

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	1
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	9
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	13
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	17
<b>INTRODUCTION.....</b>	21
<b>1. STAPHYLOCOCCUS LUGDUNENSIS.....</b>	25
<b>1.1. Caractères généraux.....</b>	25
1.1.1. Caractères microbiologiques.....	25
1.1.2. Sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourds.....	29
1.1.3. Habitat.....	33
1.1.4. Infections à <i>S. lugdunensis</i> .....	35
1.1.5. Données génomiques.....	45
<b>2. VIRULENCE DE <i>S. LUGDUNENSIS</i>.....</b>	51
<b>2.1. Facteurs de colonisation et de virulence.....</b>	51
2.1.1. Facteurs de colonisation.....	51
2.1.2. Les hémolysines.....	79
2.1.3. La lugdulysine.....	83
2.1.4. La lugdunine.....	85
2.1.5. Échappement au système immunitaire.....	87
2.1.6. Le système de sécrétion Ess/type VII.....	99
<b>2.2. La régulation de la virulence.....</b>	103
2.2.1. Le système Agr.....	103
2.2.2. Le système LytSR.....	125
<b>3. LE MÉTABOLISME DU FER CHEZ <i>S. LUGDUNENSIS</i>.....</b>	131
<b>3.1. Généralités sur le fer.....</b>	131
<b>3.2. Acquisition du fer.....</b>	131
3.2.1. Acquisition du fer dépendante de l'hème.....	133
3.2.2. Acquisition du fer indépendante de l'hème.....	149

<b>TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX</b> .....	151
<b>1. LES OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE</b> .....	153
<b>2. LES TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX</b> .....	155
<b>2.1. Étude du régulateur transcriptionnel AgrA de <i>S. lugdunensis</i></b> .....	155
2.1.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude.....	155
2.1.2. Publication n°1.....	165
<b>2.2. Analyse génomique comparative de souches pathogènes et portage de <i>S. lugdunensis</i></b> .....	199
2.2.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude.....	199
2.2.2. Publication n°2.....	205
<b>2.3. Étude de la réponse à la limitation en fer chez <i>S. lugdunensis</i></b> .....	227
2.3.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude.....	227
2.3.2. Publication n°3.....	233
<b>2.4. Étude du stimulon de la limitation en fer chez <i>S. lugdunensis</i></b> .....	245
2.4.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude.....	245
2.4.2. Publication n°4.....	253
<b>CONCLUSION</b> .....	265
<b>1. ÉTUDE DU RÉGULATEUR AgrA DE <i>S. LUGDUNENSIS</i></b> .....	273
<b>2. ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA CONCENTRATION EN FER CHEZ <i>S. LUGDUNENSIS</i></b> .....	285
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	293
<b>ANNEXES</b> .....	311
<b>RÉSUMÉ</b> .....	319



# **LISTE DES FIGURES**

---



**Figure 1** : Observation microscopique de la coloration de Gram des cellules de *S. lugdunensis* (image x1000).

**Figure 2** : Observation macroscopique de différents types de colonies de *S. lugdunensis* sur des géloses supplémentées avec du sang de mouton après 24 h d'incubation à 37 °C.

**Figure 3** : Schéma de catégorisation clinique et épidémiologique des espèces de staphylocoques, basé sur la présence de la coagulase comme facteur majeur de virulence et son impact sur la santé humaine.

**Figure 4** : Exemples d'infections de la peau et des tissus mous par *S. lugdunensis*.

**Figure 5** : Diagramme circulaire schématique du chromosome de *S. lugdunensis* N920143.

**Figure 6** : Les différentes étapes de l'ancrage d'une protéine de surface à la paroi bactérienne.

**Figure 7** : Représentation schématique de la protéine Fbl de *S. lugdunensis*.

**Figure 8** : Représentation schématique de la protéine Fbl de *S. lugdunensis* et de la protéine ClfA de *S. aureus*.

**Figure 9** : Adhérence des souches mutantes pour le gène *fbl* de *S. lugdunensis* au fibrinogène en phase solide.

**Figure 10** : Schéma de deux protéines de surface ancrées à la paroi cellulaire, Fbl et vWbl, de *S. lugdunensis*.

**Figure 11** : Liaison entre les cellules de *S. lugdunensis* et le vWf en condition de micro-circulation sanguine.

**Figure 12** : Liaison au collagène de la souche *S. lugdunensis* N920143 et du mutant *S. lugdunensis* dépourvu du gène *vWbl* en présence ou en l'absence de vWf.

**Figure 13** : Représentation schématique des autolysines staphylococciques de type « Atl homologues ».

**Figure 14** : Organisation générale de l'AtlL de *S. lugdunensis*, l'AtlA de *S. aureus* et l'AtlE de *S. epidermidis* avec leurs pourcentages d'homologie en acides aminés.

**Figure 15** : Virulence de la souche sauvage DSM4804 de *S. lugdunensis* et du mutant  $\Delta$ atlL en modèle *C. elegans*.

**Figure 16** : Schéma des 7 SIs (de A à G) identifiées chez *S. lugdunensis*.

**Figure 17** : Pathogénèse des infections liées aux cathéters et facteurs influençant la genèse du biofilm.

**Figure 18** : Pathogénèse de la formation de biofilm sur un cathéter.

**Figure 19** : Illustration schématique montrant les étapes de la formation du biofilm staphylococcique influencée par les protéines de surface MSCRAMM ancrées dans la paroi cellulaire.

**Figure 20** : La voie de synthèse du PIA/PNAG grâce au locus *ica*.

**Figure 21** : Caractérisation de la formation de biofilm des isolats cliniques de *S. lugdunensis*.

**Figure 22** : Évaluation de la MEC du biofilm de *S. lugdunensis* et de *S. epidermidis* à l'aide de la microscopie confocale à balayage laser.

**Figure 23** : Organisation génomique du locus *icaADBC* de *S. lugdunensis* en comparaison avec celui de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. caprae*.

**Figure 24** : Implication du gène *comEB* dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*.

**Figure 25** : L'activité hémolytique synergique de *S. lugdunensis* évaluée par Camp-test.



**Figure 26** : Similitudes des peptides Slush de *S. lugdunensis* par alignement des séquences en acides aminés avec des peptides PSM de type  $\beta$  staphylococciques.

**Figure 27** : La lugdunine de *S. lugdunensis*.

**Figure 28** : Test de bioactivité de la lugdunine avec *S. lugdunensis* IVK28 sauvage, le mutant  $\Delta lugD$  et le mutant complémenté contre *S. aureus* USA300.

**Figure 29** : Facteurs d'échappement immunitaire de *S. aureus* dans un macrophage.

**Figure 30** : Interaction entre le lysozyme et le peptidoglycane staphylococcique.

**Figure 31** : Tests d'infection *in vitro* évaluant la capacité des souches de *S. lugdunensis* HKU09-01, *S. aureus* USA300 et *M. luteus* à survivre dans les macrophages murins et humains.

**Figure 32** : Tests d'infection *in vivo* évaluant la capacité de la souche sauvage et du mutant  $\Delta oatA$  de *S. lugdunensis* à survivre dans le modèle d'infection murin systémique.

**Figure 33** : La voie de la biosynthèse de la staphyloxanthine.

**Figure 34** : Images de microscopie électronique à transmission de cellules de *S. aureus* de type sauvage produisant une capsule et du mutant capsulaire.

**Figure 35** : Le système de sécrétion de type VII codé par le locus *ess* chez *S. aureus*.

**Figure 36** : Comparaison du locus *ess* de *S. aureus* avec celui de *S. lugdunensis*.

**Figure 37** : Représentation schématique des 8 organisations génétiques du locus *ess* identifiées à partir de 21 génomes de *S. lugdunensis*.

**Figure 38** : Les systèmes de régulation de la virulence chez *S. aureus*.

**Figure 39** : Schéma du système Agr de *S. aureus*.

**Figure 40** : Séquence de la région intergénique entre l'*ARNIII* et le locus *agr* de *S. aureus*.

**Figure 41** : Alignement des séquences des domaines de liaison à l'ADN de type LytTR.

**Figure 42** : Le réseau de régulation complexe des gènes de réponse au QS et de virulence chez *S. aureus*.

**Figure 43** : Structure secondaire de l'*ARNIII* de *S. aureus*.

**Figure 44** : Analyse par Northern-blot de l'expression des ARNm de plusieurs protéines régulées par le système Agr.

**Figure 45** : La région hypervariable du locus *agr* de *S. aureus*.

**Figure 46** : Les 4 groupes du locus *agr* de *S. aureus* définis en fonction des distances intergéniques des gènes.

**Figure 47** : Le système Agr de *S. aureus* est spécifique pour la reconnaissance de l'AIP.

**Figure 48** : Régulation des gènes cibles par AgrA et *ARNIII* chez *S. aureus*.

**Figure 49** : Le mécanisme de régulation antisens de l'*ARNIII* de *S. aureus*.

**Figure 50** : Schéma du système Agr de *S. aureus* en tant que régulateur du mode de vie du biofilm.

**Figure 51** : Analyse du biofilm de *S. lugdunensis* par microscopie confocale à balayage laser.

**Figure 52** : Vue d'ensemble des stratégies de limitation du fer chez l'hôte.

**Figure 53** : Un modèle des voies d'acquisition du fer de *S. aureus*.



**Figure 54** : Représentation schématique du système Isd de *S. aureus* impliqué dans le transport de l'hème.

**Figure 55** : Dégradation de l'hème par la protéine IsdG de *S. aureus*.

**Figure 56** : Représentations schématiques du locus *isd* et des protéines Isd de *S. lugdunensis* en comparaison avec *S. aureus*.

**Figure 57** : Détection de l'expression des protéines Isd de la souche sauvage (WT) et des mutants  $\Delta isdB$ ,  $\Delta isdC$ ,  $\Delta isdJ$ ,  $\Delta isdK$  et  $\Delta isd$  de *S. lugdunensis* N920143 dans les fractions de la paroi cellulaire (CW) et de la membrane (M).

**Figure 58** : Modèle de contribution de la protéine IsdP à l'acquisition d'hème chez *S. lugdunensis*.

**Figure 59** : Mécanisme d'activation du régulateur Fur chez *S. aureus*.

**Figure 60** : Les régions Fur-box du locus *isd* de *S. lugdunensis*.

**Figure 61** : IsdB de *S. lugdunensis* est exprimée dans le cœur des souris infectées et contribue à la colonisation cardiaque.

**Figure 62** : SrtB est requis pour la persistance de *S. aureus* pendant l'infection de l'hôte.

**Figure 63** : Effet de la délétion du locus *isd* sur la formation de biofilm par *S. lugdunensis* dans des conditions limitantes en fer.

**Figure 64** : Schéma de l'opéron *lhaSTA* et de l'opéron *isd* de *S. lugdunensis* N920143.

**Figure 65** : Modèle d'acquisition d'hème par le système LhaSTA et le système Isd chez *S. lugdunensis*.

**Figure 66** : Les systèmes d'acquisition de fer à partir de l'hème chez *S. lugdunensis*.

**Figure 67** : Les sidérophores produits par *S. aureus* peuvent améliorer la croissance de *S. lugdunensis* en condition restreinte en fer.

**Figure 68** : Schéma général représentant les fonctions de AgrA chez *S. lugdunensis*.



# **LISTE DES TABLEAUX**



**Tableau 1** : Profil de sensibilité aux antibiotiques de 540 isolats de *S. lugdunensis* testés avec la méthode de diffusion sur disque.

**Tableau 2** : Résistance aux antibiotiques et distribution du typage SCC parmi les isolats de *S. lugdunensis* qui causent une infection associée aux soins de santé et/ou à la communauté.

**Tableau 3** : Valeurs des CMI du cadmium et du zinc mesurées chez des souches de *S. lugdunensis* et *S. aureus*.

**Tableau 4** : Répartition des souches de *S. lugdunensis* et de *S. aureus* en fonction de différentes niches de portage et du sexe chez 75 sujets sains.

**Tableau 5** : Les différents types d'infections causés par *S. lugdunensis*.

**Tableau 6** : Données démographiques en fonction du type d'infection pour 491 infections à *S. lugdunensis* rapportées dans le comté de Viborg (Danemark) de juillet 2002 à juin 2006.

**Tableau 7** : Comparaison des données démographiques et des caractéristiques cliniques de patients atteints d'une infection ostéo-articulaire à *S. lugdunensis*, *S. aureus* et *S. epidermidis*.

**Tableau 8** : Caractéristiques cliniques de 67 cas d'EI à *S. lugdunensis*.

**Tableau 9** : Présentation des taux de chirurgie et de mortalité selon l'espèce de staphylocoque identifiée parmi les cas d'endocardites staphylococciques diagnostiqués à l'hôpital entre 1990 et 2003.

**Tableau 10** : Représentation des données du séquençage du génome entier des 7 souches de *S. lugdunensis* et comparaison avec la souche de référence de *S. lugdunensis* N920143.

**Tableau 11** : Dénombrement des bactéries présentes dans les tissus des animaux (végétations cardiaques, reins et rate) 48 h après injection par voie intraveineuse de *S. aureus* Sa113 de type sauvage, du mutant  $\Delta dltA$ , du mutant  $\Delta dltA$  complémenté et du mutant  $\Delta mprF$ .

**Tableau 12** : Régulateurs transcriptionnels qui modulent la fonction du système Agr chez *S. aureus*.

**Tableau 13** : Résumé de la présence ou de l'absence de l'opéron *lha*, du nouvel opéron ECF et de l'opéron *isd* chez *S. lugdunensis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. caprae* et *S. epidermidis*.



# **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

---



<b>Aap</b> : Accumulation-associated protein	<b>isd</b> : iron-regulated surface determinant
<b>ABC</b> : ATP Binding Cassette	<b>kb</b> : kilobase
<b>ADN</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>kDa</b> : kiloDalton
<b>ADNe</b> : ADN extracellulaire	<b>Iha</b> : <i>lugdunensis</i> heme acquisition
<b>Agr</b> : Accessory gene regulator	<b>LPXTG</b> : Leucine-Proline-X-Thréonine-Glycine
<b>AIP</b> : Peptide Auto-Inducteur	<b>MALDI-TOF</b> : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight
<b>AM</b> : N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase	<b>Mbp</b> : Millions de paires de bases
<b>ARN</b> : Acide RiboNucléique	<b>MEC</b> : Matrice Extra-Cellulaire
<b>ARNm</b> : ARN messager	<b>MLST</b> : MultiLocus Sequencing Typing
<b>ARNr</b> : ARN ribosomique	<b>MSCRAMM</b> : Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule
<b>ATP</b> : Adénosine-Triphosphate	<b>MVLST</b> : Multi-Virulence Locus Sequence Typing
<b>Bap</b> : Biofilm associated protein	<b>NADPH</b> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène
<b>BHI</b> : Brain Heart Infusion	<b>NAG</b> : N-acétylglucosamine
<b>Bhp</b> : Bap homolog protein	<b>NAM</b> : Acide N-acétylmuramique
<b>cap</b> : capsular polysaccharide	<b>NCBI</b> : National Center for Biotechnology Information
<b>CC</b> : Complexe Clonal	<b>NEAT</b> : NEAr iron Transporter
<b>CFP-10</b> : Culture Filtrate Protein of 10 kDa	<b>nm</b> : nanomètre
<b>CHU</b> : Centre Hospitalier Universitaire	<b>pb</b> : paire de bases
<b>CfIA</b> : Clumping factor A	<b>PBS</b> : Phosphate-Buffered Saline
<b>CLS</b> : Collagen-Like Sequence	<b>PCR</b> : Polymerase Chain reaction
<b>CMB</b> : Concentration Minimale Bactéricide	<b>PGA</b> : Acide Poly-γ-DL-Glutamique
<b>CMI</b> : Concentration Minimale Inhibitrice	<b>pga</b> : polyglutamic acid capsule
<b>CoNS</b> : Coagulase Negative Staphylococci	<b>PIA</b> : Polysaccharide Intercellular Adhesin
<b>CRISPR</b> : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	<b>PNAG</b> : Poly-N-Acetyl-Glucosamine
<b>DIP</b> : 2,2'-dipyridyl	<b>PSM</b> : Phenol-Soluble Modulin
<b>DO</b> : Densité Optique	<b>qPCR</b> : PCR quantitative
<b>ECCMID</b> : European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases	<b>QS</b> : Quorum-Sensing
<b>ECF</b> : Energy-Coupling Factor	<b>R-M</b> : Restriction-Modification
<b>EDDHA</b> : Ethylene Diamine Diortho Hydrophenyl Acid	<b>RNA-seq</b> : Séquençage des ARNs
<b>EDnBISE</b> : École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement	<b>Rot</b> : Repressor of toxins
<b>EDTA</b> : Ethylène Diamine Tétra-Acétique	<b>RT-qPCR</b> : Reverse Transcription qPCR
<b>EGM</b> : Élément Génétique Mobile	<b>SCC</b> : Staphylococcal Cassette Chromosome
<b>EI</b> : Endocardite Infectieuse	<b>SFM</b> : Société Française de Microbiologie
<b>ELISA</b> : Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay	<b>Sls</b> : <i>S. lugdunensis</i> surface
<b>ERO</b> : Espèces Réactives de l'Oxygène	<b>slush</b> : <i>S. lugdunensis</i> synergic hemolysin
<b>Ess</b> : ESAT-6 secretion system	<b>SOD</b> : SuperOxyde Dismutase
<b>Fbl</b> : Fibrinogen binding protein of <i>S. lugdunensis</i>	<b>SrtA</b> : Sortase A
<b>FC</b> : Fold-Change	<b>SrtB</b> : Sortase B
<b>Fur</b> : Ferric uptake regulator	<b>SST7</b> : Système de Sécrétion de Type VII
<b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein	<b>T/AT</b> : Toxine/AntiToxine
<b>GL</b> : N-acétylglucosaminidase	<b>U2RM</b> : Unité de Recherche Risques Microbiens
<b>GRAM 2.0</b> : Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne 2.0	<b>UFC</b> : Unité Formant Colonie
<b>ica</b> : intercellular adhesion	<b>vWbl</b> : von Willebrand of <i>S. lugdunensis</i>
<b>IDSA</b> : Infectious Diseases Society of America	<b>vWf</b> : von Willebrand factor



# AVANT-PROPOS

---



Ce travail de thèse, portant sur l'étude des facteurs d'opportunisme chez *Staphylococcus lugdunensis*, a été réalisé au laboratoire de l'Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM) de l'Université de Caen Normandie, au sein de l'équipe « Antibio-résistance » située au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Caen.

À la suite de l'obtention de la bourse ministérielle de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (ED nBISE), mon projet de thèse a débuté le 1<sup>er</sup> septembre 2018. Compte tenu de la situation sanitaire liée au virus SARS-CoV-2, mon contrat doctoral a été prolongé d'une période de 3 mois, se terminant ainsi à la date du 31 novembre 2021.

Mon projet de thèse s'inscrit dans l'une des thématiques de recherche du laboratoire U2RM qui consiste à étudier les pathogènes à Gram positif, notamment les staphylocoques, issus des maladies humaines. Le but de ce projet était de mieux comprendre le caractère opportuniste de *S. lugdunensis*, caractérisé comme une bactérie commensale qui peut néanmoins être responsable d'infections graves.

Les travaux présentés ici concernent l'étude du rôle du régulateur transcriptionnel AgrA de *S. lugdunensis* potentiellement impliqué dans la virulence staphylococcique et l'étude de la réponse à la limitation en fer chez cette espèce qui représente un stress rencontré par les bactéries pathogènes au cours de leur processus infectieux.

Dans la première partie de ce manuscrit, est présentée une introduction réalisée par une analyse des données bibliographiques de la littérature concernant :

- L'espèce *S. lugdunensis* : ses principales caractéristiques microbiologiques, sa sensibilité aux antibiotiques, son habitat commensal, son implication dans les infections humaines et l'état actuel des connaissances sur ses données génomiques.
- La virulence de cette espèce : son pouvoir pathogène lié à la présence de facteurs de colonisation et de virulence et la mise en place de systèmes de régulation pour contrôler l'expression de ces facteurs.
- Le métabolisme du fer : les systèmes d'acquisition du fer, dépendants ou indépendants de l'hème, développés par cette espèce.

Dans une seconde partie sont exposés nos travaux expérimentaux portant sur l'étude du régulateur AgrA, l'étude de la réponse à la limitation en fer, l'identification du stimulon de cette restriction en fer chez *S. lugdunensis*, ainsi qu'un travail réalisé en collaboration avec l'équipe du « Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne 2.0 » (GRAM 2.0) mené sur l'analyse génomique comparative de souches pathogènes et de portage de *S. lugdunensis*.

Enfin, la troisième partie de ce manuscrit constitue une conclusion générale comprenant une discussion sur l'ensemble de ce travail de thèse et les perspectives qui seraient à envisager pour la poursuite de cette étude.

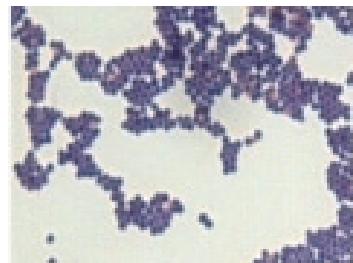


# INTRODUCTION

---

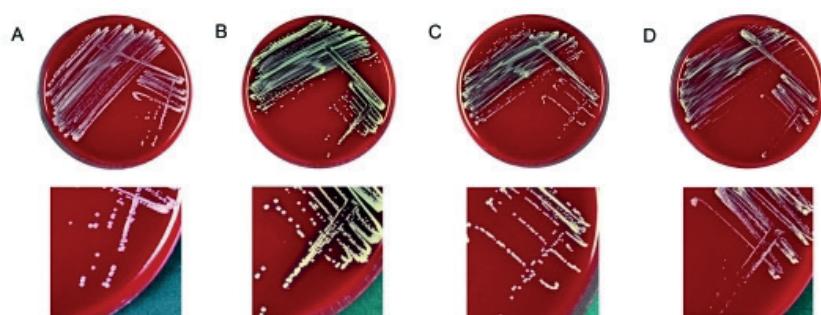


*STAPHYLOCOCCUS  
LUGDUNENSIS*



**Figure 1 :** Observation microscopique de la coloration de Gram des cellules de *S. lugdunensis* (image x1000).

D'après Onyango *et al.*, 2012.



**Figure 2 :** Observation macroscopique de différents types de colonies de *S. lugdunensis* sur des géloses supplémentées avec du sang de mouton après 24 h d'incubation à 37 °C.

La pigmentation et le caractère hémolytique sont différents selon les isolats de *S. lugdunensis*. Les colonies sont de couleur crème (A) ou de couleur jaune (B-D). L'hémolyse des colonies est absente (A), totale (B) ou faible (C et D).

D'après Seifert *et al.*, 2005.

# 1. STAPHYLOCOCCUS LUGDUNENSIS

## 1.1. Caractères généraux

### 1.1.1. Caractères microbiologiques

---

Décrit pour la première fois en 1988, *S. lugdunensis* a été découvert à Lyon d'où il doit son nom (Lyon, du latin *Lugdunum*) (Freney *et al.*, 1988). Appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* au sein du *phylum* des *Firmicutes*, *S. lugdunensis* est une bactérie qui se présente sous la forme de cocci à Gram positif, de 0,8 à 1 µm de diamètre, isolés, en paires ou en amas de trois à cinq cellules (Freney *et al.*, 1988) (Figure 1). Cette bactérie se révèle être aérobio-anaérobio facultative et possède un caractère halotolérant et mésophile ce qui lui permet d'être cultivée à des températures qui oscillent entre 30 et 45 °C (Freney *et al.*, 1988 ; Frank *et al.*, 2008).

Les colonies de *S. lugdunensis* ont une taille qui varie de 1 à 4 mm de diamètre et apparaissent lisses, brillantes, plates, à bords réguliers ou parfois rugueuses, muqueuses, avec des bords irréguliers (Freney *et al.*, 1988). Après 3 à 5 jours d'incubation, ces colonies peuvent avoir une pigmentation jaune à dorée, ou peuvent rester de couleur crème ou non pigmentées (Freney *et al.*, 1988 ; Fleurette *et al.*, 1989) (Figure 2). Ces différences de morphologie et de pigmentation dépendent des souches et du milieu de culture utilisés (Freney *et al.*, 1988 ; Fleurette *et al.*, 1989 ; Frank *et al.*, 2008).

Sur des géloses contenant du sang de lapin ou du sang de mouton, une hémolyse de type β (hémolyse partielle) peut être observée autour des colonies de *S. lugdunensis* (Fleurette *et al.*, 1989 ; Seifert *et al.*, 2005 ; Frank *et al.*, 2008) (Figure 2). Une étude a montré la présence de cette hémolyse chez 95 % des souches de *S. lugdunensis* (Hébert, 1990). De plus, une activité hémolytique synergique, ressemblant à celle observée de la δ-hémolysine de *Staphylococcus aureus*, a été mise en évidence chez 73 % des souches de *S. lugdunensis* (Vandenesh *et al.*, 1991). L'hémolysine de type β de *S. lugdunensis* agit en synergie avec l'hémolysine de type δ de *S. aureus* afin de produire une zone d'hémolyse complète sur des globules rouges de mouton (Frank *et al.*, 2008).



Par ailleurs, *S. lugdunensis* développe une odeur caractéristique lorsqu'il est cultivé sur des géloses supplémentées avec du sang de mouton (Fleuretta *et al.*, 1989 ; Böcher *et al.*, 2009). Cette odeur a été décrite comme étant semblable à un produit javellisant (hypochlorite de sodium) (Böcher *et al.*, 2009), la décomposition d'acides gras des érythrocytes de mammifères serait à l'origine de cette odeur (Stoakes *et al.*, 1994).

Les staphylocoques se caractérisent par la présence d'une catalase mais ne produisent pas d'oxydase. *S. lugdunensis* appartient au groupe connu des staphylocoques à coagulase négative (CoNS) qui est constitué d'un grand nombre d'espèces de staphylocoques, distinctes de *S. aureus*, ne produisant pas de coagulase libre (ou staphylocoagulase) et qui sont donc incapables de coaguler le plasma (Bannerman et Peacock., 2006). Cependant, *S. lugdunensis* possède une protéine de liaison au fibrinogène Fbl (fibrinogen binding protein of *S. lugdunensis*) homologue au clumping factor ClfA (Clumping factor A) de *S. aureus* (Nilsson *et al.*, 2004a ; Mitchell *et al.*, 2004). Cette protéine est responsable d'un résultat positif au test d'agglutination sur lame (détection de la coagulase liée) ou à divers kits commerciaux dédiés à l'identification des protéines de surface de *S. aureus*. Cela a conduit à un réel problème d'identification (Frank *et al.*, 2008 ; Becker *et al.*, 2014) puisque ces résultats associés à la présence de colonies hémolytiques de couleur dorée peuvent aboutir à une identification de *S. aureus* et non de *S. lugdunensis*. Cette réaction croisée serait à l'origine d'une sous-évaluation de la prévalence de *S. lugdunensis* au sein des isolats de staphylocoques (Pinsky *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2012 ; Argemi *et al.*, 2015).

Bien qu'elles soient plus rares, les infections à *S. lugdunensis* sont cliniquement impossibles à distinguer des infections causées par *S. aureus* (Böher *et al.*, 2009). Aujourd'hui, des identifications bactériennes fiables au rang d'espèce sont possibles grâce à la mise en place de techniques comme la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight) permettant ainsi de résoudre ces erreurs d'identification (Argemi *et al.*, 2015). En effet, grâce à l'utilisation de ces méthodes améliorées, 11 fois plus d'infections à *S. lugdunensis* ont été découvertes au Danemark de 2002 à 2006, indiquant que cette espèce était largement sous-estimée comme cause d'infection (Böher *et al.*, 2009).

**Tableau 1 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de 540 isolats de *S. lugdunensis* testés avec la méthode de diffusion sur disque.**

D'après Taha *et al.*, 2019.

Antibiotic	No. (%) susceptible
Penicillin G	403 (74.6)
Gentamicin	538 (99.6)
Rifampicin	538 (99.6)
Cefoxitin	538 (99.6)
Fusidic acid	528 (97.8)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	539 (99.8)
Norfloxacin	539 (99.8)
Clindamycin	494 (91.5)
Erythromycin	506 (93.7)

**Tableau 2 : Résistance aux antibiotiques et distribution du typage SCC parmi les isolats de *S. lugdunensis* qui causent une infection associée aux soins de santé et/ou à la communauté.**

D'après Yeh *et al.*, 2016.

Characteristic	No. (%) for			P value
	Total (n = 129)	Health care associated (n = 81)	Community associated (n = 48)	
<b>Antibiotic resistance</b>				
Penicillin	87 (67.4)	62 (76.5)	25 (52.1)	0.004
Oxacillin	27 (20.9)	26 (32.1)	1 (2.1)	<0.001
Clindamycin	28 (21.7)	19 (23.5)	9 (18.8)	0.529
Erythromycin	32 (24.8)	22 (27.2)	10 (20.8)	0.424
TMP-SMX	3 (2.3)	1 (1.2)	2 (4.2)	0.285
<b>SCCmec type</b>				
II	5 (3.9)	5 (6.2)	0	0.078
IV	1 (0.8)	1 (1.2)	0	0.441
V	17 (13.2)	17 (21.0)	0	<0.001
Vt	2 (1.6)	2 (2.5)	0	0.271
NT	2 (1.6)	1 (1.2)	1 (2.1)	0.703

### 1.1.2. Sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourds

Contrairement aux autres espèces de staphylocoques, *S. lugdunensis* reste remarquablement sensible à la plupart des antibiotiques (Higaki *et al.*, 1999 ; Frank *et al.*, 2008 ; Taha *et al.*, 2019) (**Tableau 1**). Les infections à *S. lugdunensis* sont principalement traitées par les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames (Zang *et al.*, 2001), cependant le développement d'une résistance à ces antibiotiques a été mis en évidence. Le taux de résistance à la pénicilline chez *S. lugdunensis* diffère selon les études : il est considéré comme faible en Suède (15,5 %) (Hellbacher *et al.*, 2006), au Danemark (20 %) (Böcher *et al.*, 2009) et en France (24 %) (van der Mee-Marquet *et al.*, 2003) mais plus élevé aux États-Unis (48 %) (McHardy *et al.*, 2017) et à Taïwan (87 %) (Yen *et al.*, 2016). Cette résistance à la pénicilline est médiée par la production d'une pénicillinase codée par le gène *blaZ* qui inactive la pénicilline par hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame (Zang *et al.*, 2001 ; Ferreira *et al.*, 2016 ; McHardy *et al.*, 2017).

La résistance à la méticilline chez *S. lugdunensis* a été signalée pour la première fois en 2003 (Tee *et al.*, 2003) et a été par la suite de plus en plus rencontrée en Asie. En effet, 4,7 %, 8,3 % et 20,8 % des isolats cliniques étudiés à Singapour, Hong-Kong et Taïwan, respectivement, se sont avérés être résistants aux pénicillines du groupe M (Tan *et al.*, 2008 ; Ho *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2015). Cette résistance est conférée par la production d'une protéine PLP2a codée par le gène *mecA*, qui est acquis par transfert horizontal d'un élément génétique mobile (EGM) appelé *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome) (Liu *et al.*, 2016). Il existe 11 types différents (de I à XI) de cassette *SCCmec* chez *S. aureus* et autres staphylocoques (Liu *et al.*, 2016). Concernant *S. lugdunensis*, une étude a permis d'identifier 4 types différents (II, IV, V et Vt) de cassette *SCCmec* parmi 25 isolats (Yeh *et al.*, 2016) (**Tableau 2**).

L'émergence des souches de *S. lugdunensis* résistantes aux antibiotiques devient préoccupante puisqu'une tolérance aux glycopeptides (classe thérapeutique utilisée en cas de résistance à la méticilline) a été découverte chez cette espèce (Frank *et al.*, 2007 ; Bourgeois *et al.*, 2007). La tolérance aux antibiotiques est décrite comme un type de résistance particulier chez des bactéries qui sont capables d'échapper à l'effet bactéricide d'un antibiotique donné : les bactéries survivent mais ne peuvent pas croître (Tuomanen *et al.*, 1986). Deux études ont montré un défaut dans l'activité bactéricide des glycopeptides contre *S. lugdunensis* (Frank *et al.*, 2007 ; Bourgeois *et al.*, 2007). Parmi la collection d'isolats de *S. lugdunensis* sensibles à la vancomycine (concentration minimale inhibitrice CMI allant de 0,5 à 2 g/mL) étudiée par Frank *et al.*, 93 % ont démontré une tolérance à la vancomycine avec un rapport concentration minimale bactéricide CMB/CMI > 32 (Frank *et al.*, 2007). L'étude menée par Bourgeois *et al.*, a également révélé une tolérance à la vancomycine et à la téicoplanine pour 46 % des souches de *S. lugdunensis* étudiées (Bourgeois *et al.*, 2007).

**Tableau 3 : Valeurs des CMI du cadmium et du zinc mesurées chez des souches de *S. lugdunensis* et *S. aureus*.**

La résistance au cadmium chez *S. lugdunensis* est conférée par le plasmide pLUG10.

D'après Chaouni *et al.*, 1996.

Bacterium	Plasmid	Zn <sup>2+</sup> ( $\mu$ M)	Cd <sup>2+</sup> ( $\mu$ M)
<i>S. lugdunensis</i> <sup>a</sup>	None	625	64
<i>S. lugdunensis</i>	pLUG10	625	256
<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	None	1250	8
<i>S. aureus</i> (LUG18)	pOX6	1250	128–256
<i>S. aureus</i> (LUG17)	pLUG10	ND	256
<i>S. aureus</i>	pLUG101 <sup>c</sup>	ND	32
<i>S. aureus</i>	pLUG102 <sup>d</sup>	ND	64

*Note.* ND, not determined.

<sup>a</sup> Strain 995 (Poitevin-Later *et al.*, 1992).

<sup>b</sup> Strain RN 4220 (Kreiswirth *et al.*, 1983).

<sup>c</sup> pLUG10 with a frameshift mutation interrupting the *cadB* coding gene.

<sup>d</sup> pLUG10 with a deletion removing the *cadX* coding gene.

Alors que *S. lugdunensis* reste très sensible à une large gamme de thérapies antibactériennes, il est intéressant de noter que le développement d'une résistance à l'érythromycine (Arciola *et al.*, 2006), streptomycine (Jarløv *et al.*, 1996), tétracycline (Vandenesh *et al.*, 1993a), gentamicine (Higaki *et al.*, 1999), ceftazidime (Goldstein *et al.*, 2006), fosfomycine (Argemi *et al.*, 2017a), aux aminosides et macrolides (Fleurette *et al.*, 1989), à la rifampicine et à la ciprofloxacine (Kragsbjerg *et al.*, 2000), a été retrouvé à travers des rapports de cas isolés. Ces souches de *S. lugdunensis* caractérisées par leur résistance aux antibiotiques apparaissent davantage être responsables d'infections associées aux soins (Shibuya *et al.*, 2020).

*S. lugdunensis* possède un large éventail de sensibilités aux antibiotiques. Cependant pour certains patients, l'antibiothérapie seule n'est pas suffisante et doit être couplée à un traitement chirurgical. Le recours à la chirurgie pour des patients atteints d'endocardite à *S. lugdunensis* est de 70% contre 37% pour celui d'endocardite à *S. aureus* (Anguera *et al.*, 2005 ; Frank *et al.*, 2008 ; Parthasarathy *et al.*, 2020).

De plus, des gènes conférant des caractéristiques de survie utiles peuvent être transférés entre espèces bactériennes en utilisant des plasmides comme vecteurs (Chaouni *et al.*, 1996). Il existe peu d'études faisant état de résistance plasmidique aux métaux lourds, cependant un plasmide de résistance au cadmium nommé pLUG10 a été trouvé dans plusieurs souches de *S. lugdunensis* permettant une résistance de haut niveau au cadmium ( $CMI \geq 125 \mu M$ ) (Poitevin-Later *et al.*, 1992). Homologue au plasmide pOX6 de *S. aureus*, le plasmide pLUG10 contient en effet les gènes *cadX* et *cadB* requis pour la résistance au cadmium (Chaouni *et al.*, 1996 ; Poitevin-Later *et al.*, 1992) (**Tableau 3**).

**Tableau 4 : Répartition des souches de *S. lugdunensis* et de *S. aureus* en fonction de différentes niches de portage et du sexe chez 75 sujets sains.**

D'après Bieber et Kahlmeter, 2010.

Location <sup>a</sup>	<i>S. lugdunensis</i>		Total (%)	<i>S. aureus</i>		Total (%)
	Males (n = 33)	Females (n = 42)		Males (n = 33)	Females (n = 42)	
Nose	6	1	7 (9.3)	8	6	14 (18.7)
Axilla	9	6	15 (20)	1	1	2 (2.7)
Perineum	9	2	11 (14.7)	0	1	1 (1.3)
Groin	13	11	24 (32)	0	0	0 (0)
Breast	3	1	4 (5.3)	1	1	2 (2.7)
Toe	1	3	4 (5.3)	0	0	0 (0)
Nail 1st toe	10	8	18 (24)	0	1	1 (1.3)
Unspecified	6	5	11 (14.7)	1	0	1 (1.3)
Total	57	37	94	11	10	21

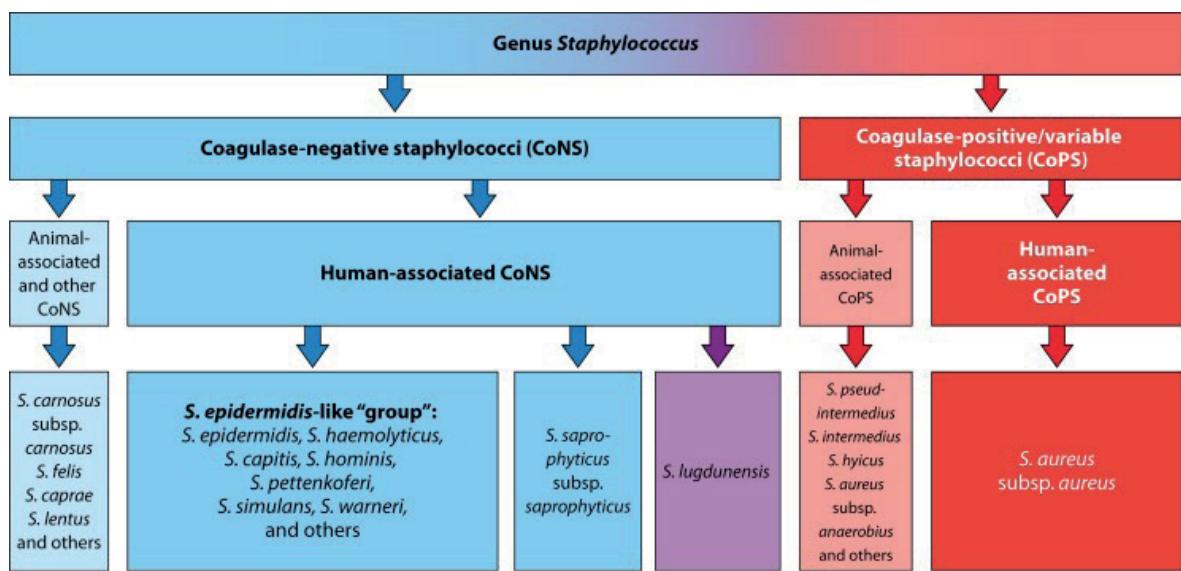
<sup>a</sup>One swab per location from each of the 75 subjects.

