C, Tseng C-C, et al. Clinical and Microbiological Characteristics of Community-Acquired *Staphylococcus lugdunensis* Infections in Southern Taiwan. J. Clin. Microbiol. **2011**; 49:3015–3018.

223. Liang M, Mansell C, Wade C, Fisher R, Devlin G. Unusually virulent coagulase-negative *Staphylococcus lugdunensis* is frequently associated with infective endocarditis: a Waikato series of patients. N. Z. Med. J. **2012**; 125:51–59.

224. Tsao Y-T, Wang W-J, Lee S-W, Hsu J-C, Ho F-M, Chen W-L. Characterization of *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis in patients with cardiac implantable electronic devices. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. **2012**; 16:e464-467.

225. Liu C, Shen D, Guo J, et al. Clinical and microbiological characterization of *Staphylococcus lugdunensis* isolates obtained from clinical specimens in a hospital in China. BMC Microbiol. **2012**; 12:168.

226. Galvez-Acebal J, Morales I, Georgieva RI, et al. *Staphylococcus lugdunensis* endocraditis: multicenter study of 17 cases. Int. J. Antimicrob. Agents **2013**; 41, Supplement 1:S21–S22.

227. Giormezis N, Kolonitsiou F, Makri A, et al. Virulence factors among *Staphylococcus lugdunensis* are associated with infection sites and clonal spread. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2014**; 34(4):773-8.

228. Tseng S-P, Lin Y-T, Tsai J-C, et al. Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteremia. J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi **2013**; 48(4):397-405.

229. Vandenesch F, Projan SJ, Kreiswirth B, Etienne J, Novick RP. Agr-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol. Lett. **1993**; 111:115–122.

230. Paulsson M, Petersson A-C, Ljungh \AAsa. Serum and tissue protein binding and cell surface properties of *Staphylococcus lugdunensis*. J. Med. Microbiol. **1993**; 38:96–102.

231. Nilsson M, Bjerketorp J, Wiebensjö A, Ljungh A, Frykberg L, Guss B. A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol. Lett. **2004**; 234:155–161.

232. Mitchell J. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. Microbiology **2004**; 150:3831–3841.

233. Nilsson M, Bjerketorp J, Guss B, Frykberg L. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol. Lett. **2004**; 241:87–93.

234. Geoghegan JA, Ganesh VK, Smeds E, Liang X, Hook M, Foster TJ. Molecular Characterization of the Interaction of Staphylococcal Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with Fibrinogen. J. Biol. Chem. **2009**; 285:6208–6216.

235. Vasconcelos NG, Pereira VC, Araújo Júnior JP, da Cunha M de LRS. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil: Detection of enterotoxins in *Staphylococcus spp.* J. Appl. Microbiol. **2011**; 111:749–762.

236. Haley KP, Janson EM, Heilbronner S, Foster TJ, Skaar EP. *Staphylococcus lugdunensis* IsdG Liberates Iron from Host Heme. J. Bacteriol. **2011**; 193:4749–4757.

237. Szabados F, Marlinghaus L, Korte M, Neumann S, Kaase M, Gatermann SG. Fbl is not involved in the invasion of eukaryotic epithelial and endothelial cells by *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol. Lett. **2011**; 324:48–55.

238. Marlinghaus L, Becker K, Korte M, Neumann S, Gatermann SG, Szabados F. Construction and characterization of three knockout mutants of the fbl gene in *Staphylococcus lugdunensis*: characterization of isogenic mutants of FBL. APMIS **2012**; 120:108–116.

239. Zapotoczna M, Heilbronner S, Speziale P, Foster TJ. Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. J. Bacteriol. **2012**; 194:6453–6467.

240. Lu Y, Wang Y, Ling B, et al. Catalase-Negative *Staphylococcus lugdunensis* Strain with a Novel Point Mutation in the Catalase Gene Isolated from a Patient with Chronic Suppurative Otitis Media. J. Clin. Microbiol. **2013**; 51:1310-2.

241. Heilbronner S, Hanses F, Monk IR, Speziale P, Foster TJ. Sortase A promotes virulence in experimental *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. Microbiol. Read. Engl. **2013**; 159:2141-52.