### 1.1.3. Habitat

Décrit comme une bactérie commensale appartenant à la flore cutanée normale humaine, *S. lugdunensis* est retrouvé chez 67 % de la population (Bieber et Kahlmeter, 2010). Cette bactérie est principalement présente au niveau des zones humides des parties inférieures du corps et aux extrémités, en particulier dans les régions inguinale (van der Mee-Marquet *et al.*, 2003), périnéale (Vandenesh *et al.*, 1995), mammaire et plantaire (Bieber et Kahlmeter, 2010). Selon la littérature, *S. lugdunensis* colonise 30 % à 50 % des patients. Cette colonisation a notamment été détectée au niveau inguinal chez 22 % à 39 % des patients, puis au niveau axillaire chez 19,8 % à 20 % des patients et au niveau nasal dans 9,3 % à 17,9 % des cas (Argemi *et al.*, 2017a).

Appartenant au microbiote cutané avec une préférence pour la niche inguinale, *S. lugdunensis* semble être un commensal privilégié des zones cutanées qui possèdent des glandes sudoripares apocrines telles que l'aisselle, la région génito-anale, les canaux auditifs, les paupières et les aréoles mammaires (Böher *et al.*, 2009). La prévalence du portage de *S. lugdunensis* dans la flore cutanée inguinale chez 140 patients (admis au service des urgences de l'hôpital de Tours sur une période de 3 mois) a été étudiée (van der Mee-Marquet *et al.*, 2003). Parmi eux, 22 % étaient porteurs de *S. lugdunensis* qui a été retrouvé à 68 % dans les plis inguinaux (van der Mee-Marquet *et al.*, 2003). La fréquence de portage ne différait pas en fonction du sexe ou de l'indice de masse corporelle, cependant il est intéressant de noter qu'elle était plus élevée chez les patientes âgées de 65 ans ou plus (50 %) et chez les patients de moins de 65 ans (41 %) (van der Mee-Marquet *et al.*, 2003).

Une seconde étude s'est intéressée aux niches cutanées préférentielles de *S. lugdunensis* en les comparant avec celles de *S. aureus* chez 75 volontaires sains (Bieber et Kahlmeter, 2010). *S. lugdunensis* a été plus fréquemment retrouvé que *S. aureus* (66,7 % contre 21,3 %) et la seule niche dominée par *S. aureus* était le nez avec 18,7 % contre 9,3 % pour *S. lugdunensis* (Bieber et Kahlmeter, 2010). Comparativement à *S. aureus*, les zones dans lesquelles *S. lugdunensis* a été le plus souvent rencontré étaient l'aine (32 % contre 0 %), l'ongle du premier orteil (24 % contre 1,3 %), l'aisselle (20 % contre 2,7 %), le périnée (14,7 % contre 1,3 %) et le sein (5,3 % contre 2,7 %) (Bieber et Kahlmeter, 2010) (**Tableau 4**). La fréquence de portage n'était pas statistiquement différente en fonction du sexe, comme remarquée dans l'étude précédente (Bieber et Kahlmeter, 2010 ; van der Mee-Marquet *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** Schéma de catégorisation clinique et épidémiologique des espèces de staphylocoques, basé sur la présence de la coagulase comme facteur majeur de virulence et son impact sur la santé humaine.

D'après Becker *et al.*, 2014.

Il apparaît que *S. lugdunensis* soit également capable de coloniser et d'être responsable d'infections chez les animaux, en particulier les animaux de compagnie, dont la transmission à l'Homme pourrait être dangereuse (Bierowiec, 2020). Parmi un ensemble de chats dépistés pour une colonisation staphylococcique entre 2013 à 2019, la prévalence de *S. lugdunensis* a été estimée à 0,77 % chez les chats sains et à 1,23 % chez les chats malades (présentant des symptômes d'infection bactérienne des voies respiratoires supérieures, de la peau ou d'une plaie) (Bierowiec, 2020). *S. lugdunensis* a également été isolé chez les chiens (1,7 %) (Kasprowicz *et al.*, 2011) et dans du lait de chèvre (22 %) (Coimbra-E-Souza *et al.*, 2019).

#### 1.1.4. Infections à *S. lugdunensis*

Les CoNS sont de plus en plus souvent considérés comme des causes majeures d'infections communautaires et associées aux soins. Ainsi, leur présence en milieu hospitalier devient un problème majeur, en particulier parce qu'ils agissent comme des agents pathogènes opportunistes (Diekema *et al.*, 2001 ; Fluit *et al.*, 2001). À l'exception de *S. aureus* (caractérisé comme hautement pathogène), il est possible de différencier le groupe des staphylocoques « moyennement » pathogènes constitué de *S. lugdunensis*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*, et le groupe des staphylocoques « relativement » non pathogènes représenté par des espèces saprophytes associées aux aliments, d'origine végétale ou animale, ou adaptés aux animaux (von Eiff *et al.*, 2006 ; Becker *et al.*, 2014) (Figure 3).

*S. lugdunensis* est impliqué dans un large éventail de maladies humaines et émerge ainsi en tant que bactérie dont la pathogénicité ressemble plus à celle de *S. aureus* qu'à celle des autres CoNS (Frank *et al.*, 2008). En effet, *S. lugdunensis* possède un degré élevé de virulence et est responsable d'infections avec un niveau de gravité et d'agressivité rappelant celui des infections à *S. aureus* (Frank *et al.*, 2008).

Le début d'une infection causée par *S. lugdunensis* semble être lié à un traumatisme ou à une immunsuppression car il est retrouvé dans 50 % des cas chez des patients atteints de maladies sous-jacentes ou traités par des médicaments immunsupresseurs. Toutefois, l'infection peut se produire sans contexte particulier puisqu'il est aussi responsable de maladies superficielles et graves chez des personnes en bonne santé (Herchline et Ayers, 1991 ; Frank *et al.*, 2008).

**Tableau 5 : Les différents types d'infections causés par *S. lugdunensis*.**

D'après Heilbronner et Foster, 2021.

Type of infection	Comment(s)
Endocarditis	Native valve. Left-sided infection predominates. Causes vegetations. Surgery often required. High mortality. Occasional cerebrovascular incident. Community acquired.
Bacteremia sepsis	Prosthetic valve. Pacemaker associated.
Bone and joint	Frequent complication of IE.
	Prosthetic joint infection (hip and knee arthroplasty, knee more common, underlying comorbidities).
	Fracture fixation devices. Vertebral osteomyelitis. Disk space infection. Infective arthritis, osteomyelitis.
Skin and soft tissue	Predominantly wound infection & abscesses. Primarily in perineal and pelvic girdle region. Predominantly community acquired.
Peritonitis	Continuous ambulatory peritoneal dialysis.

**Tableau 6 : Données démographiques en fonction du type d'infection pour 491 infections**

**à *S. lugdunensis* rapportées dans le comté de Viborg (Danemark) de juillet 2002 à juin 2006.**

D'après Böcher *et al.*, 2009.

Infection type	No. of patients	Median age (yr) (range)	Male/female ratio
Total	491	52 (0–96)	0.69
Abscesses	179	44 (3–90)	0.50
Wound infections	122	64 (0–93)	0.61
Paronychia	63	44 (7–90)	1.42
Incisional surgical wound	49	54 (6–84)	0.81
Otitis media	17	1 (0–8)	2.4
Otitis externa	8	54 (22–83)	0.15
Urinary tract infections	15	71 (9–89)	0.50
Deep infections	14	77 (31–96)	0.75
Other	24	49 (0–93)	0.5

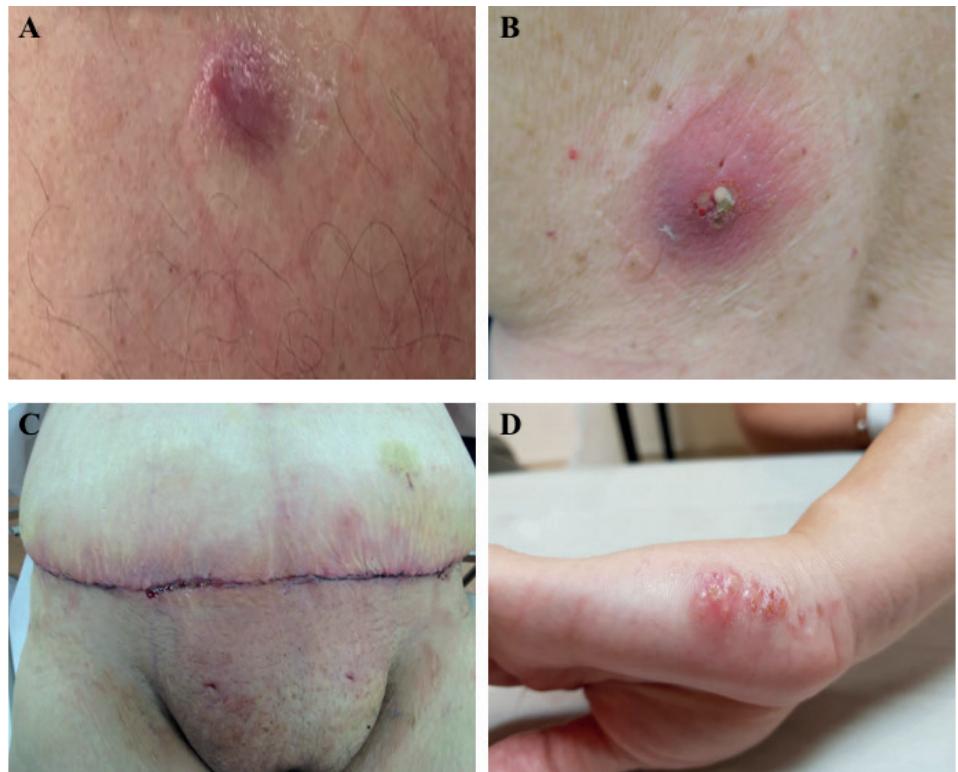
*S. lugdunensis* provoque principalement des infections de la peau et des tissus mous, néanmoins il est également capable de causer des infections ostéoarticulaires et une forme grave d'endocardite infectieuse (EI). Peu fréquemment, il est responsable de bactériémies, d'infections buccales, oculaires, urinaires, du système nerveux central, de péricardites et de fasciite nécrosante (Frank *et al.*, 2008 ; Parthasarathy *et al.*, 2020 ; Heilbronner et Foster, 2021) (**Tableau 5**).

- **Infections de la peau et des tissus mous**

Les infections de la peau et des tissus mous représentent la majorité des infections à *S. lugdunensis* avec une incidence de 53 pour 100 000 habitants par an (Böcher *et al.*, 2009). En effet, une étude a montré que 55,4 % des infections liées à *S. lugdunensis* étaient des infections de la peau et des tissus mous (Herchline et Ayers, 1991). Elles affectent généralement les populations de patients d'âge moyen à âgé (Heldt Manica et Cohen, 2017) et une prévalence plus élevée chez les femmes a été observée (Böcher *et al.*, 2009) (**Tableau 6**).

Ces atteintes sont principalement réparties sous la ceinture pelvienne et dans la région inguinale mais la localisation de ces infections par *S. lugdunensis* semble dépendre de l'âge (Böcher *et al.*, 2009). Chez les jeunes enfants, l'otite est l'infection la plus courante (Böcher *et al.*, 2009). Chez les patients d'âge moyen, elles sont retrouvées majoritairement au niveau des aisselles, des fesses, de l'aine et des régions mammaires (Böcher *et al.*, 2009 ; Zaaroura *et al.*, 2018), alors que chez les personnes âgées, elles sont localisées aux extrémités des membres (ulcères des doigts, des orteils et des jambes) (Böcher *et al.*, 2009). La prévalence du portage cutané de *S. lugdunensis* au niveau de ces différentes régions du corps peut expliquer la localisation de ces infections (van der Mee-Marquet *et al.*, 2003 ; Zaaroura *et al.*, 2018).

Les infections de la peau et des tissus mous causées par *S. lugdunensis* se présentent le plus souvent sous la forme d'abcès (Ortiz de la Tabla *et al.*, 1996 ; Bellamy et Barkham, 2002). La capacité de cette espèce à provoquer des abcès a également été décrite dans des études sur des modèles murins, avec ou sans corps étranger (Lambe *et al.*, 1990 ; Ferguson *et al.*, 1991). De plus, *S. lugdunensis* a été identifié comme isolat unique ou prédominant dans les abcès et nodules chez des patients atteints d'hidradénite suppurée (maladie de Verneuil) (Guet-Revillet *et al.*, 2014 ; Zaaroura *et al.*, 2018). Cependant elles peuvent aussi se caractériser par des kystes ou des pustules (Heldt Manica et Cohen, 2017),



**Figure 4 : Exemples d'infections de la peau et des tissus mous par *S. lugdunensis*.**

Lésion kystique enflammée avec un érythème environnant (A), abcès avec cellulite lié à une morsure d'insecte (B), érythème cutané avec écoulement cicatriciel après une dermolipectomie abdominale (C) et pustules émergeant d'une main (D).

D'après Delaunay *et al.*, 2014 ; Heldt Manica et Cohen, 2017 ; Zaaroura *et al.*, 2018.

des surinfections de plaies (Vandenesch *et al.*, 1995), des cellulites (Heldt Manica et Cohen, 2017), des furoncles ou des félons (Akiyama *et al.*, 1998), et des folliculites ou des pustuloses (Zaaroura *et al.*, 2018) (Figure 4).

Bien qu'elles soient moins fréquentes que les atteintes cutanées causées par *S. epidermidis* et *S. aureus*, celles de *S. lugdunensis* présentent un tableau clinique plus virulent que celles des CoNS, ressemblant plus à celui de *S. aureus* (Böcher *et al.*, 2009). Dans 96 % des infections à *S. lugdunensis*, une incision chirurgicale, un drainage et une antibiothérapie sont nécessaires pour traiter les patients (Böcher *et al.*, 2009). De plus, il apparaît qu'elles soient cliniquement impossibles à distinguer de celles causées par *S. aureus* (Böcher *et al.*, 2009).

- **Infections ostéo-articulaires**

L'implication de *S. lugdunensis* est à la hausse dans les infections ostéo-articulaires, notamment dans les maladies orthopédiques. Une étude prospective a montré que, parmi 168 souches de *S. lugdunensis* prélevées chez des patients présentant une infection staphylococcique, 39,9 % des souches provenaient des os et des articulations (Douiri *et al.*, 2016), et une seconde étude menée au CHU de Strasbourg a rapporté que parmi 129 infections à *S. lugdunensis*, les infections osseuses et articulaires étaient les sites d'infection les plus fréquents (36,4 %) (Argemi *et al.*, 2017c). Ces infections se manifestent généralement chez des patients d'âge moyen et sont plus fréquentes chez les hommes (Karnani et Myers, 2008). En 2015, l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) a considéré que la procédure de diagnostic concernant l'ostéomyélite chez l'adulte causée par *S. lugdunensis* doit être réalisée comme celle de *S. aureus* (Berbari *et al.*, 2015).

Les infections osseuses et articulaires causées par *S. lugdunensis* sont associées à des patients atteints d'arthrite septique, d'ostéomyélite, d'une prothèse articulaire infectée ou d'un dispositif d'ostéosynthèse infecté, d'une spondylodiscite ou d'une ostéomyélite vertébrale (Karnani et Myers, 2008 ; Frank *et al.*, 2008 ; Parthasaraty *et al.*, 2020). Elles apparaissent à la suite de la pose d'une prothèse articulaire (70,2 %) (Seng *et al.*, 2017) et, parmi elles, l'articulation du genou est plus touchée que l'articulation de la hanche (89 % contre 11 %) (Shah *et al.*, 2010). Le débridement chirurgical, le retrait du dispositif ainsi qu'une antibiothérapie sont nécessaires pour traiter et guérir les patients atteints d'infections ostéo-articulaires à *S. lugdunensis* (Karnani et Myers, 2008).

**Tableau 7 : Comparaison des données démographiques et des caractéristiques cliniques de patients atteints d'une infection ostéo-articulaire à *S. lugdunensis*, *S. aureus* et *S. epidermidis*.**

D'après Lourtet-Hascoët *et al.*, 2016.

	<i>S. lugdunensis</i> (n=28)	<i>S. aureus</i> (n=30)	<i>S. epidermidis</i> (n=30)	p-Value
Age (years)	67.5 (58–78)	60.5 (44–75)	67 (61–77)	0.34
Number of males	13 (46.4%)	20 (66.7%)	20 (66.7%)	0.196
Prosthesis site				
Knee	16 (57%)	18 (60%)	11 (36.7%)	0.145
Hip	10 (36%)	9 (30%)	16 (53%)	0.158
Other	2 (7%)	3 (10%)	3 (10%)	
Clinical signs				
Fever	15 (53.6%)	9 (30%)	4 (13.3%)	0.004
Local signs of inflammation	13 (46.4%)	7 (23.3%)	4 (13.3%)	0.015
Surgery type				
Irrigation and debridement	11 (39.3%)	10 (33.3%)	5 (16.7%)	0.144
One-stage surgery	6 (21.4%)	12 (40%)	16 (53.3%)	0.044
Two-stage revision	11 (39.3%)	8 (26.7%)	9 (30%)	0.568
Delay from surgery to infection (weeks)	12 (3–56)	44 (12–144)	84 (44–192)	0.0449
Samples				
Number of positive samples	3.5 (1.5–5)	4 (3–5)	4 (3–5)	0.449
Total number of samples	5 (2–6)	4 (3–5)	5 (4–6)	0.413
Treatment duration (weeks)	7	7	7	
Outcome positive	89%	83%	97%	0.233

**Tableau 8 : Caractéristiques cliniques de 67 cas d'EI à *S. lugdunensis*.**

D'après Liu *et al.*, 2010.

Characteristics	n (%)
Age (yr)	53.88±19.14 (7–82)
Sex	
Male	41 (61.2)
Female	26 (38.8)
Portal of entry	
Known	22 (32.8)
Unknown	45 (67.2)
Comorbidity	
Yes	36 (65.5)
No	19 (34.5)
Location	
Left-sided	58 (86.6)
Mitral valve	27 (40.3)
Aortic valve	22 (32.8)
Both	8 (11.9)
Right-sided	5 (7.5)
Tricuspid valve	4 (6.0)
Pulmonary valve	1 (1.5)
Pacemaker lead	4 (6.0)
Vegetations on echocardiography	
Yes	42 (77.8)
No	12 (22.2)
Penicillin susceptibility	
Yes	41 (82.0)
No	9 (18.0)
Embolization	
Yes	11 (16.4)
No	56 (83.6)
Surgery	
Yes	46 (68.7)
No	21 (31.3)
Outcome	
Recovered	41 (61.2)
Death	26 (38.8)
Characteristics of valve	
Native valve	54 (80.6)
Prosthetic valve	8 (11.9)
Pacemaker lead	5 (7.5)

Les caractéristiques physiopathologiques de ces infections comprennent une apparition rapide des symptômes et une destruction agressive des tissus avec de grandes quantités de matériel purulent, c'est pourquoi elles sont considérées comme cliniquement similaires aux infections ostéo-articulaires causées par *S. aureus* (Karnani et Myers, 2008 ; Shah *et al.*, 2010). Par ailleurs, elles sont définies comme étant plus fébriles et plus inflammatoires que celles causées par *S. aureus* ou *S. epidermidis* (Lourtet-Hascoët *et al.*, 2016). De plus, le délai entre la chirurgie et l'apparition d'une infection ostéo-articulaire est souvent plus court lorsqu'il implique *S. lugdunensis* que pour *S. aureus* ou *S. epidermidis* (12 semaines contre 44 et 48 semaines, respectivement) (Lourtet-Hascoët *et al.*, 2016) (**Tableau 7**). Ces données confirment l'intérêt de considérer *S. lugdunensis* comme un agent pathogène important lorsqu'il est isolé chez des patients atteints d'ostéomyélites et d'infections articulaires prothétiques.

- **Endocardites infectieuses**

Parmi l'ensemble des CoNS, *S. lugdunensis* occupe une place particulière en raison de sa pathogénicité spécifique et de son importance clinique. Il joue également un rôle en tant que cause peu fréquente mais agressive d'EI, présentant une destruction de la valve et la formation d'abcès (Vandenesh *et al.*, 1993a).

Bien qu'il ne soit responsable que d'environ 1 % des cas d'EI (*S. aureus* est lui retrouvé dans 49,3 % des cas) (Bor *et al.*, 2013), *S. lugdunensis* provoque des EI similaires à celles causées par *S. aureus* (Liu *et al.*, 2010). Une prévalence pour les hommes a été observée et l'EI à *S. lugdunensis* est survenue chez des patients d'âge moyen compris entre 47 et 61 ans (Vandenesh *et al.*, 1993a ; Liu *et al.*, 2010 ; Kyaw *et al.*, 2018) (**Tableau 8**).

L'EI à *S. lugdunensis* est parfois retrouvée sur des valves natives, des valves prothétiques et des sondes de stimulateur cardiaque (Anguera *et al.*, 2005). Cependant elle se produit dans 80 % des cas sur les valves natives et affecte majoritairement le côté gauche du cœur formant des végétations observables à l'échographie, tandis qu'elle est présente dans 13 % des cas sur prothèse valvulaire avec une prédominance en position aortique associée à la formation d'abcès (Anguera *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2010) (**Tableau 8**). Elle est décrite comme agressive car la plupart des patients présente des symptômes pendant 3 semaines et le degré de destruction de la valve associé à la formation d'abcès est élevé. Le remplacement valvulaire est souvent nécessaire et le taux de mortalité associé à l'EI à *S. lugdunensis* est de 50 %, ce qui est significativement plus élevé que pour les EI associées à *S. aureus* et *S. epidermidis* (14,5 % et 20 %, respectivement) (Vandenesh 1993a ; Anguera *et al.*, 2005) (**Tableau 9**). Afin de traiter les EI, l'antibiothérapie seule n'est en générale pas suffisante et les patients nécessitent souvent

**Tableau 9 : Présentation des taux de chirurgie et de mortalité selon l'espèce de staphylocoque identifiée parmi les cas d'endocardites staphylococciques diagnostiqués à l'hôpital entre 1990 et 2003.**

D'après Anguera *et al.*, 2005.

	Total	Surgery	Mortality
<i>Staphylococcus aureus</i>	310	63 (20.3%)	22 (7.1%)
Injected drug users	172	12 (7.0%)	2 (1.1%)
General population	138	51 (36.9%)	20 (14.5%)
Coagulase negative staphylococci	98	53 (54.0%)	23 (23.5%)
<i>S epidermidis</i>	75	45 (60.0%)	15 (20.0%)
<i>S lugdunensis</i>	10	7 (70.0%)*	5 (50.0%)†
<i>S hominis</i>	6	1 (16.6%)	1 (16.6%)
Other species	7	2 (40.0%)	1 (14.2%)

\*p<0.04 versus *S aureus* in the general population and not significant versus *S epidermidis*; †p<0.01 versus *S aureus* in the general population and p<0.04 versus *S epidermidis*.

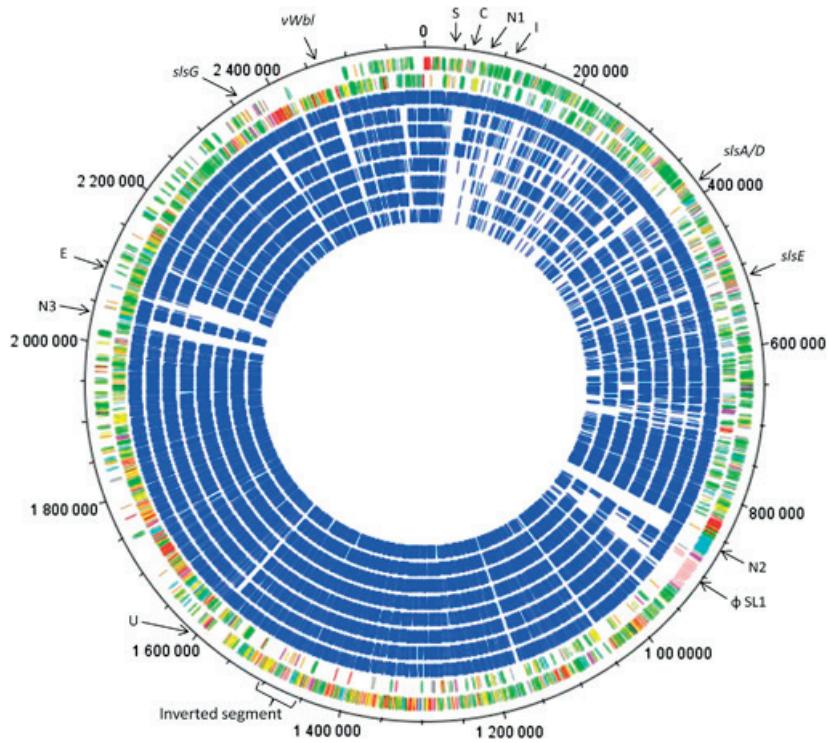
des interventions chirurgicales. En effet 60 % et 37 % des patients atteints d'EI à *S. epidermidis* et à *S. aureus* respectivement ont besoin d'un acte chirurgical alors qu'il est réalisé chez 70 % des malades atteints d'EI à *S. lugdunensis* (Anguera *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2010) (**Tableau 9**).

L'évolution destructrice de l'infection, la nécessité d'un remplacement valvulaire et la mortalité élevée montrent que *S. lugdunensis* est un véritable pathogène opportuniste (Vandenesh *et al.*, 1993a).

- **Autres infections**

D'autres infections impliquant *S. lugdunensis* telles que des bactériémies (Pfaller *et al.*, 1999), infections buccales et oculaires (Bannerman *et al.*, 1997 ; You *et al.*, 1999), péritonites (Schnitzler *et al.*, 1998), infections des voies urinaires (Haile *et al.*, 2002), infections du système nerveux central (Gianella *et al.*, 2006) et fasciites nécrosantes (Delaunay *et al.*, 2014) ont également été rapportées.

*S. lugdunensis* apparaît au huitième rang des espèces staphylococciques isolées dans les bactériémies (Pfaller *et al.*, 1999) qui sont souvent associées à des infections sur les cathéters veineux et les dispositifs étrangers (Zinkernagel *et al.*, 2008). Plusieurs cas de septicémie et de choc septique provoqués par *S. lugdunensis* ont été documentés (Fleurette *et al.*, 1989 ; Castro et Dowdy, 1999). Parmi un ensemble de patients atteints d'infections oculaires, une étude a montré que *S. lugdunensis* est retrouvé dans 5,9 % des CoNS isolés, juste derrière *S. epidermidis* dont la fréquence d'isolement est de 81,9 % (Bannerman *et al.*, 1997). Fait intéressant, plusieurs cas de péritonites à *S. lugdunensis* ont été décrits et elles ressemblaient fortement à celles causées par *S. aureus* entraînant des abcès au niveau du cathéter (Schnitzler *et al.*, 1998). Plus rarement, *S. lugdunensis* est impliqué dans des infections des voies urinaires et sa fréquence de détection au sein des CoNS retrouvés dans les cultures d'urine est de 6 % (Haile *et al.*, 2002). De plus, des infections du système nerveux central associées à des abcès cérébraux causés par *S. lugdunensis* ont été rapportées (Fleurette *et al.*, 1989 ; Gianella *et al.*, 2006) et seulement six cas de méningite ont été signalés (Azimi *et al.*, 2020). Par ailleurs, deux patients ont présenté une fasciite nécrosante abdominale à *S. lugdunensis* nécessitant une exérèse large de la nécrose en urgence (Delaunay *et al.*, 2014). Tous ces rapports de cas confirment le fait que, parmi les CoNS de la flore cutanée du patient, *S. lugdunensis* joue un rôle important dans l'apparition de nombreuses infections.



**Figure 5 : Diagramme circulaire schématique du chromosome de *S. lugdunensis* N920143.**

L'homologie partagée avec d'autres souches de Staphylocoques est représentée par les cercles bleus (de l'extérieur vers l'intérieur) : *S. lugdunensis* HKU09-01, *S. aureus* SARM252, *S. aureus* SASM476, *S. epidermidis* RP62a73, *S. haemolyticus* JCSC1435, *S. saprophyticus*, *S. carnosus* et *Macrococcus caseolyticus*.

D'après Heilbronner *et al.*, 2011.

**Tableau 10 : Représentation des données du séquençage du génome entier des 7 souches de *S. lugdunensis* et comparaison avec la souche de référence de *S. lugdunensis* N920143.**

D'après Argemi *et al.*, 2017b.

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%)

### 1.1.5. Données génomiques

Le premier génome entièrement séquencé de *S. lugdunensis* a été publié en 2010 à partir de la souche HKU09-01 isolée d'un prélèvement de pus cutané (Tse *et al.*, 2010). Le second génome de *S. lugdunensis* a été séquencé en 2011 à partir de la souche N920143 provenant d'un abcès de sein (Heilbronner *et al.*, 2011). Les génomes présentent une homologie de 95,4 % avec une taille de 2,5 à 2,6 millions de paires de bases (Mbp), un GC% de 33,7 % à 33,9 % et 2 447 à 2 489 cadres ouverts de lecture (Tse *et al.*, 2010 ; Heilbronner *et al.*, 2011). L'assemblage et l'annotation de ces deux génomes ont permis d'identifier plusieurs gènes codant des facteurs de virulence (capsules, toxines, hémolysines putatives, protéines ancrées en surface), de colonisation, de restriction et de montrer la présence de nombreux EGM (plasmides et prophages) (Heilbronner *et al.*, 2011). En comparaison avec les séquences d'autres staphylocoques, le génome de la souche N920143 partage 78,3 % d'homologie avec celui de *S. haemolyticus* JCSC1435, 77,8 % avec celui de *S. aureus* SARM252 et 74,7% d'identité avec celui de la souche de *S. epidermidis* RP62a73 (Heilbronner *et al.*, 2011) (**Figure 5**). La séquence dite de référence pour *S. lugdunensis* a été attribuée à la séquence correctement annotée de la souche N920143, facilitant ainsi l'étude de la mécanistique de la colonisation et de la pathogénèse par le biais du clonage et de la construction de mutants spécifiques.

En 2017, le séquençage complet de 7 souches de *S. lugdunensis* (d'infections diverses et d'une colonisation) a été réalisé (Argemi *et al.*, 2017b). Ces génomes sont très conservés entre eux puisqu'ils présentent une homologie de séquence comprise entre 94 et 97 % (Argemi *et al.*, 2017b) (**Tableau 10**). Une seconde équipe française a effectué le séquençage complet de 6 souches (pathogènes et de portage) de *S. lugdunensis* en 2019 (Lebeurre *et al.*, 2019). La taille des génomes et le GC% sont très similaires aux 7 premières souches de *S. lugdunensis* précédemment présentées (Argemi *et al.*, 2017b ; Lebeurre *et al.*, 2019). Plus récemment en 2020, le génome de la souche de *S. lugdunensis* JICS135 possédant une résistante à la méticilline a été entièrement séquencé et a montré que la taille de son génome était légèrement plus grande que celle des autres CoNS en raison de la présence de la cassette SCCmec (Shibuya *et al.*, 2020).



À travers une analyse génomique comparative, les pan-génomes et les core-génomes ont été étudiés chez *S. lugdunensis* (15 souches), *S. aureus* (15 souches) et *S. epidermidis* (13 souches) (Argemi *et al.*, 2018). Les trois espèces de staphylocoques possèdent un core-genome très similaire avec 2 000 gènes identifiés (Argemi *et al.*, 2018). Néanmoins, celui de *S. lugdunensis* apparaît hautement plus conservé. En effet, les staphylocoques présentent un pan-génome « ouvert » avec un répertoire génique qui augmente lorsque de nouvelles séquences sont ajoutées à la base de données, tandis que *S. lugdunensis* possède un pan-génome « fermé » avec un nombre limité de nouveaux gènes. Cela est probablement dû à la présence de nombreux systèmes empêchant le transfert horizontal de gènes tels que des systèmes de restriction-modification (R-M), CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) et toxine/antitoxine (T/AT) (Argemi *et al.*, 2018). De plus, une analyse de typhage de *S. lugdunensis* a été amorcée et les profils de MLST (MultiLocus Sequencing Typing) ont révélé 7 complexes clonaux (CC). Aucun lien n'a pu être démontré entre l'origine clinique des souches et le complexe ou sous-groupe clonal (Dahyot *et al.*, 2018).

Comparé à *S. aureus* et à *S. epidermidis*, le nombre de séquences génomiques disponibles sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) est faible. À ce jour, seulement 38 génomes assemblés et annotés sont répertoriés dans la base de données NCBI alors qu'il en existe 13 393 et 1111 pour *S. aureus* et *S. epidermidis* respectivement.

De plus en plus utilisé en Microbiologie, le séquençage du génome entier est un outil puissant qui a permis de caractériser *S. lugdunensis* comme un commensal cutané bien équipé pour la survie et la compétition sur la peau humaine (Heilbronner *et al.*, 2011). La présence de facteurs de virulence peut expliquer le comportement agressif de *S. lugdunensis*, semblable à celui de *S. aureus*, qui le distingue des autres CoNS (Heilbronner *et al.*, 2011).



# VIRULENDE DE S. LUGDUNENSIS

---



## 2. VIRULENCE DE *S. LUGDUNENSIS*

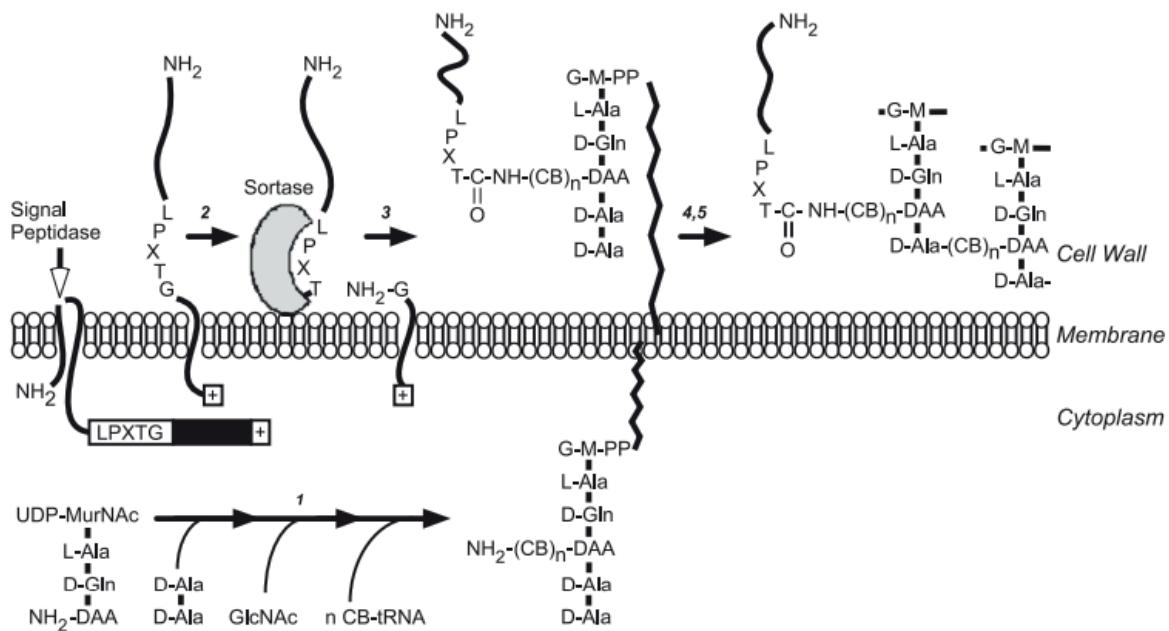
### 2.1. Facteurs de colonisation et de virulence

Les staphylocoques sont des bactéries opportunistes car ils ont la capacité de coloniser différentes niches de la peau, et certains possèdent des facteurs de virulence. Ils sont ainsi capables de se fixer et de se développer sur des surfaces artificielles de corps étrangers insérés chez l'hôte, et de provoquer des infections avec des formes graves (Heilmann *et al.*, 2019). *S. lugdunensis* se distingue en raison de sa pathogénicité associée à un potentiel de virulence élevé ressemblant plus à celle de *S. aureus* qu'aux autres CoNS (Heilbronner *et al.*, 2011).

#### 2.1.1. Facteurs de colonisation

Un facteur critique de pathogénicité des CoNS, dont *S. lugdunensis*, est la faculté à coloniser les surfaces abiotiques des dispositifs médicaux ou les surfaces biotiques telles que les matières étrangères recouvertes de cellules de l'hôte. Cette forte capacité d'adhésion bactérienne est médiée par des protéines nommées MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule) et par la formation de biofilm (Heilmann *et al.*, 2019).

L'adhérence bactérienne est attribuée aux protéines de surface, qui sont liées de façon covalente au peptidoglycane ou associées de façon non covalente à la surface (Heilmann *et al.*, 2019). Parmi celles liées de façon covalente, on retrouve principalement les protéines de surface de la famille des MSCRAMM, connues sous le nom d'adhésines, et décrites comme des composants de surface microbiens qui sont capables de reconnaître les molécules d'une matrice adhésive (Patti *et al.*, 1994). Elles peuvent se lier directement à un récepteur membranaire cellulaire ou alors à un des facteurs de la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte (Patti *et al.*, 1994). Dans certaines infections, l'interaction entre les protéines MSCRAMM et la MEC est une étape clé de la pathogénèse bactérienne. La MEC est composée d'un mélange de composants tels que le collagène, le fibrinogène, la laminine, la fibronectine, et l'élastine. Ces composants sont reliés à des récepteurs cellulaires (intégrines) et peuvent servir de cibles attrayantes et de substrats pour les bactéries (Patti *et al.*, 1994). Fait intéressant, *S. lugdunensis* est capable de se lier à certains composants de la MEC, notamment le collagène (de type I et IV), le fibrinogène, la laminine, la vitronectine, la thrombospondine et le plasminogène (Paulsson *et al.*, 1993).



**Figure 6 : Les différentes étapes de l'ancrage d'une protéine de surface à la paroi bactérienne.**

1 : La synthèse de la paroi cellulaire commence dans le cytoplasme bactérien *via* l'assemblage de peptides de paroi appelés précurseurs. Une fois le précurseur transféré, il est transloqué à travers la membrane cytoplasmique.

2 : Les protéines de surface sont synthétisées comme précurseurs dans le cytoplasme bactérien et possèdent un peptide signal N-terminal et un signal de tri C-terminal. Le signal de tri est composé d'un motif LPXTG (Leucine-Proline-X-Thréonine-Glcine), suivi d'un domaine hydrophobe (boîte noire) et d'une queue de résidus chargés positivement (+). Après le clivage du peptide signal N-terminal, le précurseur est transloqué, puis le domaine hydrophobe et la queue chargée retiennent la protéine de surface dans la membrane.

3 : Le précurseur est un substrat pour le clivage par la sortase, une transpeptidase ancrée dans la membrane. La SrtA clive le précurseur entre la thréonine et la glycine du motif LPXTG.

4, 5 : La protéine de surface est incorporée dans l'enveloppe de la paroi cellulaire, au niveau du peptidoglycane, par les réactions de transglycosylation et de transpeptidation. La paroi cellulaire est alors mature.

D'après Ton-That *et al.*, 2004.

Les protéines MSCRAMM possèdent une organisation structurelle commune définie par la présence d'un peptide signal, un domaine de liaison au ligand, des séquences répétées, un domaine caractéristique hydrophobe de la paroi et de la membrane cellulaire, ainsi qu'un motif d'ancrage à la paroi LPXTG (Heilmann *et al.*, 2019). L'ancrage de ces protéines s'effectue par un mécanisme universel (Ton-That *et al.*, 2004) (**Figure 6**). Lorsqu'une protéine MSCRAMM est traduite dans le cytoplasme, elle est transloquée vers la paroi grâce à son peptide signal (Ton-That *et al.*, 2004). Ensuite, la protéine est clivée par une peptidase puis l'attachement de la protéine à la paroi bactérienne se fait grâce à une sortase A (SrtA) qui reconnaît le domaine d'ancrage possédant le motif LPXTG de la protéine (Ton-That *et al.*, 2004).

Après la fixation des bactéries *via* les protéines MSCRAMM, la formation d'une matrice structurée en trois dimensions composées de bactéries et de biopolymères extracellulaires (biofilm) constitue pour les staphylocoques le deuxième facteur majeur de colonisation (Heilmann *et al.*, 2019). Les biofilms se forment sur les dispositifs médicaux présents chez l'hôte, les bactéries se retrouvent alors protégées contre le système immunitaire et contre l'antibiothérapie. Cela explique pourquoi les infections provoquées par des bactéries ayant formé un biofilm sont les plus difficiles à éradiquer (Heilmann *et al.*, 2019).

Chez *S. lugdunensis*, plusieurs protéines dont certaines qui appartiennent à la famille des MSCRAMM ont été identifiées (Heilbronner *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que *S. lugdunensis* est capable de former un biofilm, ce qui lui confère un atout majeur pour la colonisation et un facteur de virulence essentiel pour provoquer des infections sur matériel (Frank *et al.*, 2008 ; Argemi *et al.*, 2017d). À ce jour, trois protéines impliquées dans l'adhésion et l'autolyse chez *S. lugdunensis* ont été caractérisées : la protéine de liaison au fibrinogène Fbl, la protéine de liaison au facteur von Willebrand vWbl (von Willebrand of *S. lugdunensis*) et l'autolysine AtL (Mitchell *et al.*, 2004 ; Nilsson *et al.*, 2004b ; Bourgeois *et al.*, 2009).

- **Protéine de liaison au fibrinogène**

Le fibrinogène est une protéine majoritairement retrouvée dans le plasma sanguin et est un composant de la MEC. Il a pour fonction de contrôler la perte de sang dans les tissus endommagés en formant des caillots de fibrine (Nilsson *et al.*, 2004a). Certaines bactéries ont développé des protéines spécifiques qui se lient au fibrinogène, et qui sont capables de cliver le fibrinogène en fibrine entraînant la libération de fibrinopeptides, qui sont des immunostimulants (Nilsson *et al.*, 2004a). Plusieurs études ont documenté l'importance de ces différentes protéines de liaison au fibrinogène au cours de l'infection, notamment chez *S. aureus* (Moreillon *et al.*, 1995 ; Palma *et al.*, 1996).

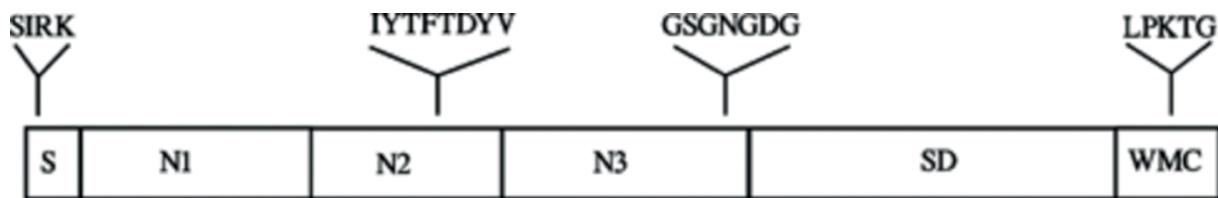


Figure 7 : Représentation schématique de la protéine Fbl de *S. lugdunensis*.

Les différentes régions indiquées correspondent au peptide signal (S), aux domaines N1, N2 et N3, à la région de répétition SD et à la région WMC (W pour *well spanning*, M pour *membrane spanning* et C pour *cytoplasmic positively charge tail*).

D'après Nilsson *et al.*, 2004a.

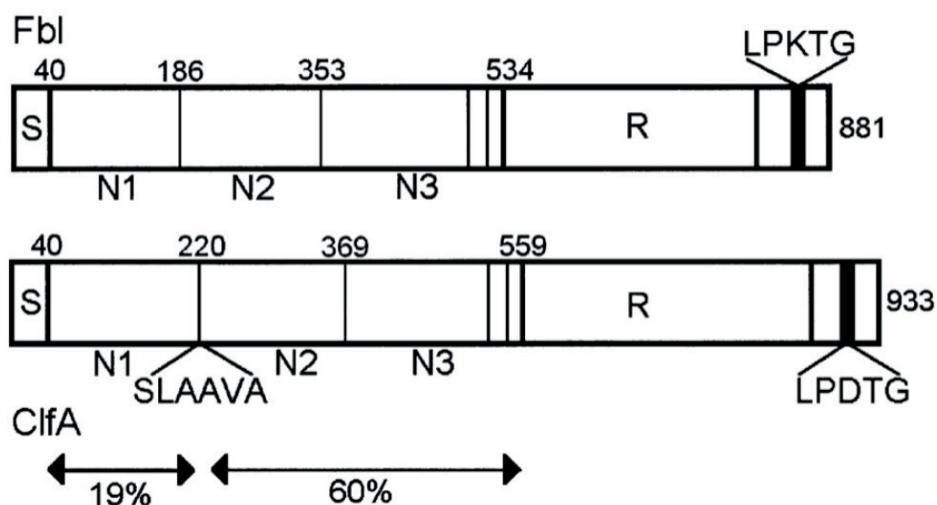


Figure 8 : Représentation schématique de la protéine Fbl de *S. lugdunensis* et de la protéine ClfA de *S. aureus*.

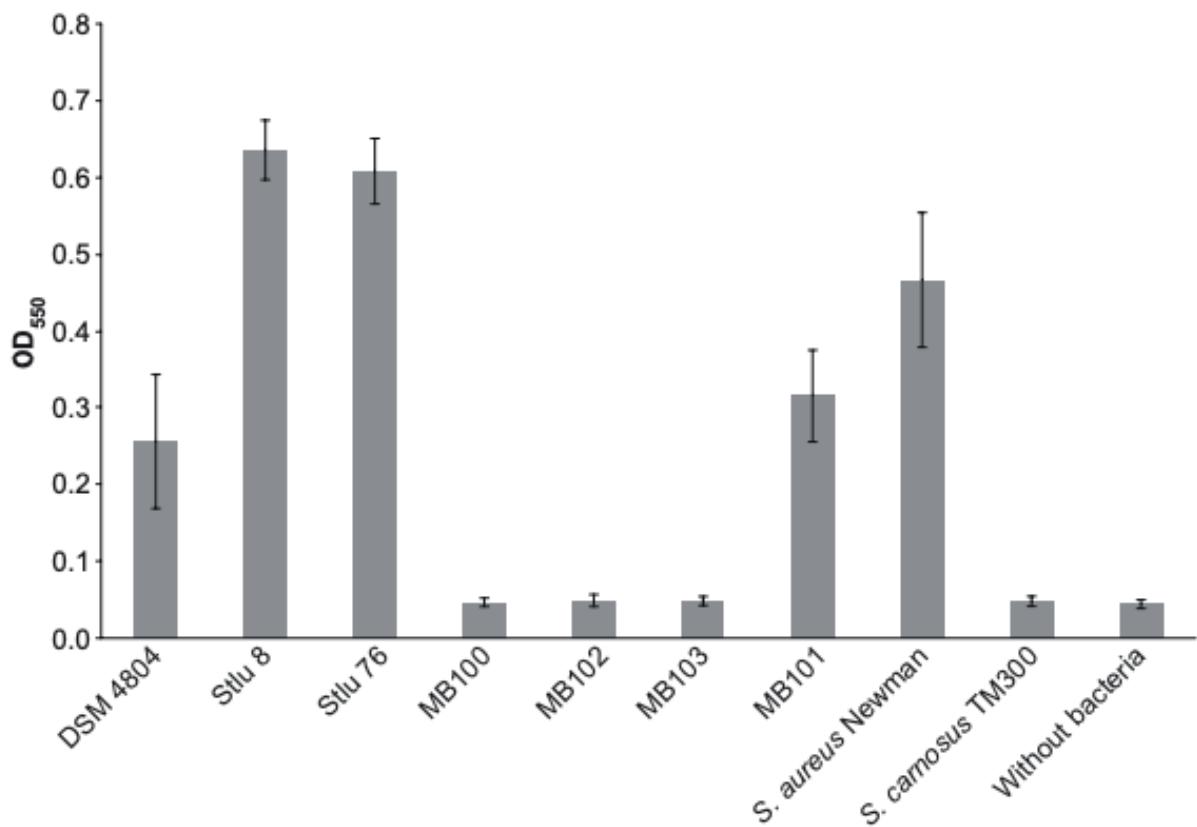
Les pourcentages d'identité des domaines N1, N2 et N3 sont indiqués sous les flèches. Fbl ne contient pas le motif de clivage par la métalloprotéase SLAAVA qui coupe en deux les régions N2 et N3 de ClfA. La région R répétée de Fbl diffère de celle de ClfA car elle comprend un motif hexapeptidique SDSDSA.

D'après Mitchell *et al.*, 2004.

Appartenant à la famille des MSCRAMM, la protéine Fbl de *S. lugdunensis* est une adhésine codée par le gène *fbl* (Mitchell *et al.*, 2004 ; Nilsson *et al.*, 2004a). Une étude a montré que la présence du gène *fbl* était spécifique de *S. lugdunensis* puisqu'il a été détecté chez tous les isolats de *S. lugdunensis* alors qu'aucune amplification par PCR (Polymerase Chain reaction) n'a été obtenue pour les 98 autres isolats qui correspondaient à 11 espèces de staphylocoques et 17 espèces non staphylococciques (Chatzigeorgiou *et al.*, 2010). Compte tenu du fait que le gène *fbl* semble être conservé chez *S. lugdunensis*, il est utilisé comme cible spécifique d'identification de l'espèce par le biais d'une PCR qui est alors employée comme un outil de diagnostic simple et fiable dans le domaine clinique (Chatzigeorgiou *et al.*, 2010).

La protéine Fbl, composée de 881 acides aminés, est constituée de 6 régions différentes qui sont le peptide signal, les domaines N1, N2, N3, la région de répétition SD et la région WMC (Nilsson *et al.*, 2004a) (**Figure 7**). Au niveau N-terminal se trouve le peptide signal qui possède un motif YSIRK-G/S permettant une sécrétion efficace de la protéine. Une région de 494 acides aminés est située après la séquence signal et est divisée en 3 domaines N1, N2 et N3. Les domaines N2 et N3 assurent la liaison au fibrinogène. Après le domaine N3, est présente une région hautement répétitive (résidus SDSDSA) de 270 acides aminés appelée région SD, qui est requise pour l'expression fonctionnelle du domaine de liaison au fibrinogène sur la surface bactérienne. La partie C-terminale contient la région WMC qui est pourvue d'un motif LPXTG d'ancrage à la paroi cellulaire suivi d'un domaine transmembranaire hydrophobe se terminant par plusieurs résidus d'acides aminés chargés (Nilsson *et al.*, 2004a). Toutes ces caractéristiques sont typiques des protéines liées à la surface des bactéries à Gram positif.

Des similitudes entre la protéine Fbl de *S. lugdunensis* et d'autres protéines de surface cellulaires staphylococciques ont été observées. En effet, la région qui permet la liaison au fibrinogène (domaine N2 et N3) de Fbl présente une homologie de 60 % en acides aminés avec celle du facteur de virulence ClfA de *S. aureus* impliqué dans la liaison au fibrinogène et aux plaquettes et de 30 % avec celle de la protéine de liaison au fibrinogène Fbe de *S. epidermidis* (Mitchell *et al.*, 2004 ; Nilsson *et al.*, 2004a) (**Figure 8**). Les domaines N1 de Fbl et ClfA ne sont que partiellement identiques puisque le pourcentage d'homologie est de 19 % (Mitchell *et al.*, 2004). La protéine Fbl présente également une similitude organisationnelle avec la protéine ClfA malgré l'absence du site de clivage de la metalloprotéase SLAAVA dans Fbl et une différence de motifs dans les régions de répétition. Dans la protéine Fbl, la région de répétition SD est constituée des motifs SDSDSA codés par 18 paires de bases (pb) GAY TCN GAY AGY GAY GCR, tandis que la région SD de ClfA comprend des répétitions codées par GAY TCN GAY TCN GAY AGY (où R est une purine, Y est une pyrimidine et N est une base quelconque) (Mitchell *et al.*, 2004).



**Figure 9 : Adhérence des souches mutantes pour le gène *fbl* de *S. lugdunensis* au fibrinogène en phase solide.**

La liaison au fibrinogène en phase solide a été testée pour la souche de référence *S. lugdunensis* DSM 4804, les souches cliniques *S. lugdunensis* Stlu 8 et Stlu 76, les mutants  $\Delta fbl$  de *S. lugdunensis* (MB100, MB102 et MB103), la souche *S. lugdunensis* mutée pour le gène *fbl* et complémentée (MB101), la souche *S. aureus* Newman utilisée comme témoin positif et la souche *S. carnosus* TM 300 (connue pour ne pas lier le fibrinogène) utilisée comme témoin négatif. Les trous recouverts de fibrinogène sans bactérie ont été utilisés comme témoin négatif. La liaison du fibrinogène a été réalisée dans trois expériences indépendantes mesurées dans au moins six trous en même temps. Les barres d'erreurs et la moyenne sont représentées.

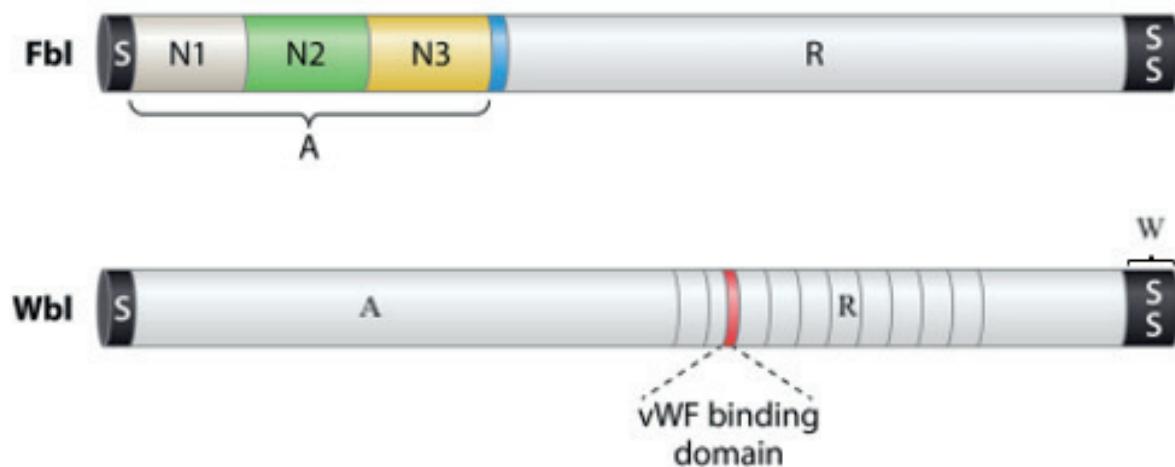
D'après Marlinghaus *et al.*, 2012.

Le nombre de répétitions de ces motifs varie selon les souches, néanmoins il a été montré que l'adhésion des souches de *S. aureus* au fibrinogène est dépendante du nombre de motifs répétés (Hartford *et al.*, 1997). Le nombre de répétitions doit être suffisamment important (résidus supérieurs à 72) pour permettre aux molécules de ClfA de couvrir toute la paroi cellulaire rendant alors possible la liaison au fibrinogène (Hartford *et al.*, 1997).

La protéine Fbl de *S. lugdunensis* a été caractérisée comme une protéine de liaison au fibrinogène par des méthodes indirectes (Mitchell *et al.*, 2004). Grâce au clonage du gène *fbl* chez *Lactococcus lactis*, une première étude a montré l'expression hétérologue de la protéine Fbl, permettant à cette souche de pouvoir lier le fibrinogène, puis en utilisant des anticorps spécifiques, l'inhibition de la liaison au fibrinogène a été observée (Mitchell *et al.*, 2004). Dans une seconde, la première manipulation génétique dirigée chez *S. lugdunensis* a été réalisée et les auteurs ont réussi à construire trois mutants délétés pour le gène *fbl* qui entraînent une absence d'adhérence au fibrinogène immobilisé et soluble. Cette inhibition de liaison a ensuite été restaurée par complémentation du gène *fbl* (Marlinghaus *et al.*, 2012) (**Figure 9**). Cette étude confirme le rôle de Fbl dans l'adhérence des souches au fibrinogène et indique que cette liaison est uniquement médiée par Fbl (Marlinghaus *et al.*, 2012). De plus, une troisième étude s'est intéressée à la localisation de la liaison au fibrinogène pour Fbl et ClfA. Les résultats obtenus ont mis en évidence que ces deux protéines se lient de façon similaire à cette glycoprotéine, au niveau de l'extrémité C de la chaîne γ (Heilbronner et Foster, 2021) et que le site de liaison est situé entre les domaines N2 et N3 (Geoghegan *et al.*, 2010).

Bien que le gène *fbl* soit retrouvé chez toutes les souches de *S. lugdunensis*, des différences dans la liaison au fibrinogène ont été remarquées en fonction des souches (Szabados *et al.*, 2011). En effet, parmi 58 souches testées, toutes possédaient le gène *fbl*, mais la liaison au fibrinogène n'a été trouvée que dans 27,9 % des isolats (Szabados *et al.*, 2011). Ces différences peuvent s'expliquer par une différence d'expression de la protéine Fbl en fonction des souches et par la production de la capsule de *S. lugdunensis* qui pourrait masquer l'accessibilité de Fbl au niveau de la surface pour le fibrinogène (Szabados *et al.*, 2011). A noter que chez *S. aureus*, les liaisons au fibrinogène et à la fibronectine varient également selon les souches (Ythier *et al.*, 2010).

En considérant que Fbl présente de nombreuses caractéristiques similaires à ClfA, il est possible de supposer que Fbl soit l'un des principaux facteurs de colonisation et de virulence de *S. lugdunensis*.



**Figure 10 : Schéma de deux protéines de surface ancrées à la paroi cellulaire, Fbl et vWbl, de *S. lugdunensis*.**

Les préprotéines ont une séquence signal (S) qui favorise la sécrétion à travers la membrane au niveau N-terminal et un signal de tri (SS) au niveau C-terminal pour l'ancrage au peptidoglycane.

Le domaine de liaison putatif minimum au vWf de la protéine vWbl est indiqué en rouge.

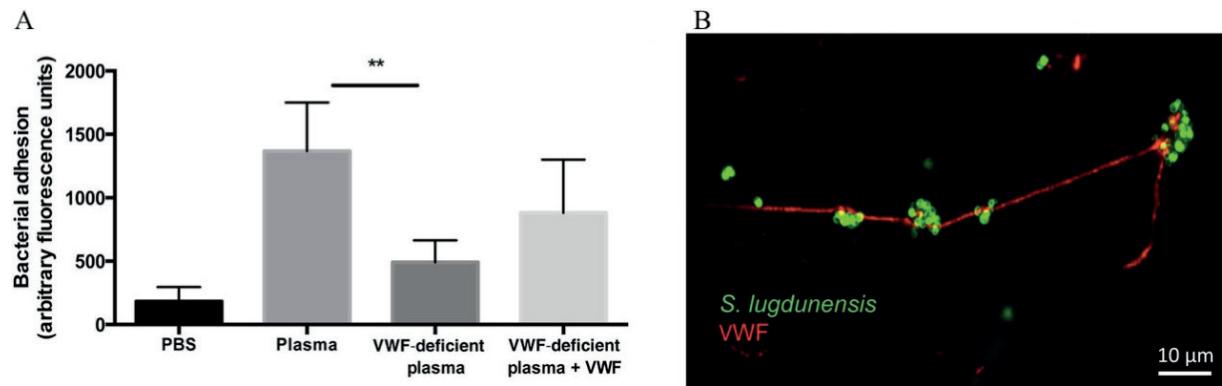
D'après Heilbronner et Foster, 2021.

- **Protéine de liaison au facteur von Willebrand**

Le facteur von Willebrand (vWf) est une glycoprotéine retrouvée dans le plasma et dans les granules des plaquettes et des cellules endothéliales (Nilsson *et al.*, 2004b). Ce facteur joue un rôle important dans l'hémostase puisqu'il permet, lors d'une lésion vasculaire, de se lier au collagène exposé aux sites de lésion et de favoriser l'adhésion et l'agrégation des plaquettes (Nilsson *et al.*, 2004b). Il est également impliqué en tant que transporteur et stabilisateur du facteur VIII qui a pour fonction d'accélérer la coagulation (Nilsson *et al.*, 2004b). Lors des infections, les bactéries vont tenter de se lier aux plaquettes et d'adhérer au système vasculaire. Dans ce but, elles expriment des protéines de surface qui favorisent leur attachement au tissu de l'hôte et sont principalement des protéines qui vont se lier aux plaquettes et au facteur vWf. Ces mécanismes sont connus pour être cruciaux pour la pathogénèse (Liesenborghs *et al.*, 2016 ; Heilbronner et Foster, 2021).

La protéine vWbl de *S. lugdunensis*, codée par le gène *vwbl*, possède 2 060 acides aminés et appartient à la famille des MSCRAMM, comme la protéine Fbl (Nilsson *et al.*, 2004a) (**Figure 10**). vWbl est constituée d'un peptide signal situé en position N-terminale qui possède un motif YSIRKG/S impliqué dans la sécrétion protéique (Nilsson *et al.*, 2004b). Ensuite, la région A qui contient un motif Arg-Gly-Asp (RGD) est retrouvée dans de nombreuses liaisons aux intégrines telles que la fibronectine, la laminine, le vWf et dans d'autres protéines de surface cellulaire (Nilsson *et al.*, 2004b). Ce motif favoriserait l'adhérence directe de *S. lugdunensis* aux cellules eucaryotes. La région de répétition R suit la région A où les répétitions sont au nombre de 10 et possèdent chacune 67 acides aminés (Nilsson *et al.*, 2004b). Enfin, en position C-terminale se trouve un domaine d'ancrage à la paroi, noté région W, avec un motif LPXTG permettant l'attachement des protéines de surface à la paroi cellulaire (Nilsson *et al.*, 2004b).

La séquence en acides aminés de la protéine vWbl a été comparée avec celle d'autres protéines de fonction similaire (intégrines, fibronectine, laminine, vWf) mais aucune similarité n'a été trouvée. La seule homologie décrite concerne la région de répétition R de vWbl qui présente une identité semblable à celle de la muramidase retrouvée chez *Streptococcus suis* et qui est une protéine ancrée à la paroi et impliquée dans la virulence (Nilsson *et al.*, 2004b).

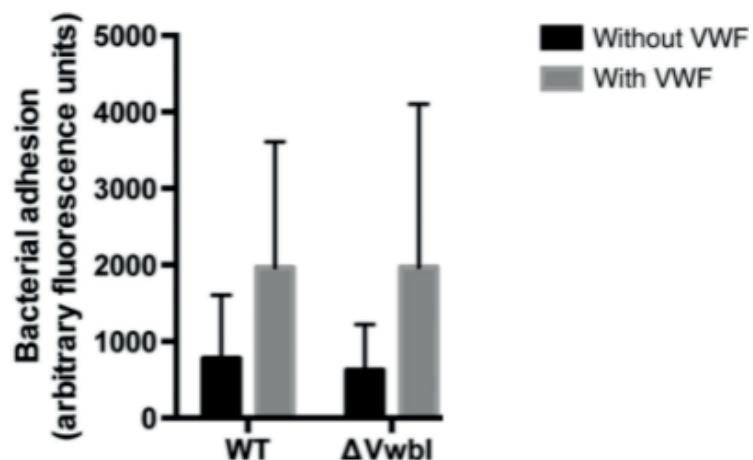


**Figure 11 : Liaison entre les cellules de *S. lugdunensis* et le vWf en condition de micro-circulation sanguine.**

A : Adhésion de *S. lugdunensis* N920143 sur des lamelles recouvertes de collagène en présence de tampon phosphate salin PBS (Phosphate-Buffered Saline), de plasma humain, de plasma déficient en vWf ou de plasma déficient en vWf supplémenté en vWf. Les résultats sont exprimés en moyenne avec les écart-types. \*\* P < 0,01, par le test t de Student apparié bilatéral.

B : Image immunofluorescente (grossissement $\times$ 630) de lamelles recouvertes de collagène après adhésion avec *S. lugdunensis* N920143 (en vert) marqué par fluorescence dans du plasma humain avec une immunocoloration pour le vWf (en rouge).

D'après Liesenborghs *et al.*, 2016.



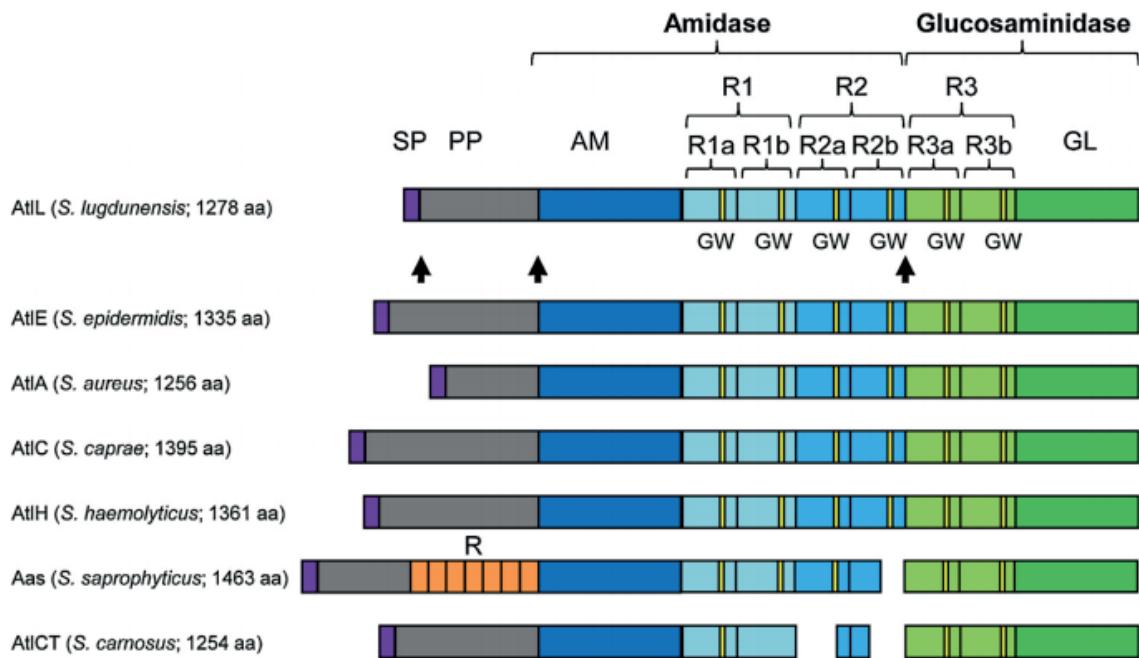
**Figure 12 : Liaison au collagène de la souche *S. lugdunensis* N920143 et du mutant *S. lugdunensis* dépourvu du gène *vWbl* en présence ou en l'absence de vWf.**

Les résultats sont exprimés en moyenne avec les écart-types. L'expérience a été répétée 7 fois.

D'après Liesenborghs *et al.*, 2016.

*S. lugdunensis* a acquis une « notoriété » pour provoquer une forme destructrice d’EI et l’une des étapes clés du développement est l’adhésion des bactéries aux valves cardiaques (Liesenborghs *et al.*, 2016). En utilisant un modèle de chambre de micro-circulation sanguine, une étude a montré que *S. lugdunensis* est capable de lier directement le vWF ce qui lui permet d’adhérer aux cellules endothéliales (**Figure 11**). Cependant *S. lugdunensis* est incapable de se lier aux plaquettes contrairement à la plupart des bactéries pathogènes (Liesenborghs *et al.*, 2016). Ensuite, dans un modèle murin d’endocardite, les auteurs ont mis en évidence que l’inflammation locale et la libération du vWF permettent à *S. lugdunensis* de se lier et de coloniser les valves cardiaques (Liesenborghs *et al.*, 2016). La capacité de *S. lugdunensis* à se lier au vWF peut donc expliquer que *S. lugdunensis* provoque des infections agressives, comme l’endocardite par rapport aux autres CoNS (Liesenborghs *et al.*, 2016). Cependant, la souche sauvage et le mutant de délétion du gène *vwb1* utilisés dans cette étude ont été capables de lier de façon similaire le vWF, ce qui suggère que l’adhésion au vWF est médiée par un facteur encore inconnu (Liesenborghs *et al.*, 2016) (**Figure 12**).

Parmi les CoNS, la liaison au vWF est une caractéristique qui est retrouvée uniquement chez *S. lugdunensis* et *S. aureus* (Liesenborghs *et al.*, 2016), ce qui renforce l’idée selon laquelle *S. lugdunensis* ressemblerait plus à *S. aureus* qu’aux autres CoNS. À ce jour, aucune étude n’a permis de caractériser la fonction spécifique de la protéine vWbl et il existe très probablement d’autres protéines associées à la surface qui permettent de lier les cellules de *S. lugdunensis* au vWF (Liesenborghs *et al.*, 2016 ; Heilbronner et Foster, 2021). Néanmoins, le vWF s’est avéré être essentiel dans l’adhésion aux cellules endothéliales chez *S. lugdunensis* et *S. aureus* et il est donc possible de suggérer que vWF joue également un rôle important dans les endocardites à *S. lugdunensis* (Liesenborghs *et al.*, 2016).



**Figure 13 : Représentation schématique des autolysines staphylococciques de type « Atl homologues ».**

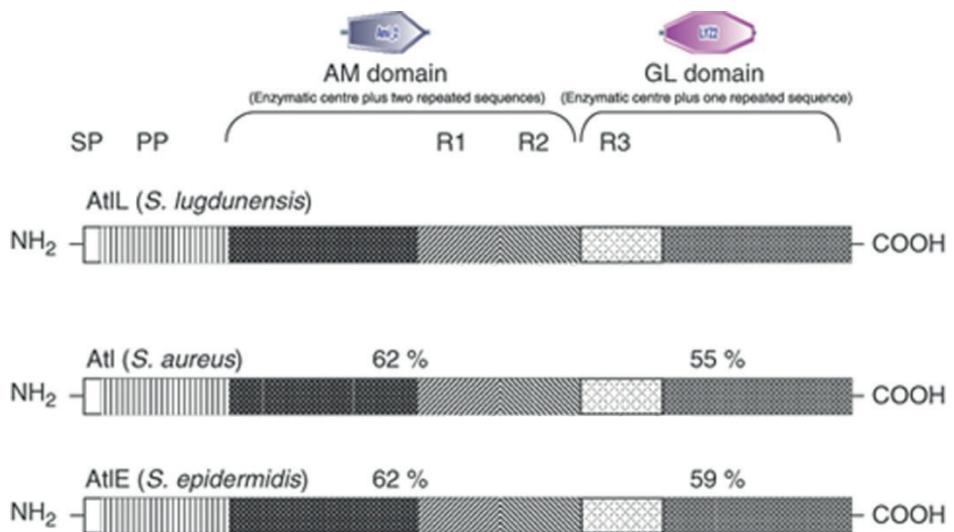
Les principales différences entre les différentes protéines Atl sont les propeptides (PP) qui varient en longueur, la présence de répétitions N-terminales uniques (R), la présence de troncatures dans la répétition R2 de l'autolysine Aas conduisant à l'absence d'un motif GW et des échanges supplémentaires conduisant à l'absence de 3 motifs GW dans l'autolysine AtlCT.

D'après Hussain *et al.*, 2015.

- **L'autolysine**

Comme déjà évoqué, pour initier des infections invasives, les staphylocoques doivent adhérer aux composants de la MEC et/ou aux cellules de l'hôte et cette adhésion est rendue possible grâce aux adhésines de surface comme les autolysines (Hussain *et al.*, 2015). Des autolysines de type Atl ont été décrites chez de nombreuses espèces de staphylocoques, telles que AtlA chez *S. aureus*, AtlE chez *S. epidermidis*, AtlC chez *S. caprae*, Aas chez *S. saprophyticus*, AtlH chez *S. haemolyticus*, AtlCT chez *S. carnosus* et Atl<sub>WM</sub> chez *S. warneri* M (Bourgeois *et al.*, 2009 ; Hussain *et al.*, 2015) (**Figure 13**). Caractérisées comme des enzymes bifonctionnelles, ces autolysines possèdent les deux activités enzymatiques de AM (N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase) et de GL (N-acétylglucosaminidase) (Bourgeois *et al.*, 2009). Elles jouent un rôle crucial dans la physiologie bactérienne, en maintenant un équilibre entre la synthèse et la dégradation du peptidoglycane, dans la séparation cellulaire lors des divisions cellulaires et probablement dans l'autolyse induite par les antibiotiques (Bourgeois *et al.*, 2009). Elles peuvent également contribuer à la pathogénèse bactérienne en libérant des facteurs de virulence et en favorisant l'adhérence bactérienne (Gibert *et al.*, 2014).

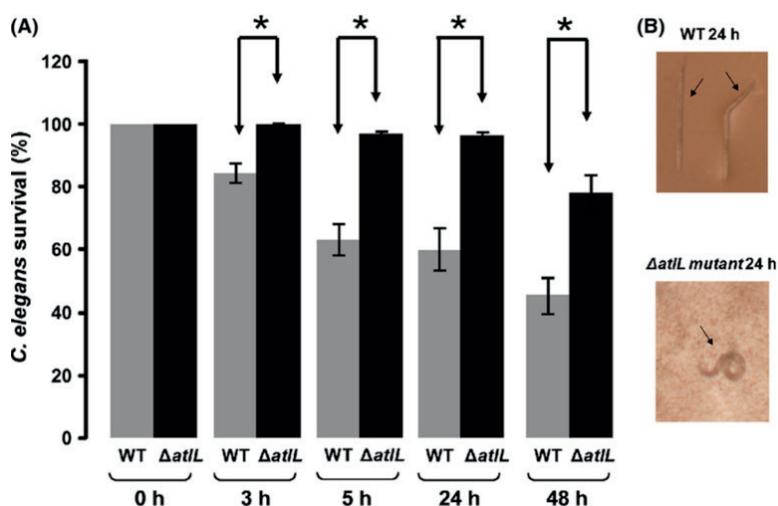
L'autolysine bifonctionnelle AtlL de *S. lugdunensis* est codée par le gène *atlL* et possède 1 278 acides aminés (Bourgeois *et al.*, 2009). Elle est composée de différentes régions comprenant le peptide signal, un propeptide, le domaine catalytique de type amidase (AM), trois régions répétées GW qui possèdent des motifs glycine-tryptophane et le domaine catalytique de type glucosaminidase (GL) (Bourgeois *et al.*, 2009 ; Hussain *et al.*, 2015) (**Figure 13**).



**Figure 14 : Organisation générale de l'AtIL de *S. lugdunensis*, l'AtIA de *S. aureus* et l'AtIE de *S. epidermidis* avec leurs pourcentages d'homologie en acides aminés.**

SP, peptide signal; PP, propeptide; AM, N- acétylmuramoyl- L- alanine amidase; R, séquence répétée; GL, N- acétylglucosaminidase; GW, dipeptide glycine-tryptophane.

D'après Bourgeois *et al.*, 2009.