242. Gibert L, Didi J, Marlinghaus L, et al. The major autolysin of *Staphylococcus lugdunensis*, AtlL, is involved in cell separation, stress-induced autolysis and contributes to bacterial pathogenesis. FEMS Microbiol. Lett. **2014**; 352:78-86.

243. Missineo A, Di Poto A, Geoghegan JA, et al. IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* Induces Biofilm Formation under Low-Iron Growth Conditions. Infect. Immun. **2014**; 82:2448-59.

244. Hussain M, Steinbacher T, Peters G, Heilmann C, Becker K. The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization. Int. J. Med. Microbiol. IJMM **2015**; 305:129-39.

245. Farrand AJ, Haley KP, Lareau NM, et al. An Iron-Regulated Autolysin Remodels the Cell Wall To Facilitate Heme Acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. Infect. Immun. **2015**; 83:3578–3589.

246. Rajendran NB, Eikmeier J, Becker K, Hussain M, Peters G, Heilmann C. Important Contribution of the Novel Locus comEB to Extracellular DNA-Dependent *Staphylococcus lugdunensis* Biofilm Formation. Infect. Immun. **2015**; 83(12):4682-92.

247. Liesenborghs L, Peetermans M, Claes J, et al. Shear-resistant Binding to Von Willebrand Factor Allows *Staphylococcus lugdunensis* to Adhere to the Cardiac Valves and Initiate Endocarditis. J. Infect. Dis. **2016**; 1;213(7):1148-56.

248. Heilbronner S, Monk IR, Brozyna JR, et al. Competing for Iron: Duplication and Amplification of the isd Locus in *Staphylococcus lugdunensis* HKU09-01 Provides a Competitive Advantage to Overcome Nutritional Limitation. PLOS Genet. **2016**; 12:e1006246.

Xavier ARGEMI

# Etude de la virulence de *Staphylococcus lugdunensis*

**Résumé**

*Staphylococcus lugdunensis* est un staphylocoque à coagulase négative qui présente de nombreuses particularités sur le plan clinique et microbiologique. Cette bactérie commensale de la peau est impliquée dans des infections humaines d'une particulière gravité. Ce travail de thèse nous a permis de déterminer que *S. lugdunensis* présente bien une pathogénicité tout à fait inhabituelle pour un SCN car 37.2% de toutes les souches recueillies entre 2013 et 2016 étaient impliquées dans un processus infectieux. Nous avons aussi observé que les infections ostéo-articulaires en étaient la première manifestation. Nous avons découvert une nouvelle protéase excrétée par 61.7% des souches qui présente une association statistique forte avec les infections ostéo-articulaires. Il s'agit d'une métalloprotéase de 37 kDa que nous avons pu purifier puis séquencer afin de caractériser ses propriétés biochimiques et son environnement génique. Enfin, nous avons aussi réalisé un séquençage *de novo* de 7 souches de *S. lugdunensis* et démontrer l'existence de multiples éléments génétiques mobiles.

**Mots clés : *Staphylococcus lugdunensis,* infections ostéo-articulaires, métalloprotéase, facteur de virulence, éléments génétiques mobiles.**

**Abstract**

*Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase negative staphylococcus species that may causes various infections of unusual severity. We conducted a translational study with a prospective clinical trial that aimed to describe *S. lugdunensis* infections and its real pathogenicity, associated with a systematic research of *in vitro* putative virulence factors. The final objective was to determine the statistical relationship between those two and find a putative real virulence factor. This trial was conducted between 2013 and 2016. It showed that *S. lugdunensis* displayed a high level of pathogenicity as 37.2% of all strains isolated came from infected patients and most of those infections were osteoarticular infections. We discovered a new protease that we named lugdulysin and that was strongly associated with osteoarticular infections. This secreted protein of 37 kDa was purified and sequenced, we characterized its chemical properties and the nucleotide environment of the coding sequence. We also achieved *de novo* sequencing of 7 strains of *S. lugdunensis* and found that several mobile genetic elements belonged to the sequences as plasmids and prophages.

**Keywords : *Staphylococcus lugdunensis*, osteo-articular infections, metalloprotease, virulence factor, mobile genetic elements.**