**Figure 15 : Virulence de la souche sauvage DSM4804 de *S. lugdunensis* et du mutant  $\Delta atIL$  en modèle *C. elegans*.**

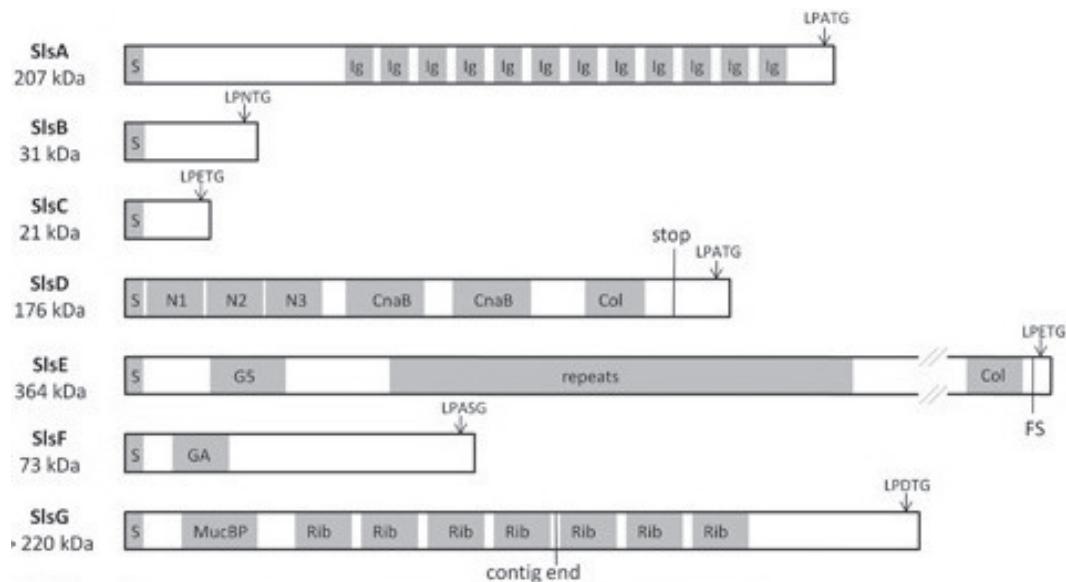
(A) Survie des vers après 48 h d'infection. Les moyennes et les écart-types de huit répétitions et de trois préparations indépendantes sont représentés. \*  $P < 0,001$ .

(B) Images représentatives de l'état du ver (indiqué par des flèches noires) dans chaque condition après 24 h d'infection.

D'après Gibert *et al.*, 2014.

Par analogie avec les autres autolysines staphylococciques de type Atl, les séquences d'acides aminés des domaines AM et GL d'AtIL de *S. lugdunensis* sont similaires avec celles des domaines correspondants d'AtIA de *S. aureus* et d'AtIE de *S. epidermidis* (Bourgeois et al., 2009). En effet, le domaine AM montre un pourcentage d'identité de 62 % pour les deux autolysines de *S. aureus* et *S. epidermidis*, et le pourcentage d'identité pour le domaine GL est de 55 % avec AtIA et 59 % avec AtIE (Bourgeois et al., 2009) (Figure 14).

La caractérisation fonctionnelle de l'autolysine AtIL de *S. lugdunensis* a été possible grâce à la construction d'un mutant de délétion du gène *atIL* (Gibert et al., 2014 ; Hussein et al., 2015). Dans l'étude de Gibert et al., l'analyse ultrastructurale a montré que le mutant  $\Delta atIL$  avait une séparation cellulaire entravée après la division cellulaire. De plus, l'analyse par Western-blot à différents stades de croissance a mis en évidence que les produits du gène *atIL* se sont accumulés en milieu de phase exponentielle lorsque la division cellulaire est très active. Par ailleurs, le gène *atIL* est exprimé durant toutes les phases de la croissance, avec toutefois un niveau élevé d'expression au stade exponentiel précoce (Bourgeois et al., 2009). Ces résultats suggèrent qu'AtIL joue un rôle lors de la séparation cellulaire (Gibert et al., 2014). L'activité autolytique du mutant  $\Delta atIL$  a été mesurée à l'aide du Triton X-100, détergent qui permet de lever l'inhibition exercée par les acides lipotéichoïques sur le système autolytique bactérien général. Le taux d'autolyse induit par le Triton X-100 était significativement diminué chez le mutant  $\Delta atIL$  ce qui signifie que l'autolysine AtIL est essentielle dans l'autolyse chez *S. lugdunensis* (Gibert et al., 2014). Des résultats similaires ont été observés avec le mutant  $\Delta atIA$  de *S. aureus* (Bose et al., 2012). Le mutant  $\Delta atIL$  de *S. lugdunensis* a également présenté une diminution de la formation de biofilm, et une atténuation de la virulence en modèle d'infection de *Caenorhabditis elegans* (Gibert et al., 2014) (Figure 15). Dans l'étude de Hussain et al., des tests d'adhérence par technique ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) ont été réalisés et ont montré qu'AtIL de *S. lugdunensis* se lie à la MEC et aux protéines plasmatiques telles que la fibronectine, le fibrinogène et la vitronectine ainsi qu'aux cellules endothéliales humaines EA.hy926 (Hussain et al., 2015). De plus, les auteurs ont démontré que la protéine AtIL joue un rôle dans l'internalisation de *S. lugdunensis* par les cellules eucaryotes puisque le mutant  $\Delta atIL$  avait moins adhéré aux cellules et moins internalisé par les cellules eucaryotes que la souche sauvage (Hussain et al., 2015). Comme dans l'étude de Gibert et al., le mutant  $\Delta atIL$  de Hussain et al., a présenté une diminution dans la formation du biofilm (Hussain et al., 2015).



**Figure 16 : Schéma des 7 Sls (de A à G) identifiées chez *S. lugdunensis*.**

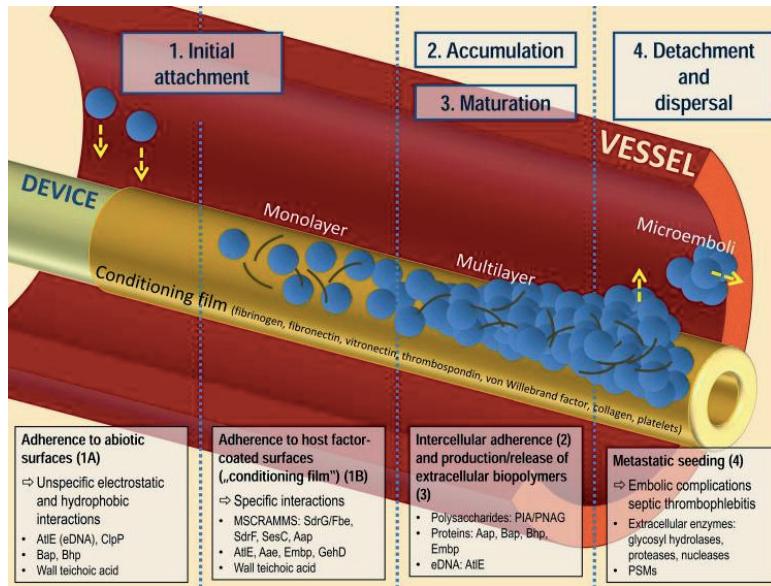
Les domaines prédictifs sont indiqués par les cases grises. S, peptide signal; GA, domaine de liaison à l'albumine; Ig, repli semblable à une immunoglobuline; Col, répétition triple hélice de collagène; G5, domaine G5; MucBP, domaine de liaison à la mucine; Rib, répétition de type Rib; N1, N2 et N3, domaine de liaison au fibrinogène; CnaB, domaine B similaire à l'adhésine Cna; FS, décalage.

D'après Heilbronner *et al.*, 2011.

- **Autres protéines de surface**

Le séquençage et l'analyse du génome de la souche N920143 de *S. lugdunensis* ont permis d'identifier 7 gènes qui codent potentiellement des protéines ancrées à la paroi nommées protéines de surface de *S. lugdunensis* Sls (*S. lugdunensis* surface) (Heilbronner *et al.*, 2011). Ces 7 Sls, notées de A à G, appartenant à la famille des MSCRAMM, ont une masse moléculaire qui varie de 20,8 à 380 kiloDaltons (kDa) et possèdent des régions conservées qui sont étroitement liées à la fonction d'adhésion bactérienne telles que la présence d'un peptide signal et d'un motif d'ancre à la paroi (Heilbronner *et al.*, 2011).

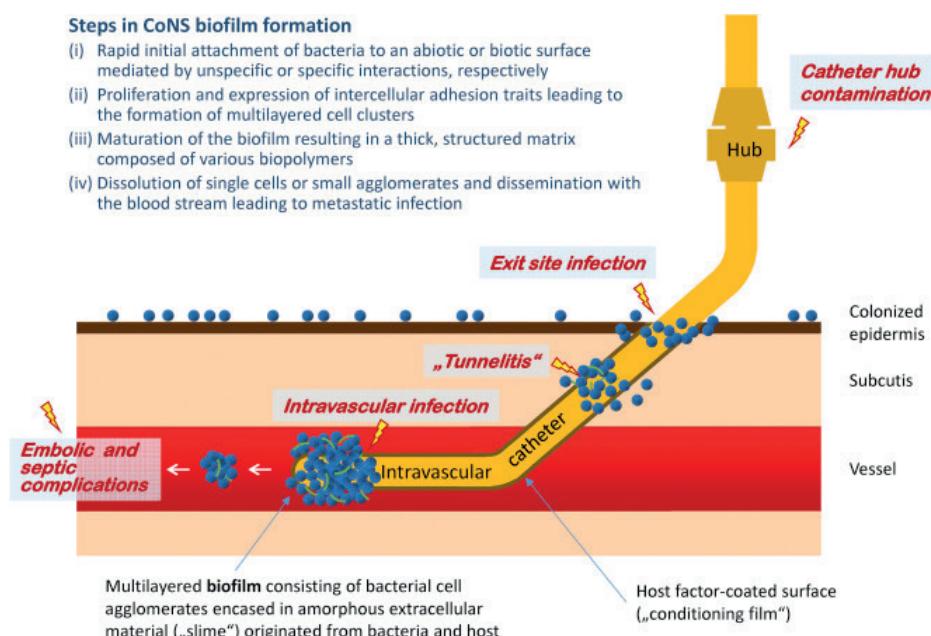
Parmi ces 7 protéines, l'analyse a révélé plusieurs caractéristiques intéressantes, notamment une organisation particulière et la présence de motifs de liaison aux cellules de l'hôte chez 5 d'entre elles (Heilbronner *et al.*, 2011) (**Figure 16**). Dans la protéine SlsA, 12 régions répétées non identiques comprenant un repli structurel similaire à une immunoglobuline de type IgG, situées entre la région N-terminale et le motif d'ancre à la paroi LPXTG ont été observées. Pour la protéine SlsD, des domaines N1, N2 et N3 présentant des similarités structurelles avec le domaine de liaison au fibrinogène de l'adhésine SdrG de *S. epidermidis* (Ponnuraj *et al.*, 2003) ont été identifiés. De plus, SlsD possède 2 régions répétées ayant des similitudes avec les régions B de la protéine de liaison au collagène Cna de *S. aureus* (Beulin et Ponnuraj, 2017). A noter qu'une mutation non-sens par insertion d'un codon stop est présente au niveau du motif LPXTG, il est donc probable que SlsD ne reste pas ancrée à la paroi. Concernant la protéine SlsE, l'analyse a révélé l'existence d'un domaine G5 de liaison à la N-acétylglucosamine qui existe également dans les protéines SasG et Aap (Accumulation-associated protein) de *S. aureus* et *S. epidermidis* jouant un rôle dans la formation de biofilm (Speziale *et al.*, 2014). Deux séquences CLS (Collagen-Like Sequence) et une région de 46 répétitions d'un motif comprenant 31 acides aminés sont également présentes. Fait intéressant, un décalage du cadre de lecture a été constaté, ce qui aurait pour conséquence la non-expression de cette protéine chez la souche *S. lugdunensis* N920143. Concernant la protéine SlsF, un domaine de liaison à l'albumine GA similaire à celui de *Peptostreptococcus magnus* (Johansson *et al.*, 1997) a été déterminé. Pour finir, la protéine SlsG comporte un domaine de liaison à la mucine MucBP suivi d'une région de répétitions de type Rib qui existent dans les protéines de surface des streptocoques du groupe B impliquées dans la protection contre la réponse immunitaire de l'hôte (Wästfelt *et al.*, 1996).



**Figure 17 : Pathogénèse des infections liées aux cathéters et facteurs influençant la genèse du biofilm.**

La formation d'un biofilm à la surface d'un cathéter intracellulaire résulte en un processus de quatre étapes, avec un attachement des CoNS à la surface du corps étranger (1), une phase d'accumulation prolongée qui implique une prolifération, une adhésion intercellulaire et une maturation (2 et 3), enfin, le biofilm se détache et se disperse, les CoNS dérivent dans la circulation sanguine, entraînant des complications métastatiques et emboliques (4).

D'après Becker *et al.*, 2014.



**Figure 18 : Pathogénèse de la formation de biofilm sur un cathéter.**

D'après Heilmann *et al.*, 2019.

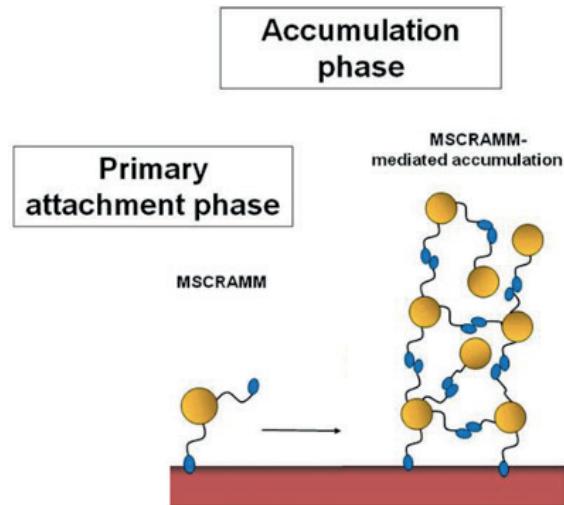
D'un point de vue fonctionnel, aucune étude ne s'est intéressée à analyser de façon spécifique ces protéines SIs, possiblement à cause de la difficulté des manipulations génétiques rencontrées chez *S. lugdunensis*. A l'avenir, il serait intéressant d'étudier et de caractériser ces 7 protéines qui sont vraisemblablement impliquées dans l'adhésion bactérienne aux cellules de l'hôte, dans l'échappement immunitaire et dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*.

- **La formation de biofilm**

La capacité à former un biofilm joue un rôle important dans la colonisation et la pathogenèse bactériennes. C'est un facteur majeur dans les infections staphylococciques associées aux dispositifs médicaux, particulièrement dans celles sur prothèse et cathéter provoquées par *S. lugdunensis* (Heilbronner et Foster, 2021) (**Figure 17**).

Les biofilms sont décrits comme des communautés microbiennes complexes et dynamiques associées à la surface et entourées d'une matrice de polymères extracellulaire autoproduite (Frank *et al.*, 2007). La formation d'un biofilm staphylococcique est un processus ordonné qui comprend plusieurs étapes spécifiques. Il est initié par une adhésion des cellules bactériennes à une surface, puis d'une prolifération cellulaire suivie d'une accumulation et d'une adhésion intercellulaire, ensuite une partie du biofilm peut se détacher et se disperser (Frank *et al.*, 2007 ; Becker *et al.*, 2014) (**Figure 18**).

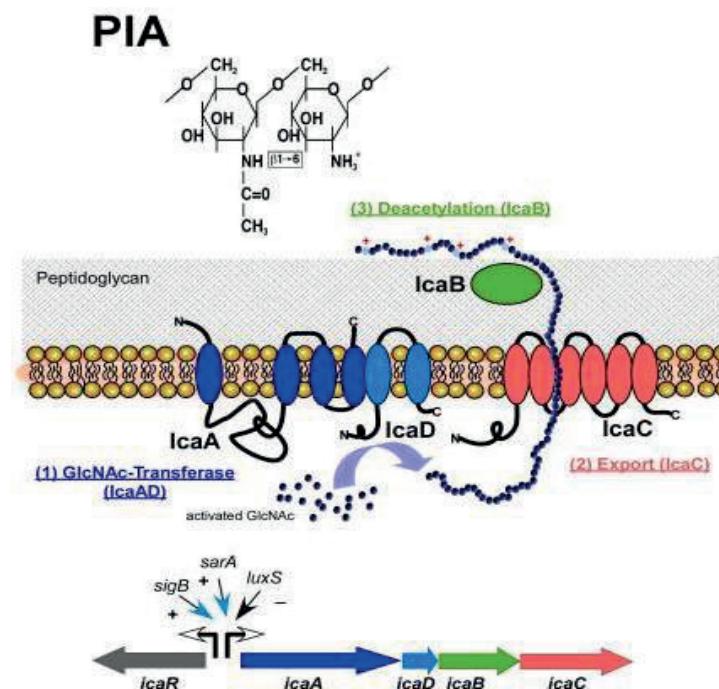
L'étape initiale de la formation d'un biofilm est la fixation des bactéries, qui peut se produire sur des surfaces biotiques (matériel médical) ou abiotiques (tissu de l'hôte). Elle dépend des caractéristiques physico-chimiques de la surface sur laquelle les bactéries vont se fixer, des protéines plasmatiques présentes à la surface et des composants de la surface bactérienne (Speziale *et al.*, 2014). Comme évoqué précédemment, les protéines de surface bactérienne MSCRAMM, notamment les adhésines et les autolysines, jouent un rôle essentiel dans cette adhésion puisqu'elles permettent des liaisons spécifiques favorisant l'attachement bactérien (Speziale *et al.*, 2014 ; Becker *et al.*, 2014).



**Figure 19 :** Illustration schématique montrant les étapes de la formation du biofilm staphylococcique influencée par les protéines de surface MSCRAMM ancrées dans la paroi cellulaire.

Les staphylocoques peuvent se fixer à la surface nue d'un dispositif étranger ou à un dispositif qui est recouvert de composants plasmatiques de l'hôte.

D'après Speziale *et al.*, 2014.



**Figure 20 :** La voie de synthèse du PIA/PNAG grâce au locus *ica*.

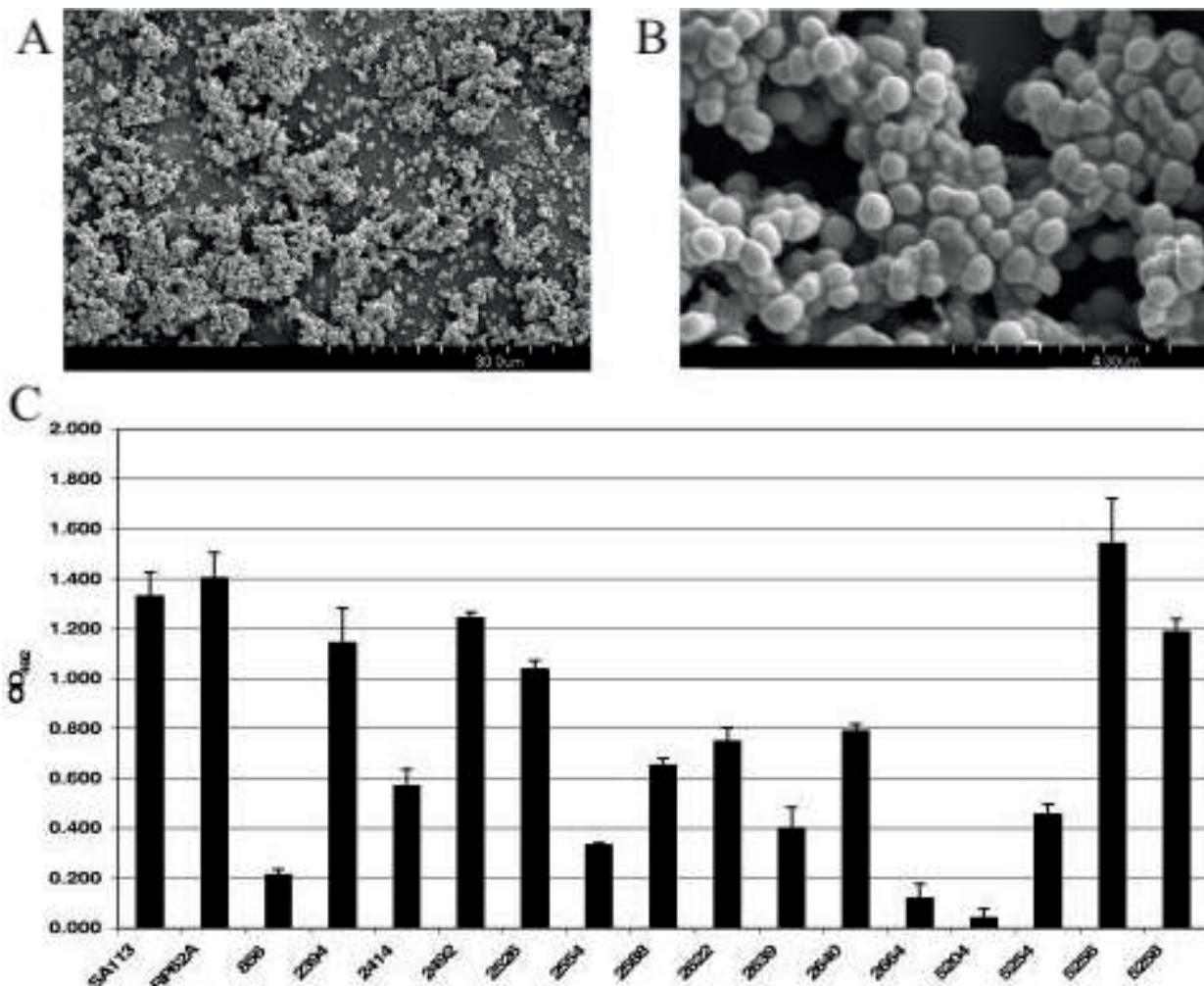
Le PIA/PNAG est synthétisé dans la cellule par l'activité combinée des enzymes membranaires IcaA et IcaD, et exporté par IcaC. IcaB élimine un certain pourcentage (20 %) de fragments N-acétyl, ce qui confère une charge positive à la molécule de PIA/PNAG ce qui permet l'ancrage du PIA/PNAG à la surface cellulaire chargée négativement.

D'après Otto, 2018.

Après l'adhésion des bactéries aux tissus ou aux dispositifs médicaux de l'hôte, le biofilm se développe par prolifération et par production d'une MEC (Speziale *et al.*, 2014 ; Becker *et al.*, 2014). Celle-ci est composée de l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA) connue aussi sous le nom de poly-N-acétyl-glucosamine (PNAG) (Mack *et al.*, 1996) et de l'ADNe (ADN extracellulaire) (Whitchurch *et al.*, 2002). La production de cette MEC va entraîner une adhésion intercellulaire entre les composants de la matrice et les protéines de surface bactérienne MSCRAMM. Ces MSCRAMM assurent donc l'adhésion initiale du biofilm, favorisent l'adhésion intercellulaire et l'accumulation ainsi que la maturation du biofilm (Speziale *et al.*, 2014 ; Becker *et al.*, 2014) (Figure 19). Les autolysines de type Atl, comme AtlL chez *S. lugdunensis*, via leur fonction enzymatique, hydrolysent le peptidoglycane de la paroi ce qui conduit à l'autolyse et à la libération d'ADNe (Becker *et al.*, 2014). Une étude a démontré que des mutations ponctuelles dans les domaines AM et GL d'AtLA de *S. aureus* entraînent la perte des fonctions enzymatiques et la perte de la formation de biofilm, soutenant davantage le rôle de la libération de l'ADNe médiée par Atl dans la formation du biofilm (Bose *et al.*, 2012).

Chez les staphylocoques, l'adhérence intercellulaire et la production de PIA/PNAG sont médiées par un locus de 4 gènes appelé *icaADBC* (intercellular adhesion) ainsi qu'un régulateur transcriptionnel IcaR (Heilmann *et al.*, 1996 ; Otto, 2018) (Figure 20). La protéine IcaA confère l'activité N- acétylglucosaminyltransférase et s'associe avec la protéine IcaD pour catalyser la synthèse d'oligomères à longue chaîne. IcaC est la protéine membranaire qui est impliquée dans l'elongation et l'export du PIA/PNAG. Localisée à la surface cellulaire, IcaB catalyse la désacétylation du PIA/PNAG en lui attribuant des charges positives qui sont primordiales pour son adhésion à la surface bactérienne (Heilmann *et al.*, 1996 ; Otto, 2018). Cette désacétylation semble être importante pour la virulence chez les staphylocoques car une étude a montré qu'un mutant  $\Delta$ *icaB* chez *S. epidermidis* était significativement moins persistant dans un modèle d'infection associé à un corps étranger chez la souris (Vuong *et al.*, 2004).

Cependant, la formation du biofilm ne dépend pas toujours de la production du PIA/PNAG. Il peut se former grâce à des interactions entre les bactéries et des protéines de surface, autres que les MSCRAMM (Speziale *et al.*, 2014). Chez *S. aureus*, la protéine Bap (Biofilm associated protein) a été décrite comme étant impliquée dans la formation de biofilm et dans l'adhésion intercellulaire en absence de PIA/PNAG (Cucarella *et al.*, 2001). Chez *S. epidermidis*, la protéine Bhp (Bap homolog protein) homologue à Bap de *S. aureus* a été identifiée et remplit les mêmes fonctions que Bap (Bowden *et al.*, 2005).



**Figure 21 : Caractérisation de la formation de biofilm des isolats cliniques de *S. lugdunensis*.**

A et B : Photos de microscopie électronique à balayage aux grossissements  $\times 1\,800$  (A) et  $\times 13\,000$  (B) du biofilm de *S. lugdunensis* IDRL-2640 formé sur un disque en élastomère de silicium après 24 h.

C : Formation de biofilm par *S. aureus* SA113, *S. epidermidis* RP62A et des 15 isolats cliniques de *S. lugdunensis* sur polystyrène pendant 24 h. Les biofilms ont été colorés à la safranine, remis en suspension dans 30 % d'acide acétique glacial et quantifiés par densité optique (DO) à 492 nm (nanomètre). Les moyennes et les barres d'erreur sont représentées, l'essai a été répété trois fois.

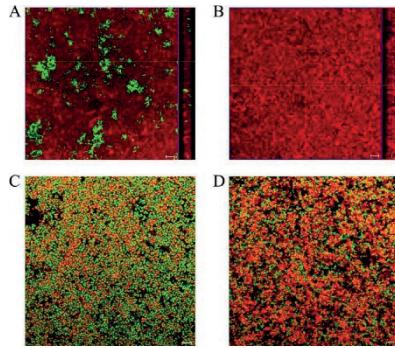
D'après Frank et Patel., 2007.

De plus, la protéine Aap de *S. epidermidis* et son homologue SasG chez *S. aureus* jouent également un rôle dans la production de biofilm indépendamment du PIA/PNAG car elles sont capables de former des fibrilles qui interconnectent les cellules (Otto, 2018). Par ailleurs, une étude a montré que la surproduction de la protéine A par *S. aureus* était responsable de l'agrégation bactérienne et de la formation de biofilm (Merino *et al.*, 2009). La caractérisation de la protéine Embp de *S. epidermidis* a permis de mettre en évidence sa capacité à se lier à la fibronectine, mais aussi son implication dans l'accumulation de biofilm (Christner *et al.*, 2010). Enfin, l'ADNe est libéré par le mécanisme d'autolyse et peut interagir avec les adhésines ce qui permet d'augmenter l'accumulation du biofilm (Montanaro *et al.*, 2011).

Finalement, le biofilm se détache car sa structure est perturbée par la dégradation enzymatique de certains composants de la matrice telles que des protéases, des nucléases, et des modulines phénol-solubles (PSM) ou par des forces mécaniques comme le flux sanguin. La dispersion du biofilm provoque la dissémination des bactéries chez l'hôte qui vont alors pouvoir coloniser de nouvelles surfaces et entraîner des complications de l'infection.

Comme pour d'autres staphylocoques, la colonisation et la formation de biofilm sur les tissus de l'hôte ou les dispositifs médicaux jouent un rôle important dans la pathogénèse de nombreuses infections causées par *S. lugdunensis*, notamment l'endocardite valvulaire native, l'infection articulaire prothétique et l'infection liée au cathéter intravasculaire (Frank et Patel, 2007).

Les propriétés de formation de biofilm *in vitro* chez *S. lugdunensis* ont été caractérisées par le biais d'une étude sur une collection de 15 isolats cliniques (Frank et Patel, 2007). Tous les isolats de *S. lugdunensis* étaient capables de former un biofilm dans une plaque de polystyrène, néanmoins certains présentaient un biofilm assez faible tandis que d'autres ont réussi à former des biofilms robustes (Frank et Patel, 2007) (**Figure 21**).

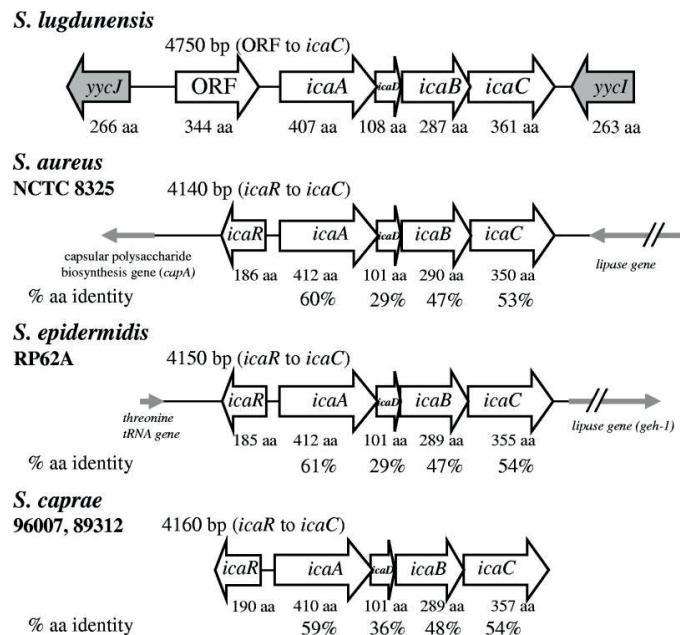


**Figure 22 : Évaluation de la MEC du biofilm de *S. lugdunensis* et de *S. epidermidis* à l'aide de la microscopie confocale à balayage laser.**

A et B : Visualisation microscopique de la présence ou de l'absence de PIA/PNAG dans la MEC du biofilm de *S. epidermidis* RP62A (A) ou *S. lugdunensis* IDRL-2640 (B). Le PIA/PNAG est coloré en vert et les cellules en rouge.

C et D : Détection des protéines extracellulaires dans les biofilms de *S. epidermidis* RP62A (C) et *S. lugdunensis* IDRL-5258 (D). Les protéines sont colorées en rouge et les bactéries en vert. Les zones jaunes indiquent la colocalisation des protéines et des cellules.

D'après Frank et Patel, 2007.

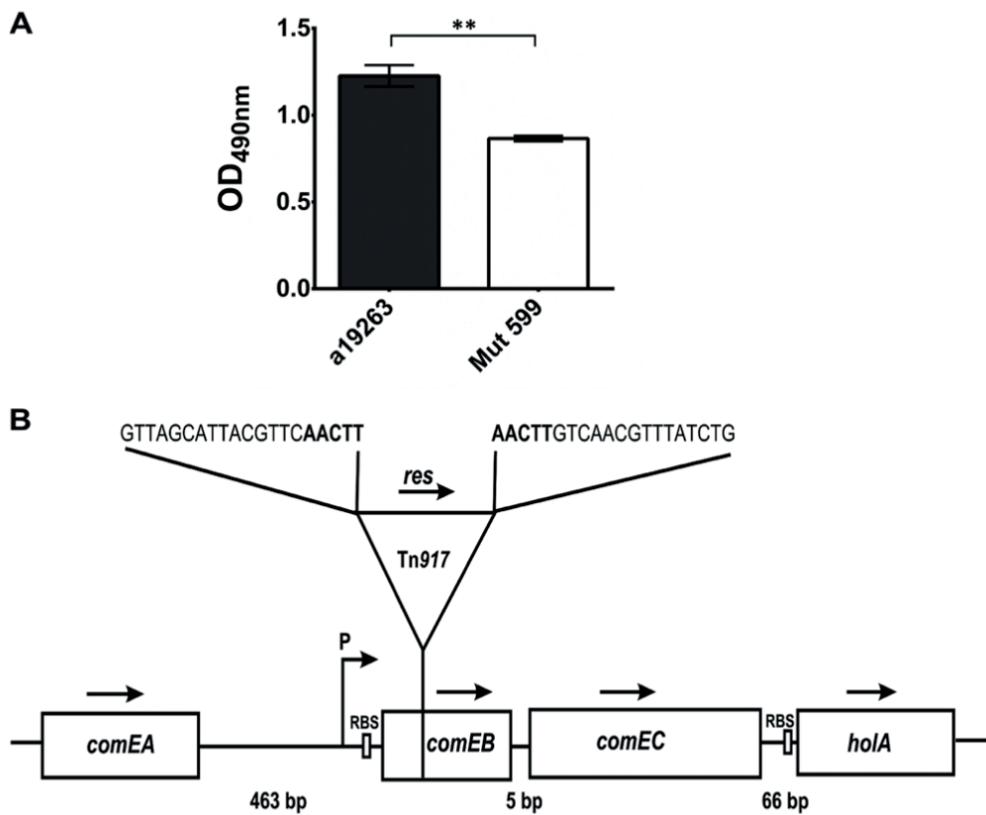


**Figure 23 : Organisation génomique du locus *icaADBC* de *S. lugdunensis* en comparaison avec celui de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. caprae*.**

Le pourcentage d'identité d'acides aminés des gènes de *S. lugdunensis* avec chaque homologue indiqué sous les flèches a été déterminé avec ClustalW. Les barres obliques sur les gènes codant une lipase indiquent qu'ils ne sont pas dessinés à la même échelle que le reste de la figure.

D'après Frank et Patel, 2007.

La composition de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis* a également été étudiée. Les résultats de plusieurs études ont révélé de très faibles quantités de PIA/PNAG voire inexistantes dans le biofilm, suggérant que le PIA/PNAG n'est pas le composant majeur du biofilm de *S. lugdunensis* (Kogan *et al.*, 2006 ; Sadovskaya *et al.*, 2006 ; Frank et Patel, 2007) (Figure 22). En revanche, *S. epidermidis* sollicite très fréquemment la production du PIA/PNAG pour former son biofilm, avec parfois une contribution protéique supplémentaire (Rohde *et al.*, 2007). Chez *S. aureus*, le PIA et les protéines agissent en coopération dans la formation de biofilm, même si elle semble être le plus souvent dépendante des protéines (Rohde *et al.*, 2007 ; Loughran *et al.*, 2014). Il semblerait que le biofilm de *S. lugdunensis* soit principalement composé de protéines (Kogan *et al.*, 2006 ; Sadovskaya *et al.*, 2006 ; Frank et Patel, 2007) (Figure 22), par conséquent il ressemblerait plus à celui formé par *S. aureus* que celui formé par *S. epidermidis*. Les gènes *icaADBC* impliqués dans la production du PIA/PNAG, ont été identifiés dans la collection des 15 isolats cliniques de *S. lugdunensis* avec des degrés élevés de similitude (de 29 % à 61 %) avec les opérons *icaADBC* de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. caprae*. Cependant le gène *icaR* n'a pas été détecté chez *S. lugdunensis* (Frank et Patel, 2007) (Figure 23). Ces résultats indiquent que le PIA/PNAG produit par l'opéron *icaADBC* est un mécanisme couramment utilisé dans la formation de biofilm chez les staphylocoques à l'exception de *S. lugdunensis* malgré la présence du locus chez cette bactérie. Une caractérisation plus fine des composants de la matrice du biofilm de *S. lugdunensis* a été rapportée. L'analyse chromatographique et l'analyse par résonnance magnétique nucléaire ont révélé la forte présence d'acides téichoïques, de protéines et l'absence de PIA/PNAG, ce qui suggère que la formation de biofilm de *S. lugdunensis* est médiée principalement par des facteurs protéiques plutôt que par le PIA/PNAG (Kogan *et al.*, 2006 ; Sadovskaya *et al.*, 2006). Dans le but d'appuyer cette hypothèse, la matrice du biofilm de 22 isolats cliniques de *S. lugdunensis* a été caractérisée très récemment par des méthodes fluorimétriques, et a permis d'identifier des exopolysaccharides, des protéines et de l'ADNe comme composants de la matrice (Ravaioli *et al.*, 2020). Toutes ces découvertes confirment que les protéines extracellulaires et l'ADNe jouent un rôle important dans l'intégrité structurelle du biofilm de *S. lugdunensis* (Ravaioli *et al.*, 2020). De plus, une étude a indiqué que la production de PIA/PNAG et la présence du locus *ica* ne semblent pas être corrélées entre les isolats cliniques de *S. lugdunensis* et d'autres espèces de CoNS, telles que *S. capitis*, *S. hominis* et *S. warneri* (Chokr *et al.*, 2006).



**Figure 24 : Implication du gène *comEB* dans la formation de biofilm chez *S. lugdunensis*.**

A : Analyse quantitative des biofilms de 24 h produits par le mutant Tn 917 Mut599 et son type sauvage. Les valeurs de DO 490 nm sont les moyennes de trois expériences indépendantes. \*\*,  $p < 0,01$ .

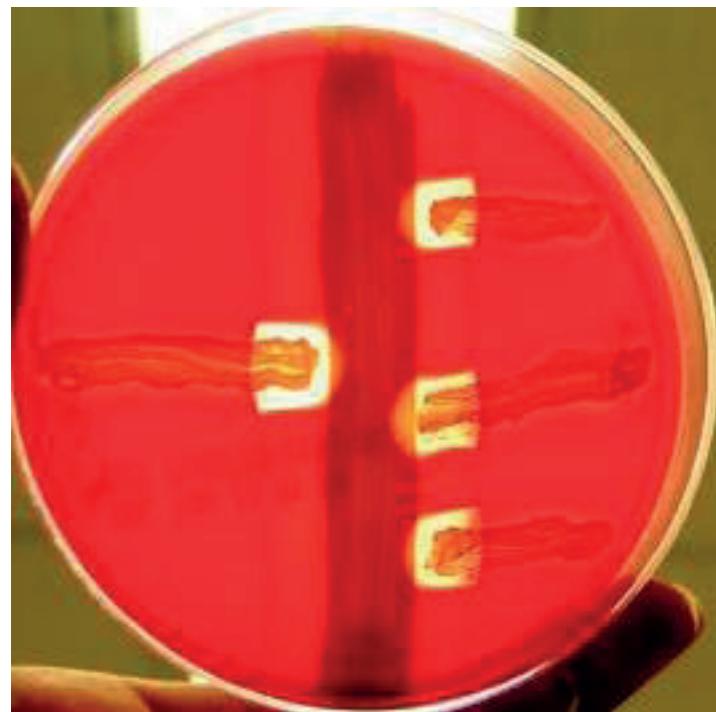
B : Le site d'insertion de Tn 917 dans le mutant Mut599 est situé à 64 pb en aval du codon d'initiation du gène *comEB* qui fait partie d'un opéron putatif contenant les gènes *comEB*, *comEC* et *holA*. Les flèches marquent le sens de la transcription. Les gènes *comEB*, *comEC* et *holA* sont probablement transcrits à partir du promoteur commun en amont de *comEB*. P, promoteur putatif; RBS, site de liaison ribosomique; *res*, gène de la résolvase. Les séquences nucléotidiques correspondent aux régions flanquant le transposon, les nucléotides en gras représentant la duplication caractéristique de 5 pb.

D'après Rajendran *et al.*, 2015.

La capacité à former un biofilm chez *S. lugdunensis* semble varier en fonction des souches et de l'origine de l'infection. En effet, une étude Grecque a évalué la formation de biofilm d'une collection de 38 isolats cliniques de *S. lugdunensis* dont 22 étaient issus d'infections cutanées, 9 d'infections profondes et 7 d'infections sur prothèse (Giormezis *et al.*, 2015). Seulement 36,8 % de ces souches ont produit un biofilm bien que 68,4 % possédaient le locus *ica*, 94,7 % avaient le gène *atlL* de l'autolysine et 81,6 % portaient le gène *vwb1* codant la protéine liant le vWF (Giormezis *et al.*, 2015). Les souches de *S. lugdunensis* issues d'infections de prothèse étaient les plus fréquemment retrouvées dans la formation de biofilm (57,1 %) contrairement aux souches des deux autres types infectieux dont le pourcentage de fréquence est de 36,4 % pour les souches d'infections cutanées et 22,2 % pour les souches d'infections profondes (Giormezis *et al.*, 2015). Une seconde étude a montré que, parmi 28 souches issues d'infections osseuses et articulaires, 71,4 % ont commencé à former un biofilm au bout de 2 h et qu'au bout de 6 h le biofilm avait atteint son maximum pour 89,3 % de ces souches (Argemi *et al.*, 2017d).

Chez *S. lugdunensis*, la formation de biofilm peut être influencée par la présence de certains gènes, notamment des facteurs de colonisation et de virulence. Le rôle de l'autolysine *AtlL* de *S. lugdunensis* a été étudié et il s'avère que le mutant déléte pour le gène *atlL* a montré une capacité réduite pour la formation de biofilm, qui a été restaurée chez le mutant complémenté (Hussain *et al.*, 2015). Par ailleurs, une mutagenèse par transposon (Tn917) chez *S. lugdunensis* a été effectuée et a révélé qu'un seul mutant était incapable de produire du biofilm. La mutation était située dans le gène *comEB* impliqué dans la compétence bactérienne (Rajendran *et al.*, 2015) (**Figure 24**). De plus, des quantités réduites en ADN ont été mesurées chez ce mutant indiquant que le gène *comEB* stimule un mécanisme de libération d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) (Rajendran *et al.*, 2015).

Enfin, la formation de biofilm peut entraîner une incapacité à éradiquer les infections en raison de la nature des biofilms qui protège les bactéries des antibiotiques (Diekema *et al.*, 2001). Étant donné que *S. lugdunensis* est connu pour coloniser et former des biofilms sur des dispositifs médicaux (Frank et Patel, 2007), la capacité des cellules de *S. lugdunensis* contenues dans le biofilm à répondre à la présence d'une variété d'agents antimicrobiens a été évaluée (Frank *et al.*, 2007). Un total de 10 molécules antistaphylococciques a été testé sur 15 isolats de *S. lugdunensis* prélevés chez des patients atteints d'endocardites, d'infections de dispositifs médicaux et d'infections de la peau et des tissus mous (Frank *et al.*, 2007). Il a été mis en évidence que les biofilms de ces isolats étaient résistants à des concentrations élevées de la majorité des composés testés. Toutefois la moxifloxacine a été capable de tuer 73% des isolats de *S. lugdunensis* présents dans des biofilms (Frank *et al.*, 2007).



**Figure 25 : L'activité hémolytique synergique de *S. lugdunensis* évaluée par Camp-test.**

L'hémolysine de type  $\beta$  de *S. lugdunensis* agit en synergie avec l'hémolysine de type  $\delta$  de *S. aureus* pour produire une zone d'hémolyse complète sur les globules rouges de mouton. Les souches de *S. lugdunensis* IDRL-5258 (strié à gauche), *S. lugdunensis* IDRL-2414 (3 stries à droite) et *S. aureus* RN4220 (strié verticale) ont été utilisées.

D'après Frank *et al.*, 2008.

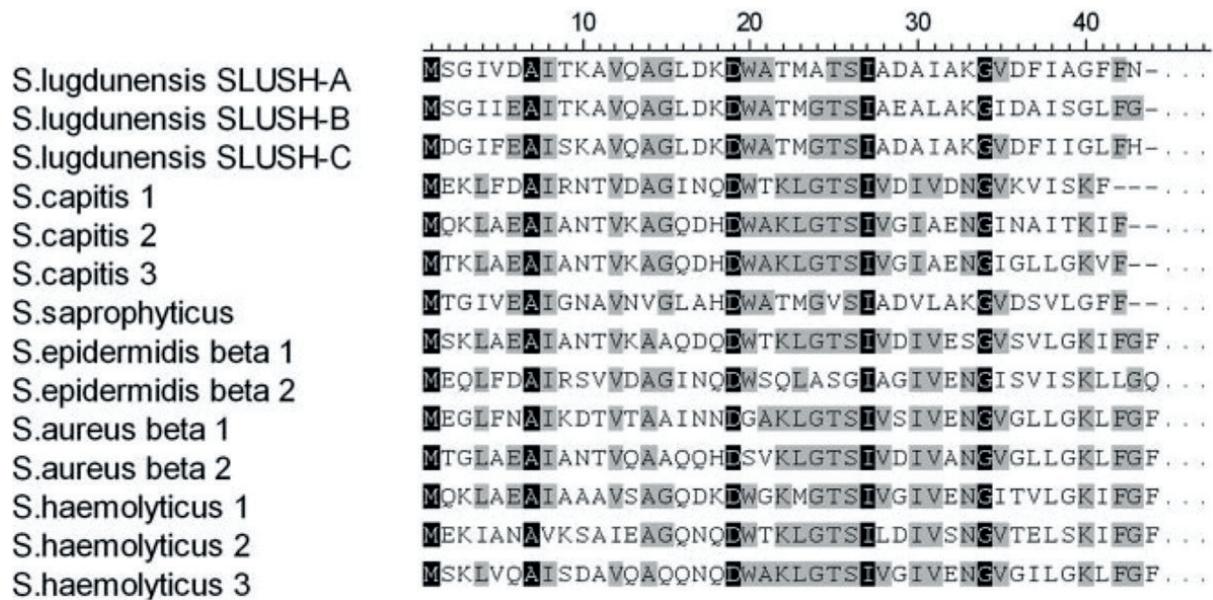
À l'inverse, il a été observé que la nafcilline augmentait la formation de biofilm de *S. lugdunensis*. Il semblerait donc que l'utilisation de cette fluoroquinolone comme traitement contre les infections impliquant la formation de biofilm à *S. lugdunensis* serait prometteuse (Frank *et al.*, 2007).

La capacité de *S. lugdunensis* à former un biofilm peut être influencée par la présence de différents gènes, notamment les gènes *atlL* (Hussain *et al.*, 2015) et *comEB* (Rajendran *et al.*, 2015). De plus, il a également été montré que le locus *isd* (iron-regulated surface determinant), impliqué dans le métabolisme et la capture du fer, joue un rôle dans la formation de biofilm en particulier *via* la protéine *IsdC* chez *S. lugdunensis* (Missineo *et al.*, 2014 ; Aubourg *et al.*, 2020 ; Aubourg *et al.*, 2021). Ce locus sera traité plus en détail dans la partie consacrée au métabolisme du fer chez *S. lugdunensis* (cf paragraphe 3).

#### 2.1.2. Les hémolysines

Comparé à *S. aureus*, la plupart des CoNS présentent une faible agressivité due à l'absence de production de toxines. *S. aureus* possède une forte activité hémolytique lui permettant d'endommager les membranes cellulaires de l'hôte et conduisant à la lyse cellulaire (Becker *et al.*, 2014). Les études réalisées dans le but d'identifier les toxines de *S. lugdunensis*, similaires à celles retrouvées chez *S. aureus* telles que les entérotoxines (de A à E), l'exfoliatine A ou encore la toxine 1 du syndrome de choc toxique, n'ont pas été fructueuses (Fleurette *et al.*, 1989). À noter toutefois qu'un cas de syndrome de choc toxique a été rapporté (Pareja *et al.*, 1998).

En 1990, une étude a montré que 95 % des souches de *S. lugdunensis* présentaient une zone d'hémolyse complète à proximité des stries d'une souche staphylococcique δ-hémolytique sur gélose au sang de mouton (Hébert, 1990) (**Figure 25**). Des expériences d'hybridation ADN-ADN ont ensuite été effectuées, mais les sondes correspondant aux hémolysines de *S. aureus* ne se sont pas hybridées à l'ADN de *S. lugdunensis* et aucune activité hémolytique liée aux α-, β-, et γ-hémolysines n'a été détectée chez *S. lugdunensis* (Vandenesch *et al.*, 1991). Cependant, une hybridation a été mise en évidence avec la sonde de la δ-hémolysine chez 28 isolats cliniques de *S. lugdunensis* parmi les 30 testés, suggérant alors qu'une toxine de type δ, homologue à celle de *S. aureus* codée par le gène *hld*, est produite par *S. lugdunensis* (Vandenesch *et al.*, 1991). En effet, un phénotype hémolytique synergique ressemblant à l'activité de la δ-hémolysine de *S. aureus* a été observée chez 73 % des souches de *S. lugdunensis* sur gélose au sang de lapin (Vandenesch *et al.*, 1991).



**Figure 26 : Similitudes des peptides Slush de *S. lugdunensis* par alignement des séquences en acides aminés avec des peptides PSM de type  $\beta$  staphylococciques.**

Les acides aminés partiellement et complètement conservés sont encadrés respectivement en gris et en noir. Les protéines suivantes ont été comparées : SlushA de *S. lugdunensis*, SlushB de *S. lugdunensis*, SlushC de *S. lugdunensis*, peptide 1 de *S. capitis*, peptide 2 de *S. capitis*, peptide 3 de *S. capitis*, peptide de *S. saprophyticus*, PSM $\beta$ 1 de *S. epidermidis*, PSM $\beta$ 2 de *S. epidermidis*, PSM $\beta$ 1 de *S. aureus*, PSM $\beta$ 2 de *S. aureus*, peptide 1 de *S. haemolyticus*, peptide 2 de *S. haemolyticus* et le peptide 3 de *S. haemolyticus*.

D'après Rautenberg *et al.*, 2011.

Une analyse par Southern-blot et un séquençage ont révélé l'absence d'un potentiel gène homologue au gène *hld* de *S. aureus* dans le génome de *S. lugdunensis* (Vandenesch *et al.*, 1993b). À la suite de cette constatation, une étude a permis de mettre en évidence que l'activité hémolytique observée chez *S. lugdunensis* est due à la présence d'un opéron *slush* (*S. lugdunensis synergetic hemolysin*) (Donvito *et al.*, 1997a). Ce locus contient 3 gènes, *slushA*, *slushB* et *slushC*, codant des peptides de 43 acides aminés très similaires ayant une activité similaire à la δ-toxine (Donvito *et al.*, 1997a). En utilisant la méthode d'hybridation par Southern-blot, la fréquence du locus *slush* a été évaluée chez 14 souches de *S. lugdunensis*. Ce locus a été détecté pour 100 % des souches indiquant ainsi la conservation génétique de l'opéron *slush* chez cette espèce (Donvito *et al.*, 1997b). Ce locus a également été retrouvé chez *S. haemolyticus*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, *S. caprae* et *S. xylosus*, mais pas chez *S. aureus* et 11 autres espèces de CoNS (Donvito *et al.*, 1997b). Ensemble, ces données ont permis d'affirmer que l'activité hémolytique synergique de *S. lugdunensis* résulte de la production de 3 peptides codés par l'opéron *slush*, distinct du gène *hld* (Donvito *et al.*, 1997b).

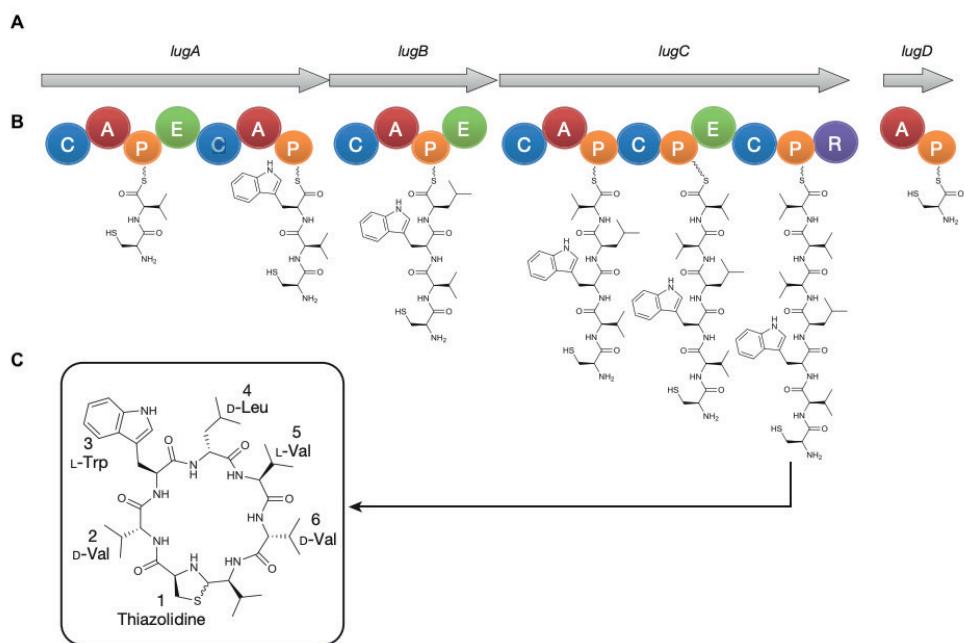
En comparant les séquences en acides aminés des peptides SlushA, SlushB et SlushC de *S. lugdunensis* à celles des PSM de *S. aureus* et *S. epidermidis*, des homologies ont été observées allant de 35,9 % à 45,2 % (Rautenberg *et al.*, 2011) (**Figure 26**). Les 3 peptides Slush de *S. lugdunensis* ont des longueurs (de 43 à 44 acides aminés), des charges anioniques (de -1 à -3) et des propriétés amphiphatiques et hélicoïdales similaires aux PSM de type β de *S. aureus* et *S. epidermidis*, ce qui suggère qu'ils appartiennent à la famille des β-PSM (Rautenberg *et al.*, 2011). Par ailleurs, les peptides Slush ont montré une activité chimiotactique pour les neutrophiles humains. Ils attirent et stimulent les leucocytes humains en se fixant au récepteur FPR2, décrit pour être un récepteur général des toxines peptidiques de type PSM et situé à la surface des monocytes, des macrophages, des neutrophiles, des cellules dendritiques immatures et de certains autres types de cellules (Rautenberg *et al.*, 2011). Le récepteur FPR2 peut interagir avec de nombreuses espèces staphylococciques, comme *S. lugdunensis* et *S. aureus*, et induire des réponses pro-inflammatoires en corrélation avec la capacité des souches à libérer des peptides appartenant à la famille des PSM et à provoquer des infections invasives (Rautenberg *et al.*, 2011). La production de peptides de type PSM joue un rôle clé dans la virulence staphylococcique en provoquant une lyse cellulaire, stimulant les réponses inflammatoires et contribuant au développement du biofilm (Cheung *et al.*, 2014).



Deux autres gènes ont été identifiés comme des hémolysines potentielles chez *S. lugdunensis* mais aucune étude fonctionnelle n'a encore été réalisée. Le gène homologue à *hlb*, qui code une  $\beta$ -hémolysine correspondant à la sphingomyélinase chez *S. aureus* (protéine capable de lyser la sphingomyéline de la membrane des érythrocytes) est présent dans le génome de *S. lugdunensis* N920143 (Heilbronner *et al.*, 2011 ; Ramarao et Sanchis, 2013), ainsi que le gène codant une hémolysine III homologue à celle trouvée chez *Bacillus cereus* (Heilbronner *et al.*, 2011 ; Ramarao et Sanchis, 2013). La prévalence de ces deux gènes a été évaluée parmi 58 souches de *S. lugdunensis* : le gène de la  $\beta$ -hémolysine et le gène de l'hémolysine III ont été trouvés dans 97 % et 100 % des souches, respectivement (Szabados *et al.*, 2011). Par ailleurs, la capacité toxinogène des CoNS a été étudiée par la recherche des gènes homologues à ceux codant les entérotoxines E, G, H et I de *S. aureus*. Tous les isolats cliniques de *S. lugdunensis* ( $n = 3$ ) ont présenté un résultat positif pour les gènes des entérotoxines G et I (Vasconcelos *et al.*, 2011). Les entérotoxines de *S. aureus* sont un groupe de superantigènes qui provoquent une intoxication alimentaire staphylococcique, mais le rôle exact de ces différentes toxines dans la pathogénèse n'est pas très clair. Cependant cette étude souligne le potentiel pathogène de *S. lugdunensis* et met en évidence la nécessité de poursuivre les études concernant la production des toxines par les CoNS (Vasconcelos *et al.*, 2011).

### 2.1.3. La lugdulysine

Les infections de la peau et des tissus mous causées par *S. lugdunensis* suggèrent que cette espèce est capable de provoquer une réponse inflammatoire non appropriée ou déclenchée par le biais de la production d'hémolysines et de toxines cytolytiques (Rautenberg *et al.*, 2011). *S. lugdunensis* est également connu pour être responsable d'infections osseuses et articulaires qui peuvent être facilitées par la production d'une métalloprotéase telle que l'auréolysine décrite chez *S. aureus* (Cassat *et al.*, 2013). En effet, l'auréolysine est capable de dégrader les peptides ostéolytiques ce qui déclenche la mort des cellules ostéoblastiques et la destruction osseuse (Cassat *et al.*, 2013). Une telle activité protéolytique médiaée par une protéase appelée lugdulysine a été identifiée chez *S. lugdunensis* (Argemi *et al.*, 2017c). La lugdulysine est produite par 50 souches de *S. lugdunensis*, sur 81 souches testées, et est fortement associée à des infections osseuses, articulaires et sur prothèses (Argemi *et al.*, 2017c). Cette protéase est codée par un gène qui a été nommé *shpl* en raison des similitudes qui ont été trouvées avec le gène de *S. hyicus* codant une hyicolysine (Argemi *et al.*, 2017c). La lugdulysine ressemble en effet davantage à l'hyicolysine (62 % d'homologie de séquence) qu'à l'auréolysine. L'hyicolysine est une métalloprotéase impliquée dans la virulence de *S. hyicus* responsable de nécrose et de dermatite exsudative dans le monde animal. En pathologie humaine, les métalloprotéases sont connues pour leur capacité à modifier



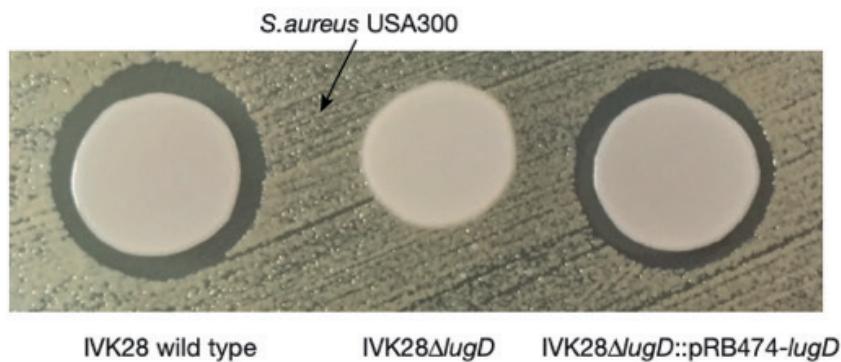
**Figure 27 : La lugdunine de *S. lugdunensis*.**

A : Schéma de l'opéron *lug* qui contient les gènes *lugABCD*.

B : Organisation modulaire des produits génétiques de l'opéron *lug* et la voie de biosynthèse de la lugdunine proposée. Domaines fonctionnels : A, adénylation ; P, protéine porteuse peptidique ; C, condensation ; E, épimérisation ; R, réductase. La biosynthèse séquentielle de la lugdunine commence vraisemblablement au module d'initiation caractéristique de LugD et se poursuit avec LugA-C. Le domaine réductase C-terminal de LugC catalyse la formation d'aldéhydes au niveau du thioester de la valine terminale et permet la fermeture ultérieure du cycle de la thiazolidine, conduisant au cyclopeptide.

C : Structure chimique de la lugdunine. La cyclisation des réactifs aldéhyde C-terminal et N-terminal de la cystéine est supposée se produire *via* le thiohémiacétal jusqu'à la thiazolidine.

D'après Zipperer *et al.*, 2016.



**Figure 28 : Test de bioactivité de la lugdunine avec *S. lugdunensis* IVK28 sauvage, le mutant  $\Delta$ lugD et le mutant complémenté contre *S. aureus* USA300.**

L'activité antimicrobienne de la lugdunine vis-à-vis de *S. aureus* est observée par la présence d'une zone d'inhibition de croissance de *S. aureus*.

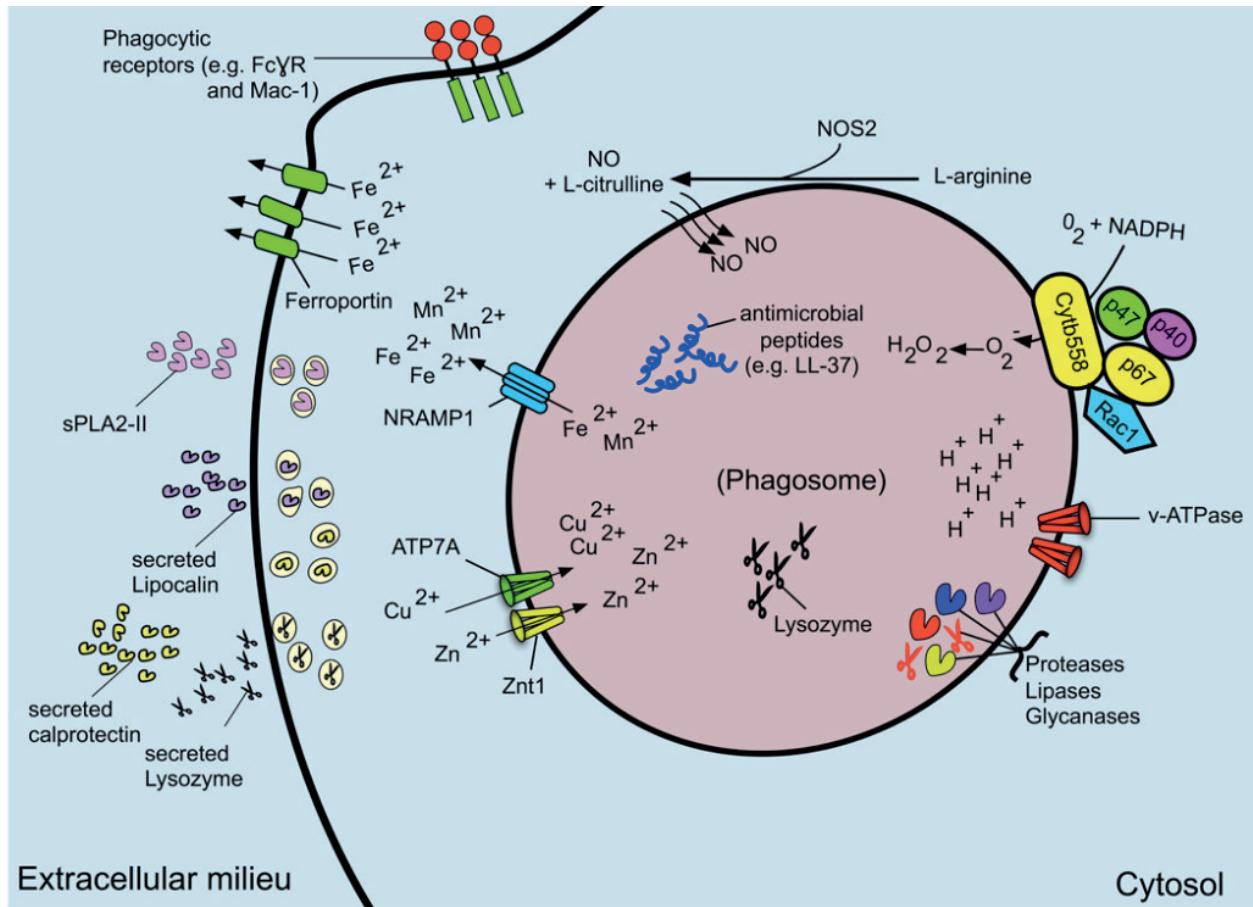
D'après Zipperer *et al.*, 2016.

la MEC, et sont cruciales pour l'invasion tumorale et le remodelage osseux. C'est pourquoi, la lugdulysine doit être considérée comme un facteur de virulence chez *S. lugdunensis*. Cependant, des études supplémentaires, en utilisant des modèles animaux, sont nécessaires afin de connaître ses véritables effets biologiques (Argemi *et al.*, 2017c).

#### 2.1.4. La lugdunine

*S. lugdunensis* est une bactérie associée à la flore cutanée de l'Homme qui est considérée comme une niche particulièrement pauvre en nutriments, suggérant que les bactéries colonisatrices, comme *S. lugdunensis*, sont en compétition et doivent donc mettre en place des stratégies pour survivre (Zipperer *et al.*, 2016).

En étudiant l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* par le biais d'une collection de 187 isolats nasaux de Staphylocoques, il a été montré que seules les souches de *S. lugdunensis* étaient capables d'inhiber la croissance de *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016). L'analyse du surnageant de culture a permis d'identifier une substance antibactérienne produite uniquement par *S. lugdunensis* dans des conditions de limitation en fer. Cette molécule nommée lugdunine est produite grâce à un opéron *lug* de 4 gènes, *lugA*, *lugB*, *lugC* et *lugD*, dont les produits sont requis pour la synthèse et le transport d'un peptide synthétisé de manière non-ribosomique (Zipperer *et al.*, 2016) (**Figure 27**). Cet opéron serait sous le contrôle du régulateur transcriptionnel LugR appartenant à la famille TetR. En raison de la faible teneur en GC% de l'opéron (26,9 %) comparée à celle du génome de *S. lugdunensis* (33,8 %), il a été suggéré que cet opéron *lug* a été acquis par transfert horizontal *via* une autre espèce bactérienne (Zipperer *et al.*, 2016). Dans le but de confirmer que la lugdunine est à l'origine de l'activité antimicrobienne observée contre *S. aureus*, le mutant déléte pour le gène *lugD* a été construit et a montré une absence d'activité antibactérienne, qui est restaurée par complémentation (Zipperer *et al.*, 2016) (**Figure 28**). A l'aide de la spectrométrie de masse à haute résolution, la lugdunine a été caractérisée comme un peptide cyclique comprenant un hétérocycle thiazoline inhabituel et 5 acides aminés (Zipperer *et al.*, 2016). L'étude de son spectre d'activité a mis en évidence une activité bactéricide contre les principaux agents pathogènes, notamment envers les bactéries à Gram positif. De plus, la lugdunine est efficace dans les modèles animaux et ne provoque pas de développement d'une résistance chez *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016). Le statut de *S. aureus* comme commensal nasal est connu mais peu étudié. 187 écouvillons nasaux de patients hospitalisés ont été examinés, montrant un taux de portage de *S. aureus* et *S. lugdunensis* de 32,1 % et 9,1 %, respectivement (Zipperer *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que la colonisation par *S. aureus* chez les individus également « positifs » à *S. lugdunensis* n'était que de 5,9 % alors qu'elle était de 34,7 % chez les individus « négatifs » à *S. lugdunensis* (Zipperer *et al.*, 2016). Ces résultats expliquent



**Figure 29 : Facteurs d'échappement immunitaire de *S. aureus* dans un macrophage.**

Plusieurs facteurs (NADPH oxydase, NRAMP-1 et protéases de type cathepsine) agissent dans la lumière du phagosome tandis que d'autres, tels que la lipocaline, le lysozyme sécrété et la sPLA2-II, agissent dans le milieu extracellulaire. Le processus de phagocytose n'est pas représenté ici. Abréviations :  $\text{Fe}^{2+}$ , fer ferreux; NRAMP-1, protéine membranaire naturelle associée à la résistance 1; NOS2, oxyde nitrique synthase 2; NO, monoxyde d'azote;  $\text{O}_2^-$ , superoxyde;  $\text{H}^+$ , protons; v-ATPase, ATPase vacuolaire;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxyde d'hydrogène;  $\text{Zn}^{2+}$ , zinc;  $\text{Cu}^{2+}$ , cuivre; Znt1, transporteur de zinc; ATP7A, transporteur du cuivre.

D'après Flannagan *et al.*, 2015.

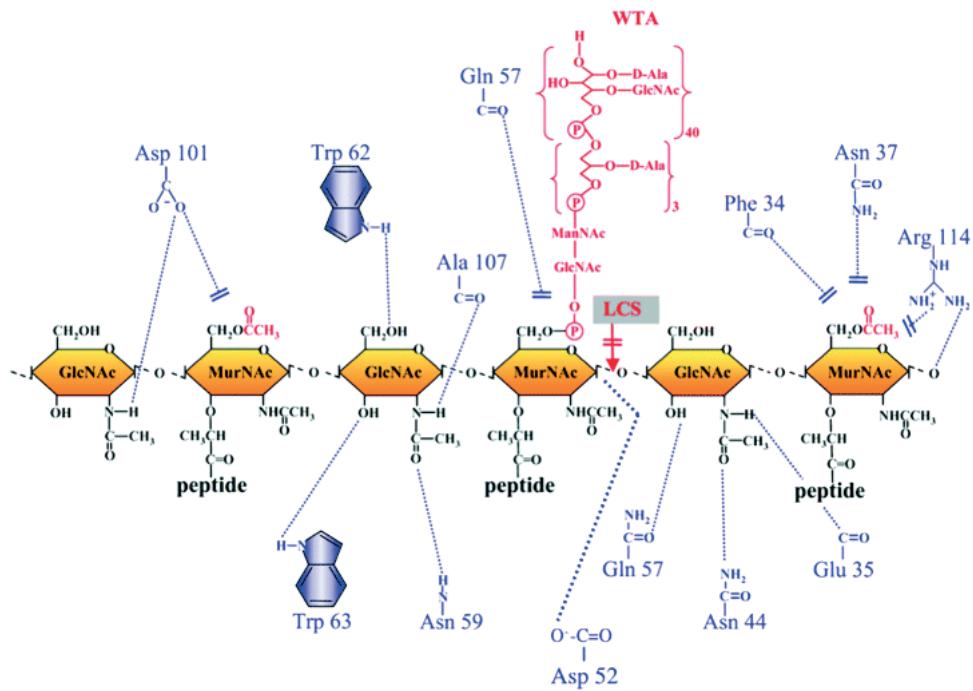
en partie les différences de niches de portage privilégiées entre *S. aureus* et *S. lugdunensis*. Cette découverte apporte une preuve du rôle crucial de *S. lugdunensis* dans la colonisation et la lugdunine est une molécule prometteuse en tant que médicament pour inhiber la croissance de *S. aureus* dans les narines ou d'autres niches (Zipperer *et al.*, 2016). Elle pourrait être utilisée dans la prévention de la colonisation et des infections invasives chez des patients subissant une chirurgie, une immunosuppression ou encore une hémodialyse (Zipperer *et al.*, 2016 ; Bitschar *et al.*, 2019).

#### 2.1.5. Échappement au système immunitaire

La capacité d'échapper aux réponses immunitaires innées est essentielle pour le succès d'un agent pathogène à provoquer des infections invasives (Bera *et al.*, 2005 ; Bera *et al.*, 2006). *S. lugdunensis* est connu pour être responsable d'infections invasives graves similaires à celles causées par *S. aureus* (Frank *et al.*, 2008). *S. aureus* présente un répertoire considérable de facteurs lui permettant de contourner certains aspects de l'immunité de l'hôte. On peut citer des facteurs impliqués dans la résistance au lysozyme, qui favorisent la survie bactérienne au sein du neutrophile, qui provoquent la lyse des neutrophiles, qui protègent de la phagocytose, qui interfèrent avec l'opsonisation, qui sont impliqués dans l'acidification du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'activation de protéases lysosomales (Flannagan *et al.*, 2015 ; Buchan *et al.*, 2019 ; de Vor *et al.*, 2020) (**Figure 29**). Malgré le manque de facteurs d'évasion immunitaire chez *S. lugdunensis* comparé à *S. aureus*, quelques-uns ont été identifiés lui permettant de survivre *in vivo*.

- **La résistance au lysozyme**

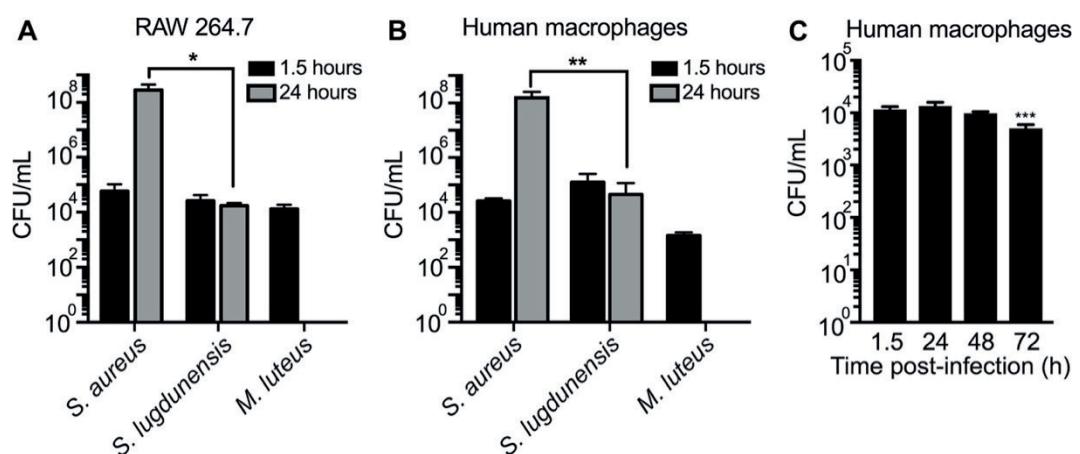
Les staphylocoques pathogènes font partie des rares genres bactériens qui présentent une résistance élevée au lysozyme, ce qui est un élément favorable à la colonisation de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux (Bera *et al.*, 2005). En effet, les tissus et les fluides corporels comme le sérum, la salive, la sueur et les larmes, sont composés de nombreuses substances antimicrobiennes capables de tuer ou d'inhiber la croissance bactérienne (Bera *et al.*, 2005). Parmi ces composés, le lysozyme est l'un des plus importants et des plus répandus dans le système de défense immunitaire (Bera *et al.*, 2005). Les bactéries pathogènes ont donc développé des mécanismes pour échapper à l'action du lysozyme (Bera *et al.*, 2006). Le lysozyme est une muramidase qui a pour fonction de cliver le peptidoglycane au niveau des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques de l'acide N-acétylmuramique (NAM) et de la N-acétylglucosamine (NAG) (Blake *et al.*, 1967) et qui est principalement sécrété par les macrophages au début d'une infection (Keshav *et al.*, 1991).



**Figure 30 : Interaction entre le lysozyme et le peptidoglycane staphylocoque.**

Le groupe C6-OH de l'acide muramique est modifié par O-acétylation et sert d'ancrage pour l'acide téichoïque de la paroi (WTA). Cinq résidus d'acides aminés interagissent avec le groupe C6-OH du peptidoglycane non modifié. L'interaction avec le lysozyme est affectée par le degré élevé d'O-acétylation du peptidoglycane, conduisant ainsi à la résistance élevée observée au lysozyme. Le LCS correspond au site de clivage du lysozyme.

D'après Bera *et al.*, 2005.



**Figure 31 : Tests d'infection *in vitro* évaluant la capacité des souches de *S. lugdunensis* HKU09-01, *S. aureus* USA300 et *M. luteus* à survivre dans les macrophages murins et humains.**

Les macrophages murins RAW 264.7 (A) et humains M-CSF (B) ont été infectés.

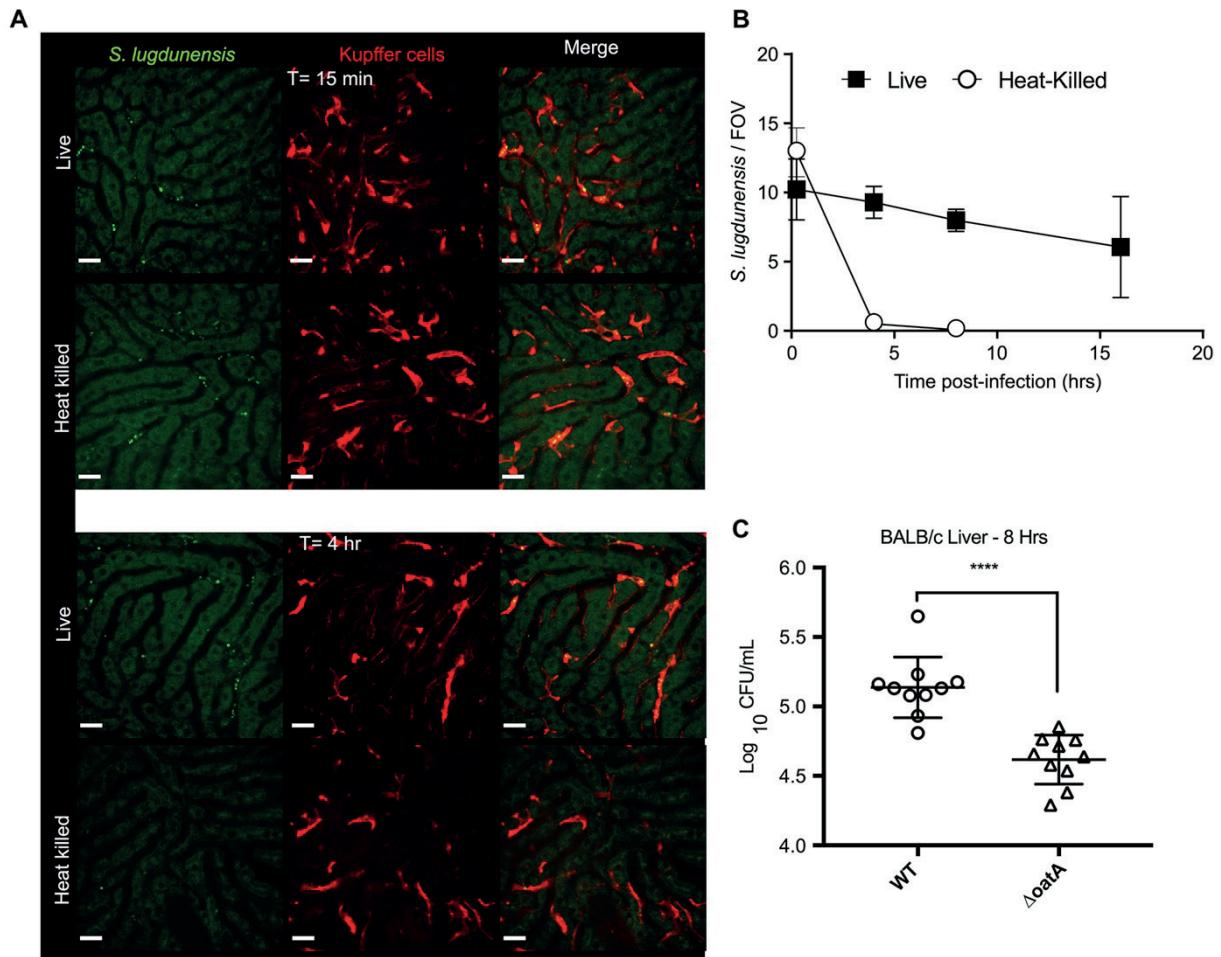
D'après Flannagan *et al.*, 2018.

*S. lugdunensis* et *S. aureus*, considérés comme des staphylocoques pathogènes, présentent une résistance à des concentrations très élevées de lysozyme (400 mg/mL) (Freney *et al.*, 1988). À l'inverse, les staphylocoques non pathogènes restent sensibles ou présentent des réactions d'hypersensibilité (Bera *et al.*, 2006). La résistance au lysozyme est médiée par la présence du gène *oatA*, codant la peptidoglycane O-acétyltransférase (OatA), chez *S. aureus*. En effet un mutant délété pour le gène *oatA* présentait une croissance affectée en présence de 0,8 mg/mL de lysozyme alors que la croissance de la souche sauvage de *S. aureus* n'était pas inhibée par cette enzyme à des concentrations supérieures à 50 mg/mL. De plus, le mutant  $\Delta$ *oatA* complémenté, a restauré le phénotype hautement résistant au lysozyme (Bera *et al.*, 2005). L'expression de l'OatA est responsable d'une O-acétylation du NAM présent dans le peptidoglycane ce qui empêche la liaison du lysozyme. Cette modification agit comme un encombrement stérique et le lysozyme n'est ainsi plus capable de cliver le peptidoglycane modifié, permettant à *S. aureus* d'échapper au système de défense inné (Bera *et al.*, 2005 ; Bera *et al.*, 2006) (**Figure 30**). Un gène homologue à *oatA* a été retrouvé dans le génome de *S. lugdunensis* et du peptidoglycane O-acétylé a été découvert dans sa paroi cellulaire. Ces résultats suggèrent que *S. lugdunensis* possède le même mécanisme de résistance au lysozyme que celui de *S. aureus* (Bera *et al.*, 2006). OatA serait donc un facteur de colonisation impliqué dans l'invasion, la persistance et l'infection par des staphylocoques pathogènes car il leur permet de coloniser la peau et les muqueuses de l'hôte riches en lysozyme (Bera *et al.*, 2006).

- **La survie dans les macrophages**

L'hydrolyse du peptidoglycane bactérien par le lysozyme est un premier mécanisme de défense immunitaire, mais il existe d'autres stratégies mises en place par l'hôte afin de détruire les agents pathogènes telles que la phagocytose par les macrophages (Flannagan *et al.*, 2015). Les macrophages sont des cellules immunitaires qui ont pour fonction de combattre l'infection car elles sont dotées de la capacité d'ingérer des bactéries par phagocytose et de les détruire (Flannagan *et al.*, 2015).

Malgré cela, certaines bactéries pathogènes comme *S. aureus* sont capables d'échapper à la destruction par les macrophages leur permettant alors de maintenir avec succès l'infection (Flannagan *et al.*, 2015). Des travaux *in vitro* et *in vivo* ont montré que *S. aureus* peut résister à la destruction dans les phagosomes des macrophages et a la capacité surprenante de se répliquer dans ces cellules (Flannagan *et al.*, 2015). L'interaction de *S. lugdunensis* avec les cellules immunitaires a été étudiée *in vitro* et *in vivo*, dans le but d'identifier sa stratégie d'évasion immunitaire et sa capacité à contourner certains aspects de l'immunité de l'hôte (Flannagan *et al.*, 2018). Des cultures de macrophages murins et humains ont été infectées par une souche de *S. lugdunensis* et le nombre de bactéries intracellulaires viables après



**Figure 32 : Tests d'infection *in vivo* évaluant la capacité de la souche sauvage et du mutant  $\Delta$ oatA de *S. lugdunensis* à survivre dans le modèle d'infection murin systémique.**

A : Images confocales qui permettent de visualiser la capture de *S. lugdunensis* GFP-positif vivant et mort (vert) par les cellules de Kupffer (rouge) à 15 min et 4 h après l'injection.

B : La présence de *S. lugdunensis* vivant et mort à l'intérieur des cellules de Kupffer a été évaluée au fil du temps. Les données ont été dérivées de trois souris pour chaque point dans le temps, avec 10 champs de vision pris de chaque souris et sont présentées comme le nombre moyen de cellules de *S. lugdunensis* GFP-positives détectées par champ de vision  $\pm$  erreur standard de la moyenne.

C : La charge bactérienne provenant de foies murins prélevés sur des souris infectées par *S. lugdunensis* de type sauvage ou du mutant déficient en *oatA* est montrée, avec \*\*\*\* indiquant que  $p < 0,0001$  et qui a été déterminée par le test t de Student.

D'après Flannagan *et al.*, 2018.

phagocytose a été mesuré. Des cellules vivantes de *S. lugdunensis* ont été récupérées à partir des macrophages après 24 h d'infection, mais le nombre n'avait pas augmenté suggérant aucune prolifération dans ces phagocytes (Flannagan *et al.*, 2018) (**Figure 31**). Des infections similaires avec *S. aureus* et *Micrococcus luteus* représentant des bactéries capables de surmonter les agressions par des macrophages ou d'être détruites respectivement, ont été réalisées. Comme attendu, des cellules viables de *S. aureus* ont été retrouvées dans les macrophages et ont réussi à se répliquer alors que les cellules de *M. luteus* ont été éradiquées, après 24 h d'infection (Flannagan *et al.*, 2018) (**Figure 31**). Ces premiers résultats *in vitro* ont permis de conclure que *S. lugdunensis* reste viable dans les macrophages pendant plusieurs heures mais sans pouvoir se répliquer, à la différence de *S. aureus* (Flannagan *et al.*, 2018).

Par ailleurs, la persistance de *S. lugdunensis* à l'intérieur des macrophages a été étudiée *in vivo* en utilisant un modèle d'infection murin systémique (Flannagan *et al.*, 2018). Des cellules de *S. lugdunensis* exprimant de la GFP (Green Fluorescent Protein) ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris, et ont révélé que les bactéries étaient visibles dans les cellules de Kupffer, présentes dans le foie jusqu'à 16 h après l'infection, ainsi qu'une absence d'augmentation de la fluorescence de la GFP indiquant que les bactéries ne se répliquaient pas (Flannagan *et al.*, 2018) (**Figure 32, A et B**). Dans ce même modèle d'infection, il avait été montré que *S. aureus* était phagocyté et restait viable dans les cellules de Kupffer jusqu'à 10 h après l'infection (Surewaard *et al.*, 2016). Ces données *in vivo* sont en accord avec les données *in vitro* précédentes qui montrent que *S. lugdunensis* est internalisé par les cellules de Kupffer et reste viable dans ces cellules après l'infection (Flannagan *et al.*, 2018).

Sachant que *S. lugdunensis* peut survivre dans les macrophages du foie, les auteurs ont voulu savoir si cette persistance pouvait être associée à la capacité de résister au lysozyme (Flannagan *et al.*, 2018). La survie *in vitro* dans les macrophages de la souche sauvage et du mutant *ΔoatA* de *S. lugdunensis* a été évaluée. Les résultats ont révélé une diminution significative du nombre de bactéries viables à l'intérieur des macrophages pour le mutant *ΔoatA* comparé à la souche sauvage après 24 h d'infection (Flannagan *et al.*, 2018). Ensuite, en utilisant le modèle d'infection murin systémique, les souris ont été infectées par la souche sauvage et le mutant *ΔoatA* de *S. lugdunensis*, puis la charge bactérienne présente dans le foie a été déterminée 8 h après l'infection (Flannagan *et al.*, 2018). En accord avec les données précédentes, le dénombrement des bactéries était plus important pour la souche sauvage par rapport au mutant *ΔoatA* de *S. lugdunensis*, suggérant que OatA est important pour la survie de *S. lugdunensis* dans les macrophages du foie (Flannagan *et al.*, 2018) (**Figure 32, C**). *S. lugdunensis* est donc capable de résister à la destruction par les macrophages du foie grâce à l'expression d'OatA qui confère une résistance au lysozyme (Flannagan *et al.*, 2018). La persistance et la survie de *S. lugdunensis* dans ces cellules représentent un système d'échappement aux défenses immunitaires de

**Tableau 11 : Dénombrement des bactéries présentes dans les tissus des animaux (végétations cardiaques, reins et rate) 48 h après injection par voie intraveineuse de *S. aureus* Sa113 de type sauvage, du mutant  $\Delta dltA$ , du mutant  $\Delta dltA$  complémenté et du mutant  $\Delta mprF$ .**

D'après Weidenmaier *et al.*, 2005.

Bacterial strain	Bacterial count (mean $\log_{10}$ CFU/g tissue $\pm$ SD [no. of animals])		
	Cardiac vegetations	Kidneys	Spleen
Wild type	8.23 $\pm$ 1.57 (10)	6.03 $\pm$ 0.64 (10)	6.05 $\pm$ 0.57 (10)
$\Delta dltA$ mutant	4.27 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup> (6)	3.69 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup> (6)	3.76 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup> (6)
Complemented $\Delta dltA$ mutant	7.11 $\pm$ 0.86 <sup>c</sup> (7)	4.90 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup> (7)	4.54 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup> (7)
$\Delta mprF$ mutant	6.36 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup> (8)	5.99 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup> (8)	5.58 $\pm$ 0.95 <sup>c</sup> (8)

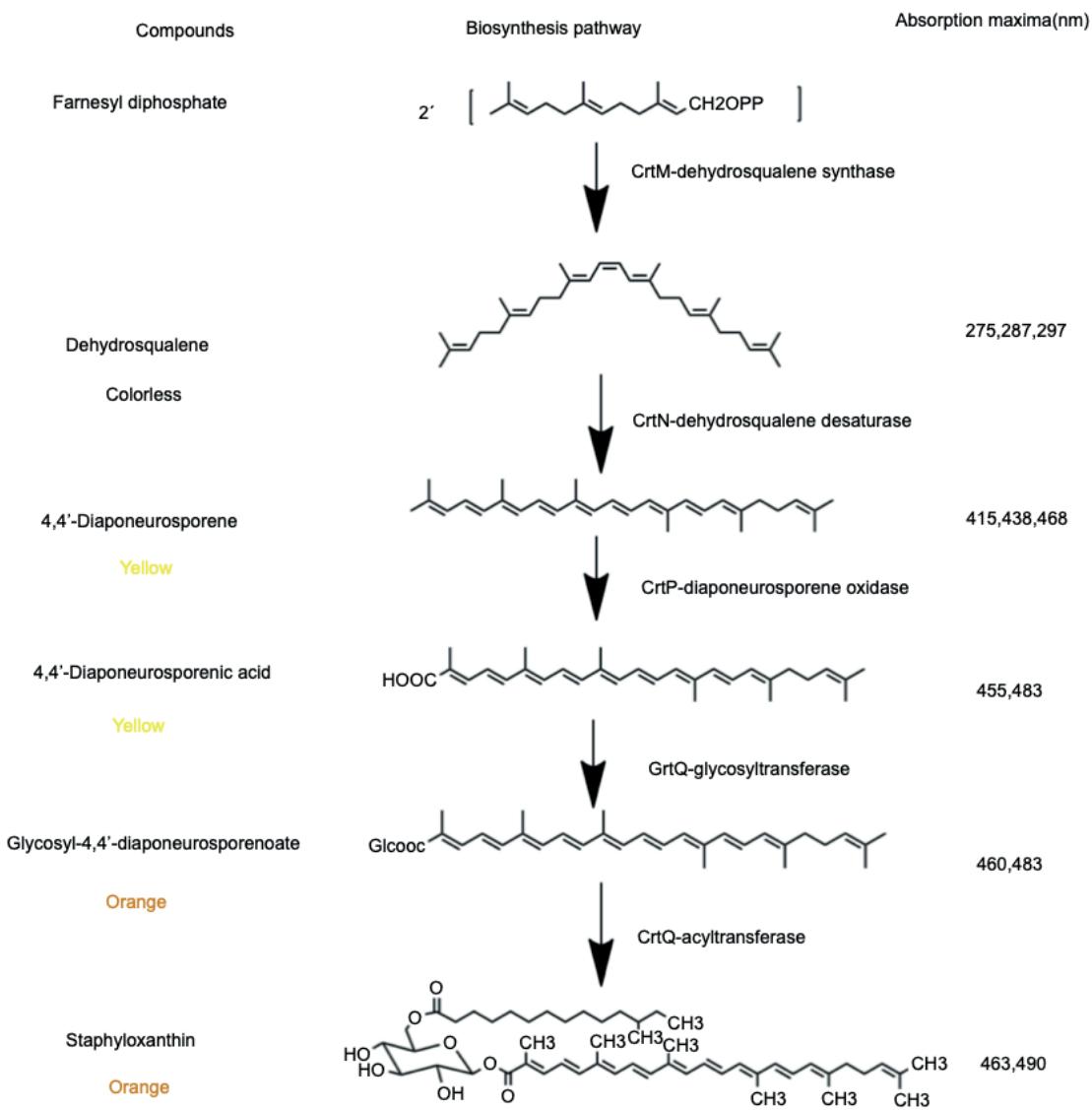
l'hôte et peuvent conduire à la constitution de réservoirs bactériens responsables par la suite d'une future infection (Flannagan *et al.*, 2018).

- **La résistance aux peptides antimicrobiens**

En exprimant un peptidoglycane acétylé par le biais de la protéine OatA, *S. lugdunensis* est résistant au lysozyme et persiste dans les macrophages. Cependant, dans son environnement, *S. lugdunensis* doit faire face à la présence de peptides antimicrobiens (Flannagan *et al.*, 2015). Il existe des stratégies de défense contre ces peptides qui ont été décrites chez *S. aureus*. En effet, *S. aureus* peut modifier les lipides membranaires ainsi que les acides téichoïques (Weidenmaier *et al.*, 2005 ; Flannagan *et al.*, 2015).

La résistance aux peptides antimicrobiens est médiée par ces modifications qui résultent de l'enzyme MprF et des produits géniques de l'opéron *dlt*. La protéine membranaire MprF, codée par le gène *mprF* est impliquée dans l'incorporation de résidus de lysine dans les lipides membranaires cytoplasmiques (Peschel *et al.*, 2001). Des travaux ont démontré que MprF était un facteur de virulence chez *S. aureus* jouant un rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens et dans l'échappement de la destruction par les neutrophiles (Peschel *et al.*, 2001). L'opéron *dlt* est composé de 4 gènes, *dltA*, *dltB*, *dltC* et *dltD*, dont les produits sont impliqués dans l'incorporation de D-alanine dans les acides téichoïques (Peschel *et al.*, 1999 ; Weidenmaier *et al.*, 2005). Une étude a montré que l'inactivation de l'opéron *dlt* chez *S. aureus* entraînait une sensibilité à de nombreux peptides antimicrobiens (Peschel *et al.*, 1999). De plus, il s'avère que les mutations des gènes *dlt* et *mprF* atténuent la virulence *in vivo* dans un modèle d'infection d'endocardite du lapin (Weidenmaier *et al.*, 2005) (**Tableau 11**). Ensemble, ces données suggèrent que les modifications catalysées par MprF et l'opéron *dlt* médient la résistance aux peptides antimicrobiens en rendant la surface bactérienne moins anionique et diminuant ainsi les interactions électrostatiques avec ces composés cationiques (Weidenmaier *et al.*, 2005).

L'analyse du génome de *S. lugdunensis* a révélé la présence du gène *mprF* et de l'opéron *dlt* qui peuvent donc être, par analogie avec *S. aureus*, considérés comme des facteurs de colonisation potentiels chez *S. lugdunensis* (Heilbronner *et al.*, 2011). Étonnamment, il n'y a actuellement aucune donnée expérimentale permettant de décrire le rôle de ces gènes chez *S. lugdunensis*.



**Figure 33 : La voie de la biosynthèse de la staphyloxanthine.**

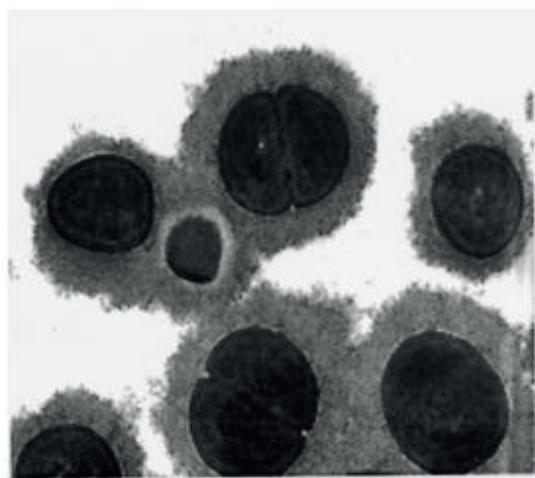
Les valeurs des spectres d'absorption sont indiquées.

D'après Xue *et al.*, 2019.

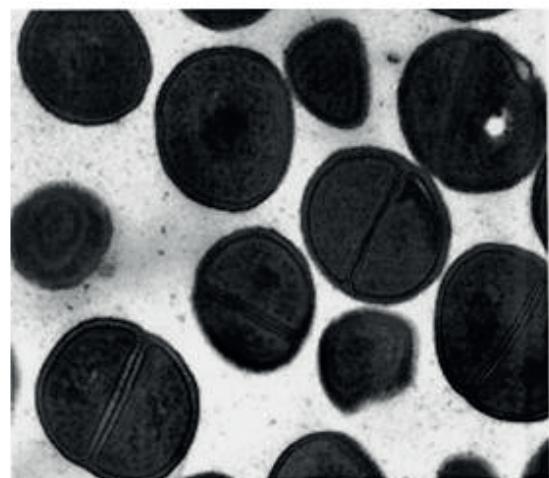
- **La dégradation des espèces réactives de l'oxygène**

Les ERO telles que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) sont formés de manière naturelle par le métabolisme de l'hôte lorsque l'oxygène est partiellement réduit et jouent un rôle crucial dans les défenses de l'organisme infecté pour induire une activité antimicrobienne optimale des neutrophiles et des macrophages (Flannagan *et al.*, 2015). Lors d'une infection, les bactéries capables de persister dans les macrophages, comme *S. lugdunensis*, doivent contrer les ERO afin de maintenir leur viabilité. L'inactivation des ERO nocifs résulte de l'activité des superoxydes dismutases (SOD) (codées par les gènes *sodA* et *sodM*) qui permettent de catalyser la dismutation de  $O_2^-$  en formant de l' $O_2$  et de l' $H_2O_2$  et de l'activité de la catalase (codée par le gène *katA*) qui est impliquée dans la dismutation de l' $H_2O_2$  en formant de l' $O_2$  et de l'eau ( $H_2O$ ) (Karavolos *et al.*, 2003 ; Flannagan *et al.*, 2015). Chez *S. aureus*, ces gènes sont connus pour être impliqués dans la résistance aux effets antimicrobiens des ERO permettant ainsi la survie de l'agent pathogène dans les neutrophiles et les macrophages (Karavolos *et al.*, 2003 ; Cosgrove *et al.*, 2007). En utilisant un modèle d'infection d'abcès de souris, une étude a montré que la virulence des mutants *sodA* et *sodM* de *S. aureus* était réduite comparée à celle de la souche parentale indiquant l'importance du système de piégeage enzymatique des ERO pour la survie bactérienne (Karavolos *et al.*, 2003). Il est important de noter que le gène *sodA* est présent chez *S. lugdunensis* (Sivadon *et al.*, 2005 ; Poyart *et al.*, 2001) et possède 90 % d'homologie avec celui de *S. aureus* (Heilbronner et Foster, 2021). De plus, le gène *katA* a également été retrouvé chez *S. lugdunensis* (Lu *et al.*, 2013 ; Aubourg *et al.*, 2020 ; Aubourg *et al.*, 2021). Ces observations suggèrent un rôle potentiel de SodA et KatA dans la résistance aux ERO chez *S. lugdunensis* pour échapper au système immunitaire de l'hôte, d'autant plus que la catalase a été décrite comme étant importante pour résister au stress oxydatif dans des conditions de limitation en fer chez *S. lugdunensis* (Aubourg *et al.*, 2020 ; Aubourg *et al.*, 2021). Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ces potentiels facteurs de colonisation et de virulence chez *S. lugdunensis*.

Pour compléter l'action de ces enzymes de détoxicification des ERO, il existe chez les staphylocoques, notamment chez *S. aureus*, un pigment caroténoïde nommé staphyloxanthine qui confère l'aspect doré des colonies bactériennes ainsi qu'une résistance face aux ERO (Liu *et al.*, 2005 ; Xue *et al.*, 2019) (**Figure 33**). Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la staphyloxanthine sont situés dans un opéron, *crtOPQM*, comprenant un promoteur sigma B dépendant en amont du gène *crtO* (Xue *et al.*, 2019). Un mutant déléte pour le gène *crtM* chez *S. aureus* a été construit et les résultats ont révélé qu'il était plus sensible à l'activité des ERO, que sa survie dans les neutrophiles était altérée et qu'il était moins pathogène dans un modèle d'abcès sous-cutané de souris (Liu *et al.*, 2005). La staphyloxanthine a donc un effet protecteur contre les ERO, qui peut s'étendre aussi aux peptides antimicrobiens,



**A**



**B**

**Figure 34 : Images de microscopie électronique à transmission de cellules de *S. aureus* de type sauvage produisant une capsule et du mutant capsulaire.**

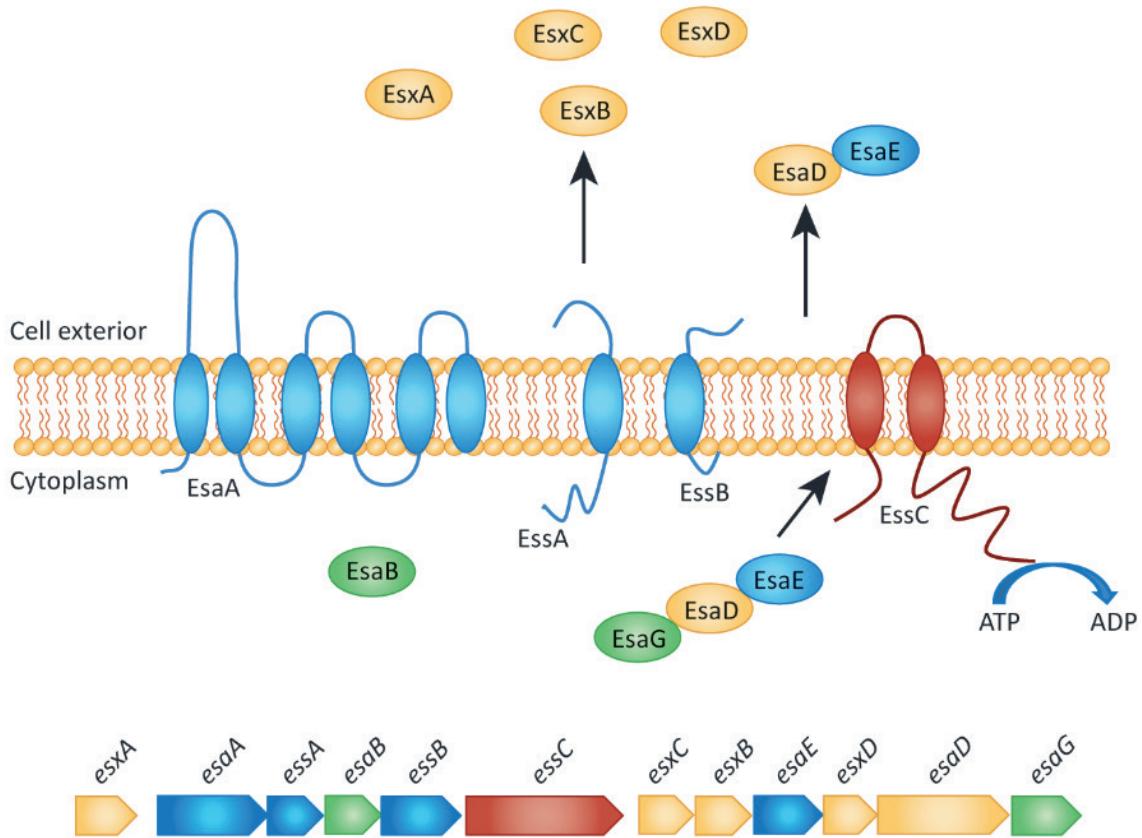
Avant la fixation, la souche de type sauvage de *S. aureus* (A) et le mutant capsulaire (B) ont été incubés avec des anticorps spécifiques de capsule de type 5 pour stabiliser et visualiser la capsule.

D'après O'Riordan et Lee, 2004.

car la production de caroténoïdes diminuerait la fluidité membranaire favorisant ainsi la résistance à ces peptides (Mishra *et al.*, 2011). La biosynthèse des caroténoïdes contribue à la capacité de *S. aureus* à se défendre contre le système immunitaire de l'hôte en lui conférant une résistance aux ERO et aux peptides antimicrobiens retrouvés dans les macrophages (Liu *et al.*, 2005 ; Mishra *et al.*, 2011). Cependant, le rôle de la staphyloxanthine, principalement étudié chez *S. aureus* dans la défense face au stress oxydatif, reste complexe. Des recherches ont montré que cette molécule protège les bactéries des ERO présents dans les neutrophiles mais dépend de la dose de ERO rencontrée ainsi que de la présence d'autres antioxydants (Beavers et Skaar, 2016). La présence des gènes *crtMN* chez *S. lugdunensis* indique que *S. lugdunensis* est capable, lui aussi, de produire certains caroténoïdes tels que la squalene désaturase et la squalene synthase, ce qui expliquerait la couleur jaunâtre des colonies. Cela pourrait lui conférer une résistance supplémentaire aux ERO (Aubourg *et al.*, 2021 résultats soumis).

- **Le rôle de l'encapsulation**

Impliqués dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte, les polysaccharides capsulaires extracellulaires jouent un rôle important, en particulier pour les bactéries qui causent des maladies invasives (O'Riordan et Lee, 2004). Chez *S. aureus*, la production de capsules a été décrite pour la première fois en 1931 (Gilbert, 1931). Par la suite, des études ont montré que de telles souches présentaient une résistance à la phagocytose et une virulence importante chez la souris (Melly *et al.*, 1974 ; O'Riordan et Lee, 2004) (**Figure 34**). Un typage des polysaccharides capsulaires a été proposé en 1985 distinguant au total 11 sérotypes différents (Sompolinsky *et al.*, 1985). Parmi l'ensemble de ces sérotypes, les plus fréquemment retrouvés chez l'Homme sont les isolats capsulaires de type 5 (25 %) et de type 8 (50 %), avec une prévalence d'infections cliniques mais aussi de sources commensales (Hochkeppel *et al.*, 1987 ; O'Riordan et Lee, 2004). Les gènes codant les polysaccharides capsulaires se trouvent dans un locus *cap* (capsular polysaccharide), dont certains gènes sont spécifiques du sérotype (O'Riordan et Lee, 2004). Chez *S. lugdunensis*, une étude a révélé la présence de glycocalyx décrit comme une protection membranaire (Lambe *et al.*, 1994). Cependant aucun travail supplémentaire sur le rôle de la capsule de *S. lugdunensis* n'a été entrepris. Néanmoins, l'analyse génétique comparative récemment accomplie chez *S. lugdunensis* a mis en évidence la présence de 16 gènes homologues à ceux codant les polysaccharides capsulaires de type 5 et 8 de *S. aureus*. Les 4 gènes *capHIJK* diffèrent entre les souches de *S. lugdunensis* alors que les 12 autres gènes apparaissaient hautement conservés (Lebeurre *et al.*, 2019). De plus, deux gènes ont également été retrouvés parmi les souches de *S. lugdunensis* et ont été identifiés comme étant le locus *pga* (polyglutamic acid capsule) présentant une homologie avec celui de *S. epidermidis* (Lebeurre *et al.*, 2019). Ce locus est connu pour faciliter la croissance et la survie chez l'hôte *via* la sécrétion de l'acide poly-γ-DL-glutamique (PGA) qui permet de protéger la



**Figure 35 : Le système de sécrétion de type VII codé par le locus *ess* chez *S. aureus*.**

Les protéines associées à la membrane (bleu), les substrats (jaune), les protéines cytoplasmiques (vert) et l'ATPase FtsK/SpoII (rouge) sont représentés.

D'après Unnikrishnan *et al.*, 2017.

bactérie de l'activité des peptides antimicrobiens et de la phagocytose par les neutrophiles (Kocianova *et al.*, 2005). Sa présence était également indispensable pour la persistance, lors d'une infection, sur dispositif médical (Kocianova *et al.*, 2005). Ainsi, les gènes du locus *cap* et du locus *pga* pourraient être impliqués dans la synthèse de capsule chez *S. lugdunensis* et agir comme un système supplémentaire de protection contre la phagocytose par les macrophages et échapper au système immunitaire de l'hôte (Lebeurre *et al.*, 2019).

#### 2.1.6. Le système de sécrétion Ess/type VII

Pendant l'infection, les bactéries pathogènes expriment des facteurs de virulence dont certains se retrouvent associés à la surface cellulaire et d'autres doivent être sécrétés dans le milieu extracellulaire. Chez *S. aureus*, les systèmes de sécrétion qui transportent la majorité des facteurs de virulence connus sont les systèmes Sec et Tat (Biswas *et al.*, 2009 ; Schneewind et Missiakas, 2012).

Un autre système de sécrétion spécialisé pour sécréter des protéines a été identifié et nommé système Ess (système de sécrétion ESAT-6) ou SST7 (système de sécrétion de type VII) (Burts *et al.*, 2005). Il est composé de 12 gènes codant 12 protéines nécessaires au bon fonctionnement du système de sécrétion (Unnikrishnan *et al.*, 2017) (**Figure 35**). Parmi elles, 6 protéines ont été décrites comme composants principaux du système, il s'agit de la protéine sécrétée EsxA, qui va être exportée dans le milieu extracellulaire par le biais de la protéine cytoplasmique EsaB et des protéines membranaires EsaA, EssA, EssB et EssC (Cao *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que les protéines sécrétées EsxA et EsxB de *S. aureus* partagent une homologie avec les protéines ESAT-6 et CFP-10 (Culture Filtrate Protein of 10 kDa) appartenant au système de sécrétion Esx-1 de *Mycobacterium tuberculosis*. Celles-ci s'avèrent être impliquées, chez *M. tuberculosis*, dans la survie bactérienne à l'intérieur des macrophages, la lyse des cellules hôtes et la dissémination de la bactérie (Stanley *et al.*, 2003). Des études sur les protéines staphylococciques ont montré que les mutants qui étaient incapables de sécréter EsxA et EsxB présentaient des défauts dans la formation d'abcès chez la souris suggérant ainsi que ces deux protéines sont nécessaires à la pathogénèse de *S. aureus* (Burts *et al.*, 2005).

. De plus, certains locus *ess* présentent des gènes supplémentaires et peuvent coder des protéines accessoires, telles que les protéines EsaC et EsaD (non représentées dans la figure 35) qui se sont révélées être importantes pour la virulence et la capacité à provoquer une infection persistante chez la souris (Burts *et al.*, 2008 ; Anderson *et al.*, 2011). La sécrétion des protéines du locus *ess*, médiée par EssE (non représentée dans la figure 35), a permis à *S. aureus* de modifier les réponses immunitaires de l'hôte pendant l'infection (Anderson *et al.*, 2016).

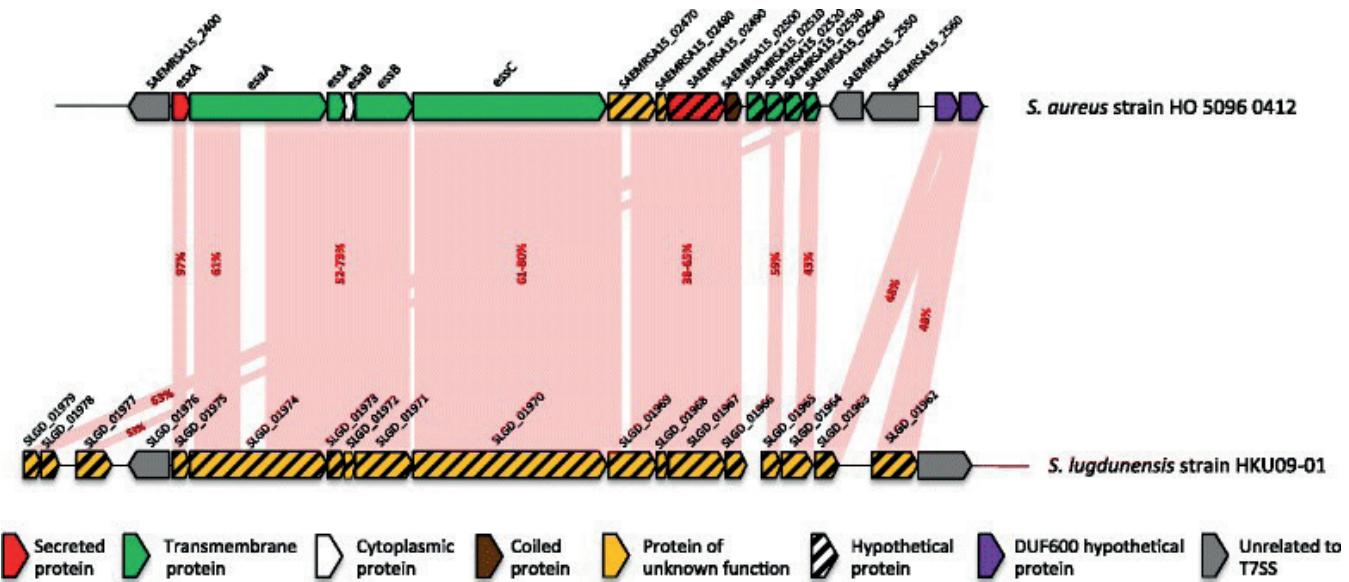


Figure 36 : Comparaison du locus *ess* de *S. aureus* avec celui de *S. lugdunensis*.

La zone en rose montre les régions qui sont conservées entre les deux souches avec le pourcentage d'identité des acides aminés marqué en rouge.

D'après Warne *et al.*, 2016.

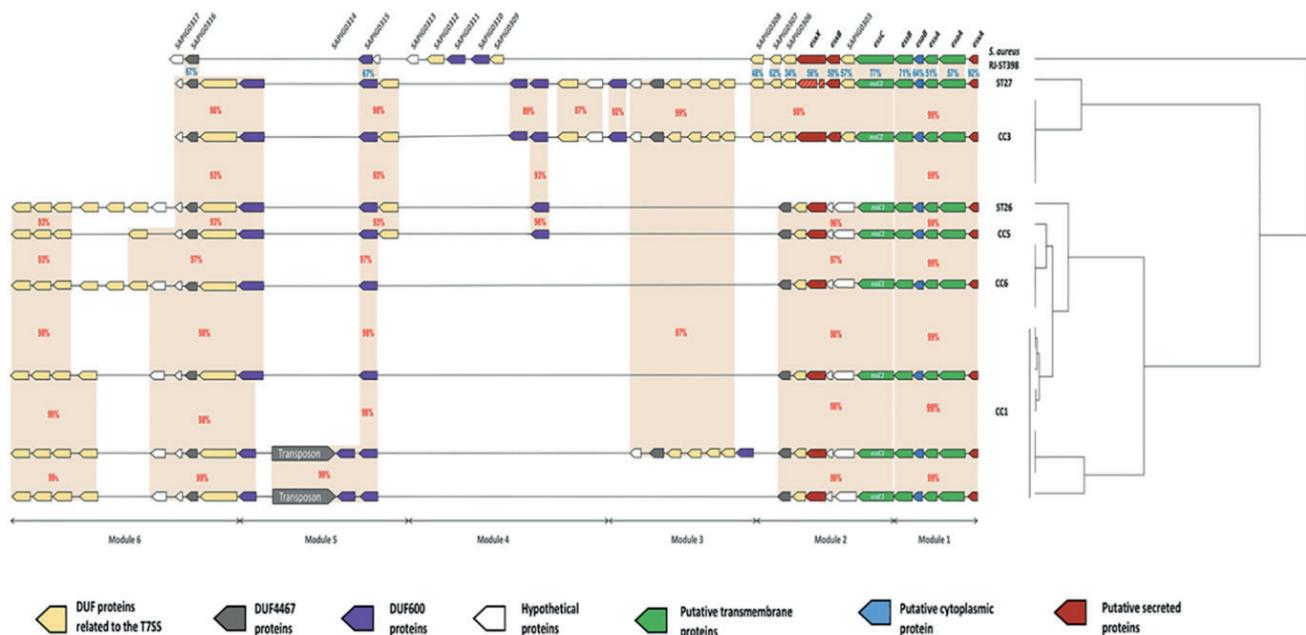


Figure 37 : Représentation schématique des 8 organisations génétiques du locus *ess* identifiées à partir de 21 génomes de *S. lugdunensis*.

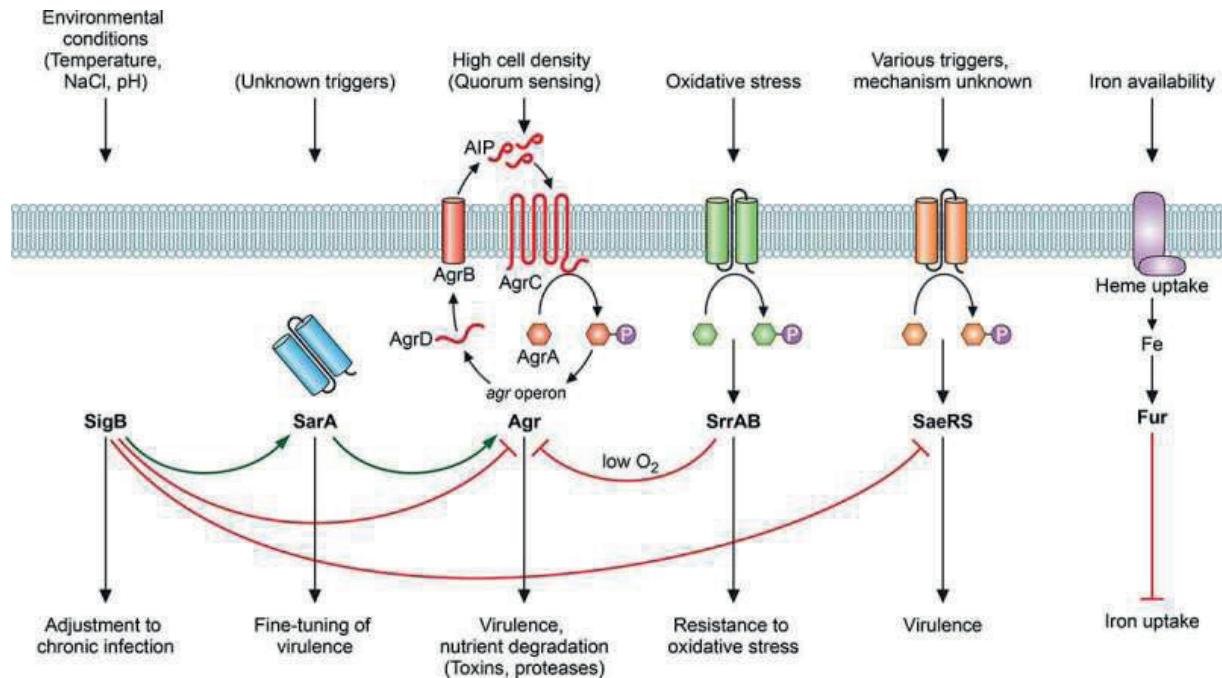
Pour chaque souche, les CC sont indiqués à droite. Le locus *ess* a été divisé en 6 modules, en fonction du contenu génétique et de la conservation relative, en utilisant l'outil de comparaison Artemis. Les zones de couleur rose mettent en évidence les séquences codantes conservées entre les souches, le pourcentage d'identité d'acides aminés entre les souches de *S. lugdunensis* (en rouge) et la souche RJ-ST398 de *S. aureus* (en bleu) est indiqué.

D'après Lebeurre *et al.*, 2019.

Une analyse génomique comparative a été réalisée en utilisant les séquences de *S. aureus* et *S. lugdunensis* afin d'étudier la distribution et l'arrangement génétique du locus *ess* (Warne *et al.*, 2016). Un SST7 a été identifié chez *S. lugdunensis*, avec des homologies dans la partie conservée du locus *ess* allant du gène *esxA* au gène *essB* et un gène similaire à *essC* du système SST7 de *S. aureus* (Warne *et al.*, 2016) (Figure 36). Fait intéressant, aucun des gènes codant les protéines principales du SST7 n'a été retrouvé chez les autres espèces de staphylocoques étudiées, ce qui suggère que *S. lugdunensis* pourrait être le seul des CoNS à posséder le locus *ess* codant le SST7. Cette découverte permet de renforcer l'idée d'une proximité entre *S. lugdunensis* et *S. aureus* (Warne *et al.*, 2016). Il est donc possible que, comme pour *S. aureus*, le SST7 identifié chez *S. lugdunensis* joue un rôle dans le développement d'abcès chez la souris, dans la pathogénicité et dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte.

Une recherche concernant l'organisation génétique dépendante du CC du locus *ess* chez *S. lugdunensis* a été réalisée dans le but de décrire la diversité génétique de ce locus au sein de l'espèce *S. lugdunensis* (Lebeurre *et al.*, 2019). Parmi les 21 génomes de *S. lugdunensis*, ont été identifiées 8 organisations génétiques dépendantes du CC, ce qui indique une importante diversité du locus *ess* chez *S. lugdunensis* (Lebeurre *et al.*, 2019) (Figure 37). L'analyse a également mis en évidence une homologie entre les 6 gènes codant les protéines principales du SST7 de *S. lugdunensis* avec ceux du SST7 de *S. aureus* (Lebeurre *et al.*, 2019). Cependant, seule la protéine EsxA semble pouvoir être sécrétée chez *S. lugdunensis* tandis que *S. aureus* peut sécréter EsxA et EsxB, deux protéines appartenant à la super-famille WXG100 (Lebeurre *et al.*, 2019). De plus, un gène codant une protéine avec un motif LXG a été trouvé chez *S. lugdunensis* (Lebeurre *et al.*, 2019). Celle-ci pourrait avoir la même fonction que les protéines EsaD et EsxX, qui sont respectivement : une nucléase impliquée dans la compétition bactérienne, et une protéine impliquée dans l'échappement immunitaire et la virulence de *S. aureus* (Cao *et al.*, 2016 ; Dai *et al.*, 2017). Toutes ces données confirment que le SST7 identifié chez *S. lugdunensis* partage des homologies avec celui de *S. aureus*, suggérant un rôle potentiel dans la virulence de *S. lugdunensis*.

Pour la majorité des bactéries pathogènes et notamment pour *S. aureus*, l'expression des facteurs de colonisation et de virulence, est sous le contrôle de systèmes de régulation qui s'activent le plus souvent en réponse à un stimulus de l'environnement. Plusieurs systèmes de régulation ont été identifiés chez *S. aureus* dont le système Agr (Accessory gene regulator) qui est l'un des plus étudiés.



**Figure 38 : Les systèmes de régulation de la virulence chez *S. aureus*.**

La régulation de la virulence chez *S. aureus* est très complexe. Elle est médiée par un grand nombre de régulateurs, seuls les plus importants sont représentés ici. De nombreux facteurs de virulence sont influencés par le facteur sigma alternatif *SigB*, la famille *Sar* des protéines de liaison à l'ADN (dont *SarA* est illustrée), le système de détection de quorum *Agr* et d'autres régulateurs tels que *SaeRS*. À l'exception du système *Agr*, les mécanismes de déclenchement exacts de ces systèmes restent largement inconnus. L'oxygène est détecté par *SrrAB*, qui joue un rôle important dans la résistance aux ERO, et *Fur* est un répresseur de liaison à l'ADN qui régule l'homéostasie du fer, mais aussi des gènes de virulence.

D'après Cheung *et al.*, 2021.

## 2.2. La régulation de la virulence

Au cours de l'infection, les bactéries pathogènes telles que les staphylocoques, doivent coordonner l'expression de leurs facteurs de virulence, précédemment décrits pour *S. lugdunensis*. La finalité est d'assurer la colonisation, l'échappement aux défenses de l'hôte, l'adhésion aux cellules, la propagation, la dissémination, la dégradation des cellules et des tissus à la fois pour la nutrition, la protection, et la survie bactérienne (Cheung *et al.*, 2004 ; Novick, 2003). Ces facteurs de virulence sont souvent sous le contrôle d'un réseau complexe de régulation en réponse aux signaux environnementaux, à la disponibilité énergétique et à la densité cellulaire (Novick, 2003). En fonction des signaux perçus, les systèmes de régulation vont stimuler ou inhiber la production des facteurs de virulence. Chez *S. aureus*, l'expression des facteurs de virulence est soumise à une grande variété de systèmes de régulation (Cheung *et al.*, 2021) (**Figure 38**). On peut distinguer deux grandes familles de régulateurs qui sont les systèmes à deux composants (Novick, 2003) et les régulateurs transcriptionnels homologues au régulateur SarA (Cheung et Zhang, 2002). Parmi ces systèmes, le plus connu et le plus étudié est le système Agr (Singh et Ray, 2014), dont des régions homologues ont été identifiées dans un grand nombre d'espèces de staphylocoques, y compris *S. lugdunensis* (Vandenesch *et al.*, 1993b ; Dufour *et al.*, 2002).

### 2.2.1. Le système Agr

Décrit pour la première fois chez *S. aureus* en 1986 (Recsei *et al.*, 1986 ; Peng *et al.*, 1988), le système Agr a ensuite été retrouvé chez 14 espèces et sous-espèces de staphylocoques parmi 34 testées (Dufour *et al.*, 2002). Il a été caractérisé en détail chez *S. lugdunensis* (Vandenesh *et al.*, 1993b), *S. epidermidis* (Van Wamel *et al.*, 1998), *S. saprophyticus* (Sakinc *et al.*, 2004) et *S. intermedius* (Sung *et al.*, 2006).

Le système Agr correspond à la combinaison d'un système de quorum-sensing (QS) et d'un système classique à deux composants (Novick, 2003 ; Yarwood et Schlievert, 2003). La détection du quorum est une régulation génique dépendante de la densité de population et de l'environnement qui permet une communication de cellule à cellule chez les bactéries (Waters et Bassler, 2005). Les bactéries possédant un système de QS produisent et libèrent des molécules de signalisation chimiques, connues sous le nom de peptides auto-inducteurs (AIP), dont la concentration extracellulaire s'intensifie avec l'augmentation de la densité de population cellulaire (Waters et Bassler, 2005). L'accumulation d'AIP est détectée par les bactéries en utilisant un système de signal-réponse (Waters et Bassler, 2005). Les systèmes à deux composants permettent de déclencher une réponse adaptée en fonction des signaux environnementaux détectés (Barrett et Hoch, 1998).

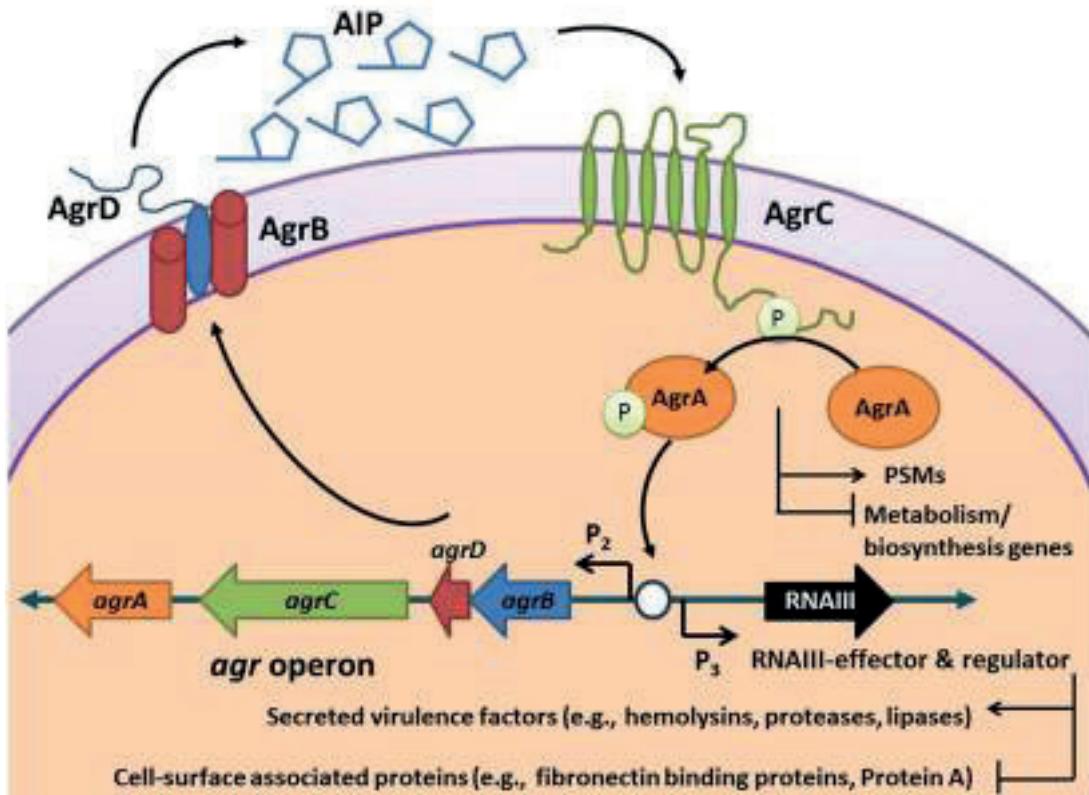


Figure 39 : Schéma du système Agr de *S. aureus*.

Le locus *agr* est connu pour contenir deux transcrits divergents nommés *ARNII* et *ARNIII*. Le transcrit *ARNII* est un opéron de quatre gènes, *agrBDCA*, qui codent les facteurs nécessaires pour synthétiser l'AIP et activer une cascade de régulation. En bref, *AgrD* est le peptide précurseur de l'AIP, *AgrB* est une protéase membranaire impliquée dans la génération de l'AIP, *AgrC* est une histidine-kinase qui est activée par la liaison de l'AIP et *AgrA* est un régulateur de réponse qui induit la transcription de *ARNII* et *ARNIII* à travers les P2 et P3. *AgrA* promeut également directement la production de PSM. Le transcrit *ARNIII* produit une molécule d'ARN (Acide Ribonucléique) régulatrice qui agit comme l'effecteur principal du système Agr en régulant positivement les facteurs de virulence extracellulaire et en régulant négativement les protéines de surface cellulaire.

D'après Quave et Horswill, 2014.

Ils sont composés de deux protéines, un capteur histidine-kinase et un régulateur de réponse. Le capteur est une protéine transmembranaire capable de répondre à un stimulus environnemental et ce senseur interagit avec un ligand du signal entraînant une réaction d'autophosphorylation. Le groupement phosphate est ensuite transféré au régulateur de réponse, entraînant un changement de configuration qui induit son activation et sa fixation sur les séquences promotrices des gènes cibles (Barrett et Hoch, 1998).

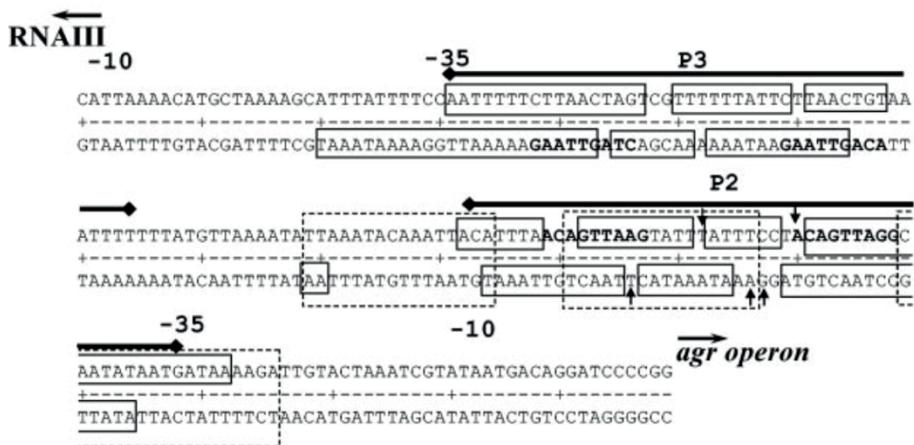
La régulation chez les staphylocoques implique principalement le système Agr qui régule l'expression d'un ensemble de gènes de virulence et de gènes métaboliques, c'est pourquoi il s'est vu attribuer un rôle central dans la physiologie et dans la pathogenèse staphylococciques (Le et Otto, 2015 ; Yarwood et Schlievert, 2003).

- **Organisation transcriptionnelle et fonctionnement du système Agr**

Chez *S. aureus*, le locus *agr* de 3 kilobases (kb) est constitué de deux transcrits divergents, *ARNII* et *ARNIII*, dirigés respectivement par les promoteurs P2 et P3 (Novick *et al.*, 1993 ; Novick *et al.*, 1995) (**Figure 39**). L'*ARNII* est un opéron qui code quatre gènes, *agrBDCA*, dont les gènes *agrB* et *agrD* codent le système de QS tandis que les gènes *agrC* et *agrA* constituent le système à deux composants (Novick *et al.*, 1995). L'*ARNIII* est un transcrit de 0,5 kb qui contient le gène *hld* de la δ-hémolysine (Novick *et al.*, 1993).

La protéine AgrD est le précurseur de l'AIP de type octapeptide du système Agr de *S. aureus*. D'une longueur de 7 à 9 acides aminés, l'AIP est maturé *via* la formation d'une liaison thiolactone cyclique entre une cystéine interne et l'extrémité carboxyle, puis sécrété par la protéine membranaire AgrB dans le milieu extracellulaire (Novick *et al.*, 1995 ; Novick, 2003). L'AIP s'accumule donc dans le milieu extracellulaire en fonction de la densité cellulaire. Lorsque la concentration seuil est atteinte, l'AIP va pouvoir être détecté par l'histidine-kinase AgrC, qui induit l'activation du régulateur transcriptionnel AgrA par phosphorylation. Une fois activé, AgrA va pouvoir réguler les gènes cibles dont l'opéron *agr* lui-même et l'*ARNIII* (Novick *et al.*, 1995 ; Novick, 2003) (**Figure 39**).

Le locus *agr* de *S. lugdunensis* possède une organisation génomique similaire à celui de *S. aureus* avec 63 % d'homologie de séquence, dont certaines régions sont hautement conservées telles que les promoteurs P2 et P3 ainsi que la région intergénique comprise entre ces deux promoteurs (Vandenesh *et al.*, 1993b). Les pourcentages de similarité entre les protéines AgrB, AgrC et AgrD de *S. lugdunensis*, et celles de *S. aureus*, sont de 50,8 %, 44,4 % et 43,9 %, respectivement (Vandenesh *et al.*, 1993b).

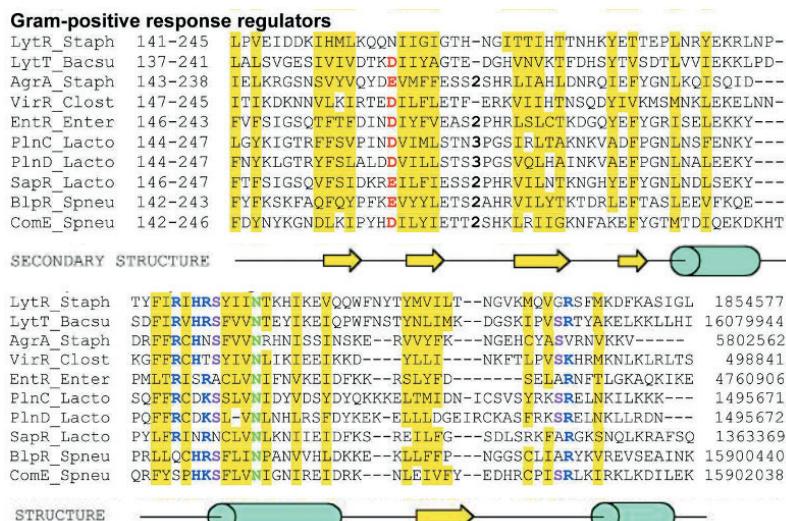


**Figure 40 : Séquence de la région intergénique entre l'*ARNIII* et le locus *agr* de *S. aureus*.**

Les régions promotrices P2 et P3 sont indiquées par les barres pleines au-dessus de la séquence.

Les zones protégées par SarA sont représentées par les encadrés en pointillés. Les répétitions du site de reconnaissance LytTR consensus sont indiquées en caractères gras. Les zones protégées de la région des promoteurs P2 et P3 sont représentées par des cadres pleins. Les emplacements approximatifs des résidus montrant une sensibilité accrue au clivage de la DNase I lors de la liaison à AgrA sont indiqués par des flèches verticales.

D'après Koenig *et al.*, 2004.



**Figure 41 : Alignement des séquences des domaines de liaison à l'ADN de type LytTR.**

Les noms de protéines, les abréviations d'espèces et les numéros d'accession GenBank sont indiqués. Les résidus d'acides aminés conservés qui pourraient être impliqués dans la liaison à l'ADN sont indiqués en gras et colorés comme suit : bleu, Arg, Lys, His ; rouge, Asp, Glu ; vert, Asn et Gln ; violet, autres résidus conservés. L'ombrage jaune indique des résidus d'acides aminés non chargés conservés.

D'après Nikolskaya et Galperin, 2002.

Concernant l'*ARNIII*, il présente un haut degré de conservation aux extrémités 5' et 3' seulement puisque l'homologie est fortement diminuée dans la région située au milieu du transcrit. Cette différence vient du fait qu'aucun cadre de lecture ouvert présentant une similitude avec le gène *hld* de *S. aureus* n'est localisé dans la séquence de l'*ARNIII* de *S. lugdunensis* (Vandenesh *et al.*, 1993b ; Sakinc *et al.*, 2004).

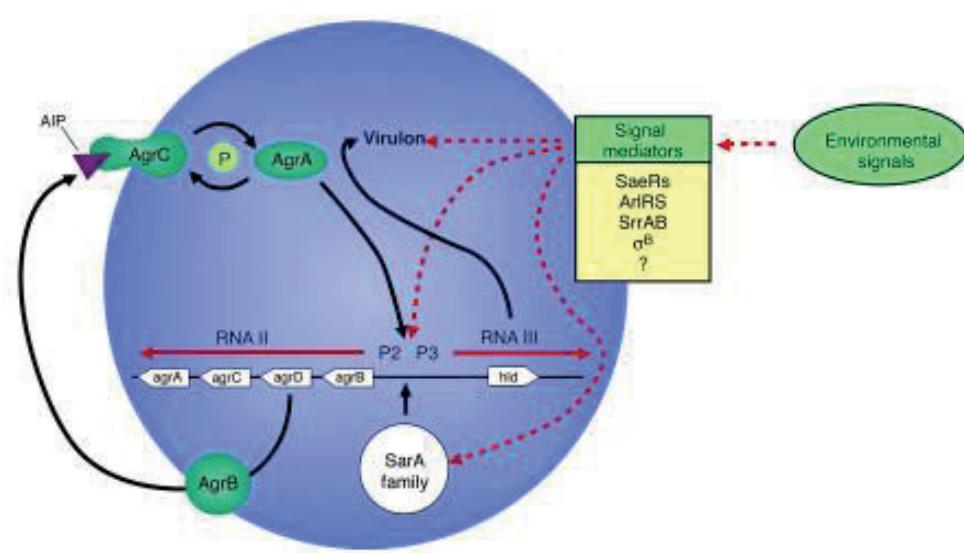
- **Auto-induction du système Agr**

Appartenant au système à deux composants codé par le locus *agr*, le régulateur transcriptionnel *AgrA* est activé lors du transfert du résidu phosphate de l'histidine-kinase *AgrC* sur son résidu aspartate (Novick *et al.*, 1995 ; Novick, 2003). Sous sa forme phosphorylée, *AgrA* régule des gènes cibles et se fixe dans la région intergénique, entre les promoteurs P2 et P3, permettant ainsi la transcription des gènes *agrBDCA* et de l'*ARNIII* (Koenig *et al.*, 2004) (Figure 40). Membre de la famille *LytR* des régulateurs de réponse, *AgrA* reconnaît les répétitions imparfaites directes de l'ADN avec une séquence consensus [TA] [AC] [CA] GTTN [AG] [TG] séparées par une région de 12 à 13 pb (Nikolskaya et Galperin, 2002) (Figure 41). Ces éléments sont retrouvés dans la région intergénique entre le locus *agr* et l'*ARNIII* (Morfeldt *et al.*, 1996). L'activation de la transcription des promoteurs P2 et P3 exige la fixation de *AgrA*, puisqu'une mutation pour le gène *agrA* élimine la transcription à partir des deux promoteurs. Cela indique que le système *Agr* est activé de manière autocatalytique (Novick *et al.*, 1995), comme c'est le cas pour de nombreux systèmes à deux composants tels que le régulon de la glutamine synthase *glnALG* des bactéries à Gram négatif (Magasanik, 1982) et le régulon *bvg* de *Bordetella pertussis* (Scarlato *et al.*, 1991). Trois étapes fonctionnelles sont à envisager pour le système *Agr* : l'étape de « repos » caractérisée par un faible niveau d'expression du promoteur P2, permettant d'assurer la présence constante des protéines *AgrA* et *AgrC* pour activer le système, suivie de l'étape « intermédiaire » correspondant à l'activation d'*AgrA* via *AgrC* permettant d'activer les promoteurs P2 et P3, puis, l'étape « finale » qui permet, après l'autoinduction du système, la répression ou l'activation des gènes régulés par le système *Agr* (Novick *et al.*, 1995). Ce type de régulation diffère d'une induction enzymatique classique puisqu'elle permet d'assurer un niveau de synthèse élevé associé à un état d'équilibre qui semble être adapté à la fin de la phase de croissance bactérienne (Novick *et al.*, 1995).

**Tableau 12 : Régulateurs transcriptionnels qui modulent la fonction du système Agr chez *S. aureus*.**

D'après Thoendel *et al.*, 2011.

Regulator	Effect on <i>agr</i>
<b>Positive Regulators</b>	
SarA	+
SarU	+
SarZ	+
MgrA	+
CcpA	+
ArlRS	+
<b>Negative Regulators</b>	
SarX	-
SarT	-
Rsr	-
SrrAB	-
Sigma B	-
CodY	-



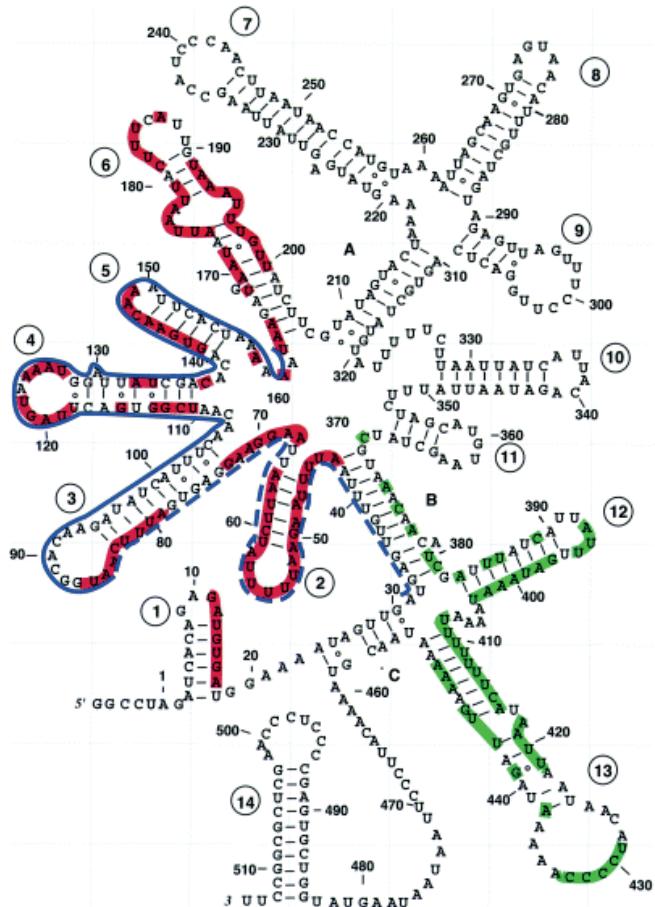
**Figure 42 : Le réseau de régulation complexe des gènes de réponse au QS et de virulence chez *S. aureus*.**

Le système Agr est composé de l'ARNII qui code le mécanisme de signalisation et de l'ARNIII qui agit comme la molécule effectrice du locus *agr*. Des régulateurs supplémentaires des gènes de réponse de quorum et de virulence, décrits dans le texte, sont répertoriés. Les voies de régulation potentielles, utilisées par les signaux environnementaux, sont indiquées par les lignes rouges en pointillés.

D'après Yarwood et Schlievert, 2003.

Le régulateur transcriptionnel AgrA a pour fonction principale d'activer positivement les promoteurs P2 et P3 du locus *agr*. Compte tenu que le système Agr soit auto-induit grâce à son propre ligand, son activité est optimale lorsque le seuil d'auto-induction est atteint (Novick, 2003).

Néanmoins, il peut également être activé par d'autres régulateurs transcriptionnels (**Tableau 12**), comme SarA (Heinrichs *et al.*, 1996) ou SrrAB (Yarwood *et al.*, 2001), et des facteurs environnementaux tels que la concentration en glucose ou le pH (Regassa *et al.*, 1992). En effet, il a été montré qu'un mutant déléte pour le locus *sar* chez *S. aureus* présentait une transcription réduite de l'*ARNII* et l'*ARNIII* du locus *agr* (Heinrichs *et al.*, 1996). Par ailleurs, il s'avère que l'expression de l'*ARNIII* du système Agr est inversement liée à l'expression du système SrrAB. On observe une augmentation des niveaux de transcription de l'*ARNIII* chez une souche de *S. aureus* mutée pour le locus *sarAB*, tandis que la surexpression de *srrAB* a entraîné une répression de la transcription de l'*ARNIII* (Yarwood *et al.*, 2001). D'autres régulateurs semblent interagir avec le système Agr, suggérant ainsi que la réponse au QS chez les staphylocoques, au cours de l'infection, se produit *via* un réseau de régulation complexe qui peut modifier l'activité du système Agr de façon directe ou indirecte (Novick, 2003 ; Yarwood et Schlievert, 2003) (**Figure 42**).



**Figure 43 : Structure secondaire de l'ARNm de *S. aureus*.**

Les numéros 1 à 14 font référence aux épingle à cheveux. Les zones A, B et C indiquent des interactions de longue distance. Le gène *hld* codant pour la δ-hémolysine (bleu), la région de complémentarité avec l'ARNm de *hla* (rouge) et la région d'initiation de l'ARNm de *spa* (vert) sont indiqués.

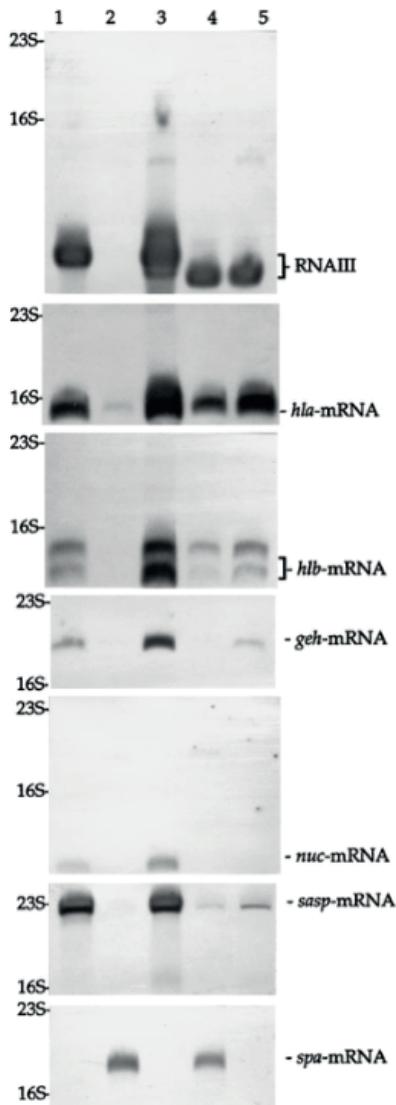
D'après Novick, 2003.

- L'ARNIII comme effecteur du système Agr

La conséquence immédiate de l'autoinduction du système Agr est la transcription et la synthèse de l'ARNIII à partir du promoteur P3 du locus. L'ARNIII est constitué de 514 nucléotides et possède une structure secondaire complexe (Novick *et al.*, 1993 ; Novick, 2003). Des travaux sur la structure secondaire de l'ARNIII ont permis de mettre en évidence la présence de 14 structures en épingle à cheveux reliées par des nucléotides non appariés et 3 hélices formées par des nucléotides distants qui ferment les domaines structurels (Benito *et al.*, 2000) (**Figure 43**). L'alignement de l'ARNIII de *S. aureus* avec ceux de *S. lugdunensis*, *S. epidermidis*, *S. warneri* et *S. simulans*, révèle que les motifs en forme de tige-boucle 1, 7, 13 et 14 sont hautement conservés, suggérant une fonction commune parmi les staphylocoques (Benito *et al.*, 2000). De plus, les motifs des épingle à cheveux 6, 8, 9, 11 et 12 sont présents dans les ARNIII des staphylocoques étudiés mais une divergence dans leurs séquences a été observée (Benito *et al.*, 2000). La tige-boucle 1 en 5' assure la stabilité de la structure de l'ARNIII et la tige-boucle 14 en 3' sert de terminateur de transcription (Benito *et al.*, 2000). Les tiges-boucles 7, 13 et 14 sont caractérisées par des régions riches en cytosine pouvant alors servir de sites de liaison avec les séquences Shine-Dalgarno présentes dans des ARN messagers (ARNm) cibles, ce qui peut interférer avec leur traduction (Benito *et al.*, 2000 ; Novick, 2003) (**Figure 43**).

La région en 5' de l'ARNIII (nucléotides 1 à 31) correspond à la région régulatrice impliquée dans l'activation de la traduction de l'a-toxine, codée par le gène *hla*, de *S. aureus* (Morfeldt *et al.*, 1995 ; Benito *et al.*, 2000). En effet, la liaison de l'ARNIII à l'ARNm de l'a-toxine entraîne un changement de conformation de ce répresseur, ce qui rend le site de fixation ribosomique disponible pour la traduction (Morfeldt *et al.*, 1995). Un mutant dépourvu du gène de l'ARNIII présentait un taux de production d'a-toxine réduit de 10 fois par rapport à la souche sauvage. Une complémentarité de 75 % entre l'extrémité 5' de l'ARNIII et la région 5' non traduite du transcrit *hla* suggère une interaction directe entre les deux ARN (Morfeldt *et al.*, 1995). Cette étude a mis en évidence le premier ARN antisens capable de stimuler la traduction d'un ARNm cible (Morfeldt *et al.*, 1995).

La région en 3' de l'ARNIII (nucléotides 383 à 514) impliquant les structures en tige-boucle 13 et 14 a été identifiée comme une région exerçant une activité de régulation spécifique pour le gène *spa* codant la protéine A de *S. aureus*, connue pour être une protéine de surface de type MSCRAMM identifiée comme un facteur de virulence (Benito *et al.*, 2000). Des travaux ont permis de montrer une répression de l'expression du gène *spa* chez un mutant  $\Delta$ ARNIII et dans lequel les 124 derniers nucléotides de la région 3' de l'ARNIII ont été clonés en aval du promoteur P3 (Benito *et al.*, 2000). Ces résultats indiquent que seules les structures en tige-boucle 13 et 14 de la région 3' de l'ARNIII sont nécessaires pour contrôler efficacement la transcription du gène *spa* (Benito *et al.*, 2000).



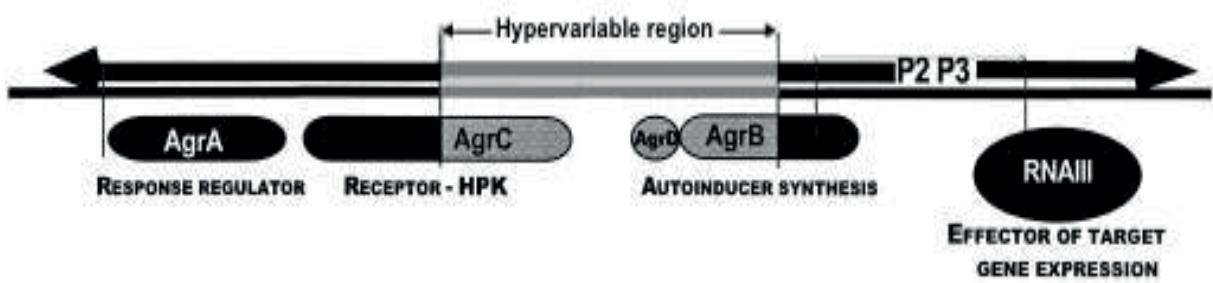
**Figure 44 : Analyse par Northern-blot de l'expression des ARNm de plusieurs protéines régulées par le système Agr.**

Les ARN des cultures bactériennes en phase post-exponentielle ont été hybridés avec des sondes correspondant à l'ARN<sub>III</sub> de *S. aureus*, l'ARN<sub>III</sub> de *S. lugdunensis*, le gène de l'α-hémolysine (*hla*), le gène de la β-hémolysine (*hlb*), le gène de la lipase (*geh*), le gène de la nucléase (*nuc*), le gène de la sérine protéase (*sasp*) et le gène de la protéine A (*spa*). Les pistes 1, 2, 3, 4 et 5 correspondent à la souche sauvage *S. aureus* RN6390, au mutant  $\Delta agr$  de *S. aureus*, au mutant  $\Delta agr$  complémenté avec l'ARN<sub>III</sub> de *S. aureus*, au mutant  $\Delta agr$  complémenté avec l'ARN<sub>III</sub> de *S. lugdunensis* et au mutant  $\Delta agr$  complémenté avec l'hybride ARN<sub>III</sub> de *S. aureus* et *S. lugdunensis*. Les positions de migration de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S (1541 nucléotides) et de l'ARNr 23S (2904 nucléotides) sont indiquées.

D'après Benito *et al.*, 1998.

Le domaine central de l'ARNIII (nucléotides 32 à 382) renferme le cadre ouvert de lecture codant le gène *hld* de la δ-hémolysine de *S. aureus* (Benito *et al.*, 2000). Ce gène *hld* est présent dans toutes les espèces staphylococciques, à l'exception de *S. lugdunensis* et *S. saprophyticus* (Vandenesh *et al.*, 1993b ; Benito *et al.*, 2000 ; Sakinc *et al.*, 2004). Les ARNIII de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri* et *S. simulans* sont similaires entre eux, notamment dans les 50 premiers et les 150 derniers nucléotides, ainsi que par la présence du gène *hld* (Tegmark *et al.*, 1998). Fait intéressant, une étude a montré qu'ils avaient également la même fonction puisqu'ils pouvaient influencer l'expression des gènes régulés par le locus *agr* de *S. aureus* (Tegmark *et al.*, 1998). En effet, en introduisant l'ARNIII de *S. epidermidis*, *S. warneri* ou *S. simulans* dans un mutant ΔARNIII de *S. aureus*, les auteurs ont montré une répression totale de la transcription du gène codant la protéine A et une induction de la transcription du locus codant l'a-hémolysine (Tegmark *et al.*, 1998). De plus, une fusion entre la moitié 5' de l'ARNIII de *S. aureus* et la moitié 3' de l'ARNIII de *S. epidermidis* a permis l'augmentation de la transcription du gène *hla* (Tegmark *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que les régions 5' et 3' de l'ARNIII sont les plus importantes pour que l'ARNIII exerce sa fonction de régulation (Tegmark *et al.*, 1998).

L'absence du gène *hld*, couplée à une faible homologie globale, malgré une conservation observée dans les extrémités 5' et 3', explique la différence notable entre l'ARNIII de *S. lugdunensis* et celui de *S. aureus* (Benito *et al.*, 1998). Comme pour les autres staphylocoques, la capacité de l'ARNIII de *S. lugdunensis* à réguler l'expression des gènes cibles de *S. aureus* a été étudiée (Benito *et al.*, 1998). L'introduction de l'ARNIII de *S. lugdunensis* chez un mutant Δ*agr* de *S. aureus* a partiellement restauré l'activité du système *Agr* (Benito *et al.*, 1998). Par ailleurs, la construction comprenant l'extrémité 5' de l'ARNIII de *S. lugdunensis* et l'extrémité 3' de l'ARNIII de *S. aureus* a permis de restaurer l'activité *Agr* de façon plus importante (Benito *et al.*, 1998). Ces données semblent indiquer que le gène *hld* présent dans l'ARNIII ne joue pas un rôle dans la fonction régulatrice de l'ARNIII. En effet, l'ARNIII de *S. lugdunensis* et l'ARNIII hydride (*S. lugdunensis* et *S. aureus*) étaient tous les deux dépourvus du gène *hld* et ont néanmoins restauré l'activité du système *Agr* (Benito *et al.*, 1998) (**Figure 44**).



**Figure 45 : La région hypervariable du locus *agr* de *S. aureus*.**

D'après Jarraud *et al.*, 2000.

Ensemble, ces données révèlent que l'ARNIII a la propriété unique d'agir comme un ARNm et d'avoir des fonctions régulatrices pléiotropes, puisqu'il permet la régulation traductionnelle de l'a-toxine et de la protéine A. Il est également un ARNm car il est impliqué dans la traduction du gène *hld* chez *S. aureus*. L'ARNIII est la molécule effectrice intracellulaire responsable de fonctions régulatrices positives et négatives du système Agr (Novick *et al.*, 1993).

- **Polymorphisme du locus *agr***

Bien que le système Agr semble conservé au sein des staphylocoques, des variations ont été retrouvées conduisant à la division des isolats de *S. aureus* en 4 groupes génétiques distincts fonction du système Agr (Novick *et al.*, 1995 ; Jarraud *et al.*, 2000 ; Dufour *et al.*, 2002). La comparaison de séquences de plusieurs souches de *S. aureus* a révélé que les variations concernaient principalement les gènes *agrB*, *agrC*, *agrD*, impliqués dans la génération du signal spécifique et la production de l'AIP, alors que le gène *agrA* du régulateur de réponse était beaucoup plus conservé (Jarraud *et al.*, 2000 ; Dufour *et al.*, 2002). La région hypervariable s'étend de la moitié N-terminale d'AgrC (où peuvent être localisés les sites extracellulaires spécifiques de reconnaissance de l'AIP) jusqu'au deux tiers C-terminaux de la protéine AgrB impliqués dans le clivage et le transport spécifique de l'AIP (Ji *et al.*, 1997) (**Figure 45**). La variation de séquence est particulièrement marquée dans le gène *agrD* situé au milieu de la région hypervariable (Ji *et al.*, 1997).

Les souches de *S. aureus* classées en 4 variantes de type Agr sont caractérisées par la production de différents AIP de motifs différents et de longueurs variables. Au sein d'un même groupe, les séquences des gènes sont hautement conservées et une activation croisée a été observée (Ji *et al.*, 1997). Cependant, il a été montré que les AIP produits par des souches appartenant à un groupe n'affectent pas l'expression du système Agr dans les souches qui appartiennent aux autres groupes (Ji *et al.*, 1997 ; Jarraud *et al.*, 2000). Cette inhibition croisée représente un type d'interférence bactérienne qui peut être corrélé à la capacité d'une souche à exclure d'autres souches et ainsi jouer un rôle dans la colonisation ou dans l'infection (Ji *et al.*, 1997). L'AIP est donc un peptide unique pour chaque groupe, ce qui peut expliquer le degré élevé de spécificité pour l'induction du locus *agr*.

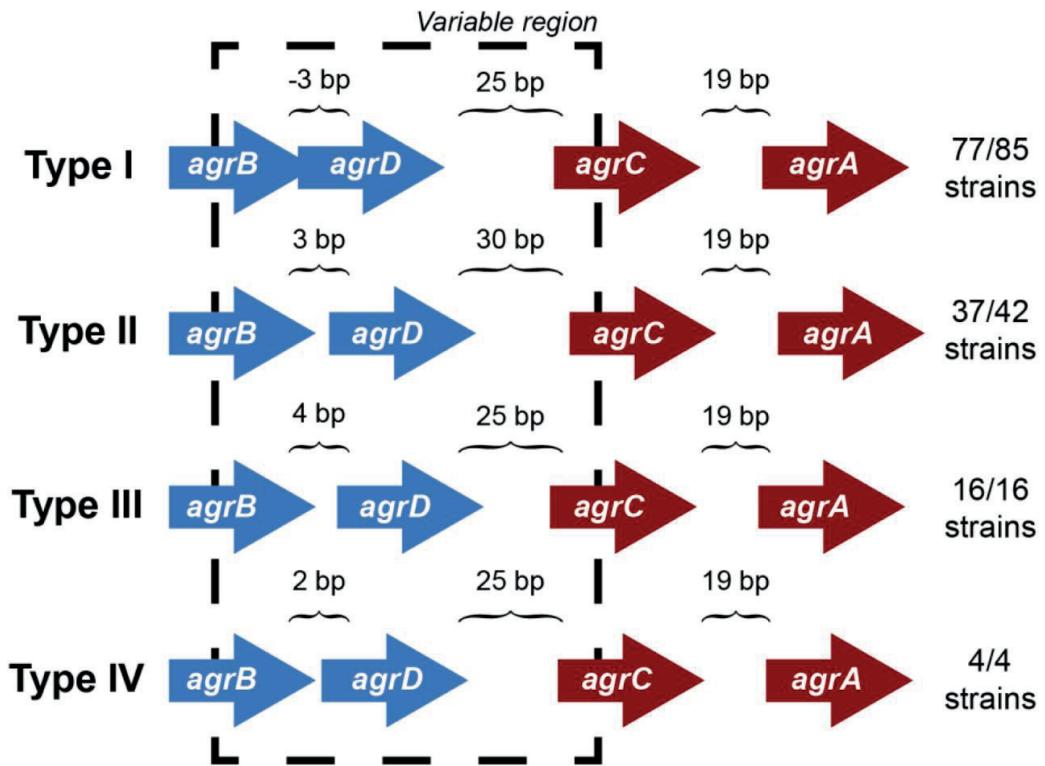


Figure 46 : Les 4 groupes du locus *agr* de *S. aureus* définis en fonction des distances intergéniques des gènes.

Les distances intergéniques entre les gènes *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA* sont conservées en fonction des groupes Agr et sont indiquées. La ligne pointillée noire met en évidence la région variable dans le locus *agr*.

D'après Choudhary *et al.*, 2018.

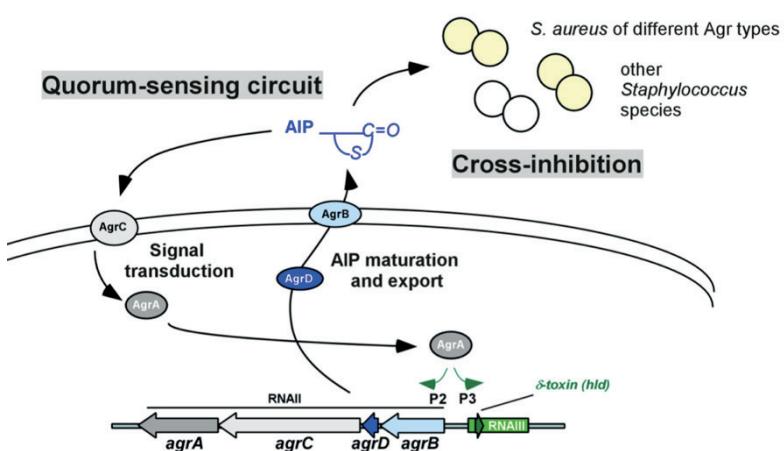


Figure 47 : Le système Agr de *S. aureus* est spécifique pour la reconnaissance de l'AIP.

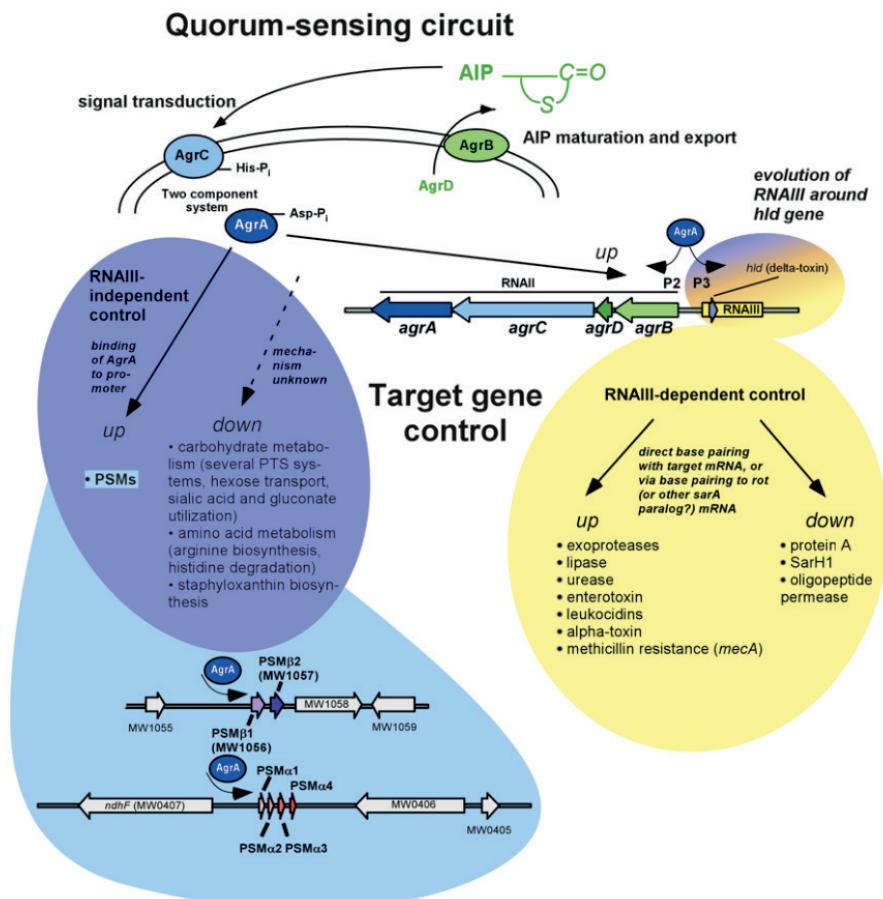
Une caractéristique importante du système Agr est la spécificité de groupe, entraînant une inhibition croisée, c'est-à-dire une inhibition de l'activité d'Agr, dans des souches appartenant à d'autres groupes de spécificité d'Agr et à d'autres espèces.

D'après Le et Otto, 2015.

Dans le but de comparer la divergence entre les 4 types de locus *agr*, l'orientation des gènes *agrBDCA* a été analysée chez 148 souches de *S. aureus* (Choudhary *et al.*, 2018). Cette étude a mis en évidence que les distances entre les gènes du locus *agr* différaient et apparaissaient hautement conservées au sein de chaque groupe (Choudhary *et al.*, 2018) (Figure 46). Les souches appartenant aux groupes 1 et 3 montrent un chevauchement précis de 3 pb entre les gènes *agrB* et *agrD*, tandis qu'ils sont séparés par 2 et 4 pb dans les groupes 2 et 4 respectivement. De plus, la distance entre les gènes *agrD* et *agrC* du groupe 2 est de 30 pb alors qu'elle est de 25 pb pour les 3 autres groupes. Fait intéressant, les 4 groupes présentent une distance intergénique conservée entre *agrC* et *agrA* de 19 pb. Il apparaît clairement que les arrangements observés contribuent à la spécificité de groupe pour la reconnaissance de l'AIP (Choudhary *et al.*, 2018). Cette même étude a montré que les propriétés biochimiques et les variations en acides aminés qui distinguent les protéines AgrC étaient spécifiques des propres groupes Agr. L'expression des gènes de virulence apparaît être également une caractéristique de chaque groupe Agr (Choudhary *et al.*, 2018).

Il est intéressant de noter que, chez *S. aureus*, les différents groupes Agr peuvent être associés à certaines infections et caractéristiques cliniques. Par exemple, la plupart des souches impliquées dans les chocs toxiques (Ji *et al.*, 1997) et les souches responsables d'une pneumonie nécrosante induite par la leucocidine de Panton-Valentine, appartient au groupe 3 (Gillet *et al.*, 2002). La majorité des souches moins sensibles à la vancomycine impliquées dans des infections sur des dispositifs médicaux appartient au groupe 2 (Sakoulas *et al.*, 2002) et la plupart des souches productrices d'exfoliatine, une toxine responsable du syndrome de la peau ébouillantée staphylococcique, appartient au groupe 4 (Jarraud *et al.*, 2000).

La variabilité de la séquence *agr* a également été analysée dans plusieurs autres espèces de staphylocoques possédant ce locus (Dufour *et al.*, 2002). Les résultats ont révélé la présence de 3 groupes Agr chez *S. epidermidis* et 2 groupes Agr ont été identifiés chez *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. capititis* subsp. *capitis*, *S. caprae* et *S. simulans* (Dufour *et al.*, 2002). Un seul groupe Agr a été détecté chez les souches *S. arletiae*, *S. carnosus*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, *S. gallinarum*, *S. intermedius* et *S. xylosus* (Dufour *et al.*, 2002). Malgré la présence des gènes *agrB*, *agrC* et *agrD* chez toutes les souches, les séquences présentent une divergence considérable puisque seulement 10 % des nucléotides étaient systématiquement conservés (Dufour *et al.*, 2002). Cette étude indique que le locus *agr* est très répandu chez les staphylocoques et les produits géniques, notamment l'AIP codé par le gène *agrD*, définissent des groupes d'activation et d'inhibition supplémentaires distincts de ceux de *S. aureus* (Vandenesh *et al.*, 1993b ; Van Wamel *et al.*, 1998) (Figure 47).



**Figure 48 : Régulation des gènes cibles par AgrA et ARNIII chez *S. aureus*.**

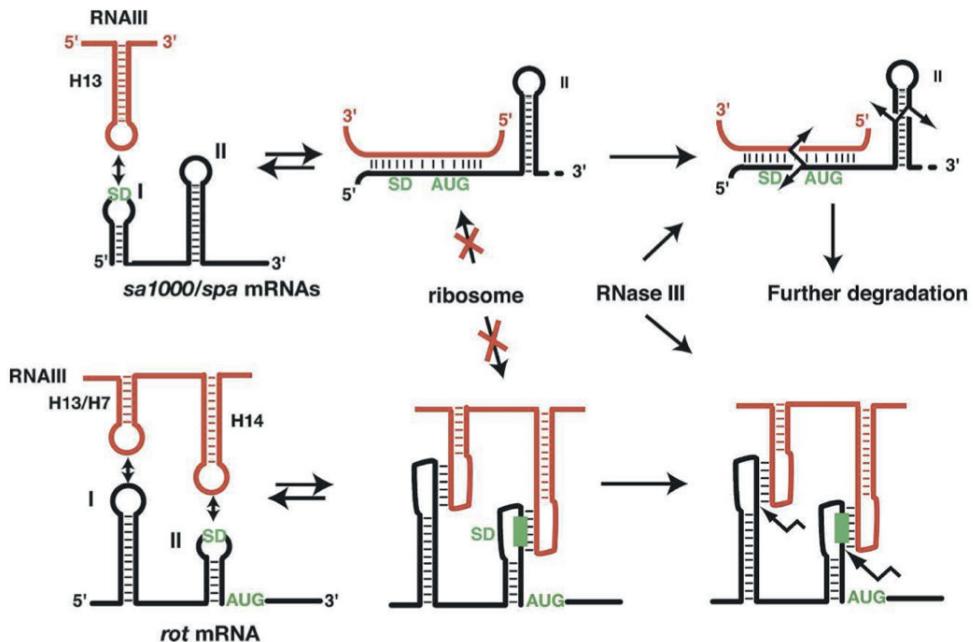
Les gènes cibles régulés par AgrA indépendamment de l'ARNIII sont montrés à gauche. Ils incluent plusieurs gènes du métabolisme et les opérons *psma* et *psm $\beta$* . La régulation génique dépendante de l'ARNIII est illustrée à droite.

D'après Queck *et al.*, 2008.

- **Les gènes régulés par le système Agr de *S. aureus***

Le locus *agr* agit comme un régulateur global des facteurs de virulence. Chez *S. aureus*, cette régulation entraîne une augmentation de l'expression des gènes codant les protéines extracellulaires (exoprotéases, lipases, entérotoxines, leucocidines, hémolysines), ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes codant des protéines de surface et d'adhésion (protéine A, coagulase, protéines de liaison à la fibronectine) (Thoendel *et al.*, 2011) (**Figure 48**). Cependant, de nombreux autres gènes impliqués dans le transport et dans diverses voies métaboliques, ainsi que l'*ARNIII*, sont affectés par le système Agr (Queck *et al.*, 2008). Cette régulation peut se produire par liaison directe d'AgrA mais dans la plupart des cas elle se produit par l'action de l'*ARNIII*, soit en se liant directement avec des ARNm, soit indirectement par une levée d'inhibition d'un répresseur transcriptionnel (Boisset *et al.*, 2007).

L'étude de la régulation des facteurs de virulence par AgrA a longtemps été négligée à la suite de la découverte de l'*ARNIII* en tant qu'effecteur majeur du système Agr (Novick *et al.*, 1993). Chez *S. aureus*, une étude a permis d'identifier les gènes régulés spécifiquement par AgrA indépendamment de l'*ARNIII*, en recherchant les loci différemment régulés dans le mutant  $\Delta agrA$  mais pas dans le mutant  $\Delta ARNIII$  (Queck *et al.*, 2008). Les résultats ont montré qu'AgrA régule plus de gènes à la baisse (85 gènes) qu'il n'en régule à la hausse (15 gènes). Parmi les gènes régulés positivement, les plus notables étaient les gènes codant les PSM qui sont des facteurs de virulence jouant un rôle dans l'échappement immunitaire (Wang *et al.*, 2007 ; Queck *et al.*, 2008). Chez *S. aureus* il existe 7 PSM, dont 4 de type  $\alpha$  présentes dans un opéron, 2 de type  $\beta$  situées dans un autre opéron et la  $\delta$ -toxine localisée dans l'*ARNIII* (Wang *et al.*, 2007). Les sites de reconnaissance d'AgrA ont été identifiés dans les régions promotrices des gènes codant les PSM  $\alpha$  et  $\beta$ , suggérant une activation directe par AgrA (Queck *et al.*, 2008). Au sein des gènes régulés à la baisse, des gènes impliqués dans le métabolisme des glucides (transport et utilisation), des acides aminés (synthèse de l'arginine et dégradation de l'histidine), et de la synthèse de la staphyloxanthine ont été retrouvés (Queck *et al.*, 2008). Il apparaît peu probable qu'AgrA soit directement responsable de la régulation de l'ensemble de ces gènes et des hypothèses ont été émises sur une action possible d'un ou plusieurs régulateur(s) supplémentaire(s) (Queck *et al.*, 2008).



**Figure 49 : Le mécanisme de régulation antisens de l'ARNIII de *S. aureus*.**

L'ARNIII se lie à ses ARNm cibles *via* une ou deux interactions tige-boucle. La liaison de l'ARNIII entrave la liaison du ribosome et favorise l'accès à la RNase III. Les séquences Shine-Dalgarno et AUG sont représentées en vert, l'ARNIII est en rouge et la cible d'ARNm en noir.

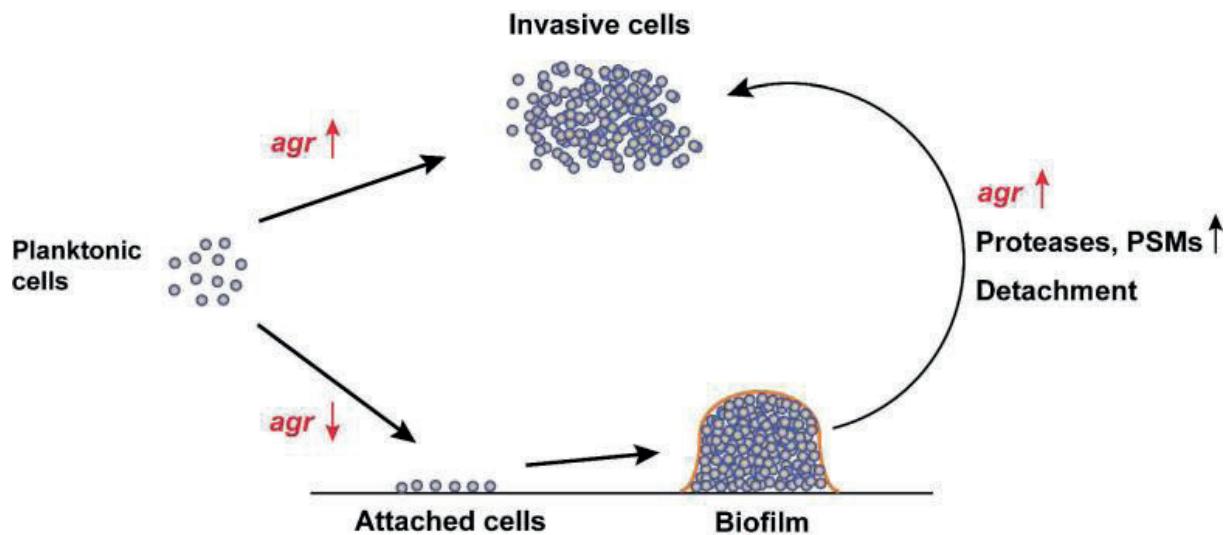
D'après Boisset *et al.*, 2007.

L'ARN $^{III}$  contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes de virulence en agissant au niveau de la transcription ou de la traduction (Novick *et al.*, 1993). Exceptée la régulation positive du gène *hld* au niveau post-transcriptionnel (Morfeldt *et al.*, 1995), l'ARN $^{III}$  bloque la traduction de la plupart des gènes de virulence, comme évoqué dans le chapitre précédent (Boisset *et al.*, 2007). Le domaine 3' de l'ARN $^{III}$  agit comme un ARN antisens qui est capable de s'hybrider rapidement à des ARNm codant des facteurs de virulence, ce qui forme des duplex d'ARN (Boisset *et al.*, 2007). L'interaction entre l'ARN $^{III}$  et les ARNm entraîne la répression de l'initiation de la traduction ce qui déclenche l'hydrolyse des endoribonucléases conduisant à la dégradation des ARNm (Boisset *et al.*, 2007) (Figure 49). Par ce mécanisme, l'ARN $^{III}$  inhibe la production des protéines de surface et d'adhésion, telles que la protéine A, FnbpA et FnbpB (Boisset *et al.*, 2007), tandis qu'il induit la production de toxines, protéases, lipases, entérotoxines, superantigènes et d'uréase. Fait intéressant, l'ARN $^{III}$  est capable de bloquer la traduction de la protéine Rot (Repressor of toxins) décrite comme un répresseur transcriptionnel de nombreuses toxines et exoprotéines. Par le biais d'une interaction avec des séquences Shine-Dalgarno riches en cystéine, l'inhibition exercée par Rot est levée et permet l'expression accrue d'entérotoxines, d'a-toxine et de leucocidines (Geisinger *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que l'expression d'un petit ARN non codant, nommé RsaE, est régulé positivement par le système Agr (Thoendel *et al.*, 2011). C'est un ARN de 100 nucléotides, capable de réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans le transport des acides aminés, le transport et le métabolisme des nucléotides, des lipides et des glucides, la biogenèse de la paroi et le transport d'ions inorganiques, probablement par un mécanisme similaire à celui de l'ARN $^{III}$  (Geissmann *et al.*, 2009). Le mécanisme précis de la régulation de cet ARN par le système Agr est encore inconnue.

- **Lien entre la formation de biofilm et le système Agr chez *S. aureus***

De nombreuses études ont montré que la formation de biofilms bactériens nécessite un mécanisme de QS pour leur maturation (Davies *et al.*, 1998). Ainsi des travaux ont été réalisés dans le but d'établir un lien entre la formation de biofilm et le système Agr chez *S. aureus*. Chez un panel de souches de *S. aureus*, 78 % des souches déficientes en locus *agr*, ont toutefois réussi à former un biofilm, démontrant que le système Agr n'est pas indispensable dans ce processus (Vuong *et al.*, 2000). Par ailleurs, le système Agr dont l'expression suit la courbe de croissance a été décrit comme un « régulateur du mode de vie du biofilm » de *S. aureus* : en phase de latence, il est inhibé chez les cellules planctoniques tandis que l'expression des protéines de surface et d'adhésion est induite ; les cellules peuvent donc adhérer aux surfaces et se développent en formant un biofilm. L'augmentation de la densité cellulaire entraîne ensuite une augmentation de la concentration en



**Figure 50 : Schéma du système Agr de *S. aureus* en tant que régulateur du mode de vie du biofilm.**

Lorsque les cellules de *S. aureus* sont sous forme planctonique, le système *Agr* est inhibé ou désactivé. Ensuite, les cellules adhèrent aux surfaces et développent un biofilm, si les conditions de croissance le permettent. Le système *Agr* s'active en fonction de l'augmentation de la densité cellulaire, l'expression des gènes codant les protéases et si les PSM sont induites, ce qui provoque le détachement du biofilm et les cellules bactériennes reviennent à l'état planctonique. Il est important de noter que ce schéma est basé sur les résultats d'expériences *in vitro* qui n'ont pas été confirmés *in vivo*.

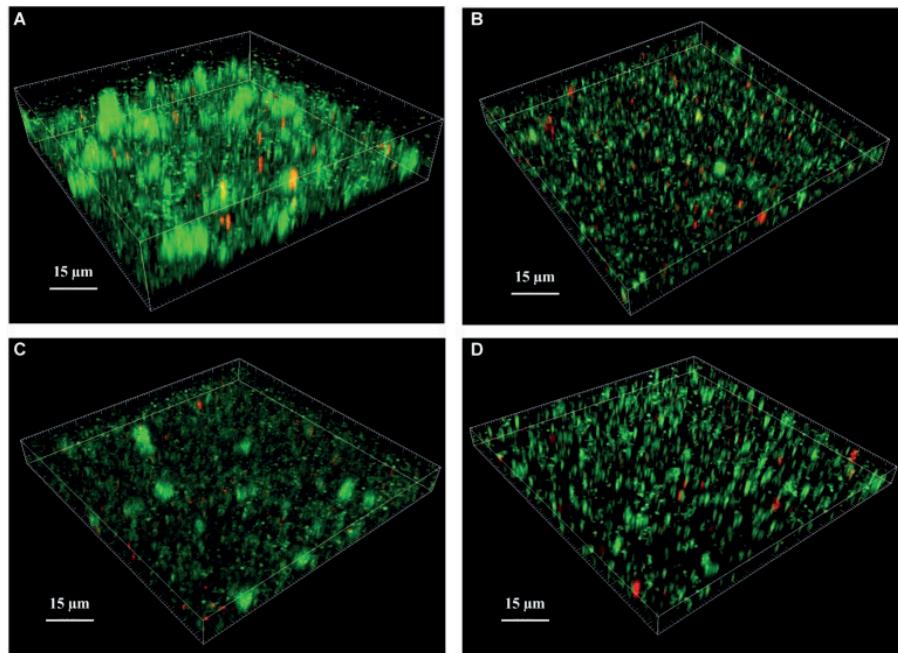
D'après Thoendel *et al.*, 2011.

AIP et l'activation du système Agr lors de la phase exponentielle. Le système Agr régule négativement les gènes des protéines de surface et positivement les protéases et PSM, ce qui provoque le détachement du biofilm et la dissémination des bactéries pour coloniser de nouvelles surfaces (Thoendel *et al.*, 2011) (**Figure 50**).

- **Rôle du système Agr dans la pathogenèse de *S. aureus***

*S. aureus* est un agent pathogène qui peut provoquer un large éventail d'infections, qui peuvent être aiguës ou chroniques, dont les manifestations sont attribuées à l'expression des facteurs de virulence induite par le système Agr (Lowy, 1998). Son rôle dans la pathogenèse de *S. aureus* a été étudié par le biais de nombreux travaux portant sur l'impact des mutations affectant ce locus dans divers modèles animaux. Comme attendu, les mutants  $\Delta agr$  ont présenté des défauts de virulence et de pathogénicité dans les modèles d'infection tels que l'EI (Cheung *et al.*, 1994), les abcès cutanés (Wright *et al.*, 2005), la pneumonie (Bubeck Wardenburg *et al.*, 2007), l'arthrite septique (Abdelnour *et al.*, 1993), l'ostéomyélite (Gillaspy *et al.*, 1995) et la dermatite atopique (Nakamura *et al.*, 2020). De plus, il a été montré qu'un défaut dans le système Agr pouvait être corrélé à une bactériémie persistante à *S. aureus* (Fowler *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la régulation positive des facteurs de virulence par le système Agr est nécessaire pour la progression de la maladie liée à *S. aureus*. Inversement, la régulation négative des PSM par AgrA, ainsi que des protéines de surface et d'adhésion par l'ARNIII, entraîne une colonisation accrue des bactéries sur les dispositifs médicaux (Vuong *et al.*, 2004 ; Periasamy *et al.*, 2012).

Afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte, *S. aureus* utilise un arsenal de facteurs de virulence pour se répliquer et détruire les neutrophiles ou les macrophages. Le rôle du système Agr dans l'échappement immunitaire a fait l'objet de plusieurs études. Il a été mis en évidence qu'un mutant  $\Delta agr$  présentait une capacité réduite à lyser les neutrophiles, liée à l'induction de l'a-toxine et des PSM par le système Agr (Pang *et al.*, 2010). Par ailleurs, *S. aureus* était capable de survivre pendant 5 jours dans des macrophages, de se répliquer, puis d'induire la lyse des cellules hôtes par le biais d'un mécanisme dépendant du système Agr (Kubica *et al.*, 2008). Ces études indiquent que le système Agr joue un rôle important dans l'interaction de *S. aureus* avec les cellules du système immunitaire.



**Figure 51 : Analyse du biofilm de *S. lugdunensis* par microscopie confocale à balayage laser.**

Les biofilms matures à 24h de *S. lugdunensis* WT (A), du mutant  $\Delta lytSR$  (B), du mutant  $\Delta lytSR$  complémenté avec le plasmide pCU1: $lytSR$  (C) et du mutant  $\Delta lytSR$  avec le plasmide vide pCU1 (D) ont été visualisés après coloration. Les cellules vivantes colorées au SYTO®9 apparaissent en vert, tandis que les cellules mortes colorées à l'iodure de propidium sont en rouge.

D'après Dahyot *et al.*, 2020.

## 2.2.2. Le système LytSR

Les systèmes à deux composants permettent à un agent pathogène, comme *S. aureus* ou *S. lugdunensis*, d'adapter son expression génique en fonction des stimuli environnementaux perçus. Parmi ces systèmes, certains sont impliqués dans le contrôle de la formation du biofilm staphylococcique, tels que le système Agr et le système LytSR (Sharma-Kuinkel *et al.*, 2009).

Décrit pour la première fois chez *S. aureus*, le système LytSR semble jouer un rôle dans l'autolyse de la paroi (Brunskill et Bayles, 1996). Une étude a montré qu'il régule positivement l'opéron *IrgAB* en réponse au métabolisme des glucides ou à la suite d'une perturbation du potentiel électrique de la membrane cellulaire (Sharma-Kuinkel *et al.*, 2009). Cet opéron *IrgAB*, en association avec l'opéron *cidABC*, permet d'induire la lyse et la mort cellulaire programmée des bactéries pendant la formation du biofilm (Rice *et al.*, 2007 ; Bayles, 2007). CidA correspond à une « *holin* » protéine dont l'activité lytique est contrecarrée par l'« *anti-holin* » LrgA. La sous-population de bactéries mortes libère de l'ADN ce qui favorise l'adhésion cellulaire et la stabilité du biofilm pour celles qui se développent (Bayles, 2007). Le rôle du système LytSR dans la formation de biofilm chez *S. aureus* a été confirmé grâce à la construction d'un mutant  $\Delta/lytS$  capable de former un biofilm plus épais et plus adhérent que la souche sauvage, avec des niveaux accrus d'ADN (Sharma-Kuinkel *et al.*, 2009).

Le locus LytSR est le seul système de régulation qui a été étudié expérimentalement chez *S. lugdunensis* (Dahyot *et al.*, 2020). Afin d'en étudier les fonctions chez *S. lugdunensis*, un mutant présentant une suppression du locus *lytSR* a été construit (Dahyot *et al.*, 2020). Le mutant  $\Delta/lytSR$  a présenté un biofilm caractérisé par une biomasse plus faible, non structuré et un taux plus élevé de cellules mortes par rapport à la souche de type sauvage (**Figure 51**). En utilisant le modèle animal d'infection de *C. elegans*, la virulence s'est révélée être significativement réduite pour le mutant  $\Delta/lytSR$  comparée à celle de la souche sauvage (Dahyot *et al.*, 2020). Par le biais d'analyses transcriptionnelles, la délétion de *lytSR* a affecté l'expression de 286 gènes, dont la plupart étaient impliqués dans le métabolisme des acides aminés, des glucides et des nucléotides. À noter que LytSR semble être responsable de la régulation de quelques facteurs de virulence et de colonisation tels que la protéine Fbl, l'autolysine AtIL et le SST7 (Dahyot *et al.*, 2020). Toutes ces données indiquent que le système LytSR est impliqué dans la pathogénèse chez *S. lugdunensis*, probablement en raison de son implication dans la formation de biofilm et le contrôle de la transcription de certains facteurs de virulence.

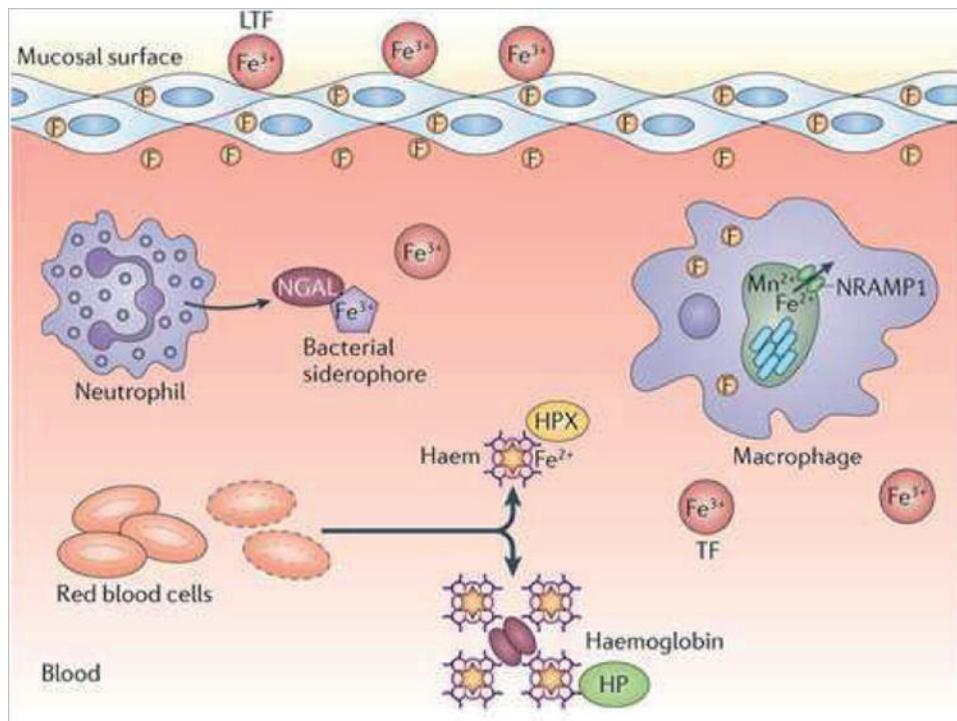


Au sein des CoNS, *S. lugdunensis* est considérée comme l'espèce la plus agressive et possède des facteurs de virulence et de colonisation qui lui permettent d'être responsable d'infections avec un niveau de gravité semblable à celui de *S. aureus* (Frank *et al.*, 2008). L'expression des facteurs de virulence chez les staphylocoques est sous le contrôle de nombreux systèmes de régulation, dont les systèmes Agr et LytSR qui ont été identifiés chez *S. lugdunensis* (Vandenesh *et al.*, 1993b ; Dahyot *et al.*, 2020). À l'exception du travail mené sur le système LytSR, aucune étude expérimentale n'a été entreprise chez *S. lugdunensis* afin de caractériser fonctionnellement d'autres systèmes de régulation des facteurs de virulence. Il apparaît donc particulièrement intéressant de poursuivre un tel travail, en particulier sur le système Agr connu pour être le régulateur majeur de la virulence chez *S. aureus* (Thoendel *et al.*, 2011).



# LE MÉTABOLISME DU FER CHEZ *S. LUGDUNENSIS*

---



**Figure 52 : Vue d'ensemble des stratégies de limitation du fer chez l'hôte.**

Ferritine, F ; transferrine sérique, TF ; lactoferrine, LTF ; haptoglobine, HP ; hémopexine, HPX ; gélatinase neutrophile, NGAL ; protéine 1 macrophagique naturelle associée à la résistance, NRAMP1.

D'après Hood et Skaar, 2012.

### 3. LE MÉTABOLISME DU FER CHEZ *S. LUGDUNENSIS*

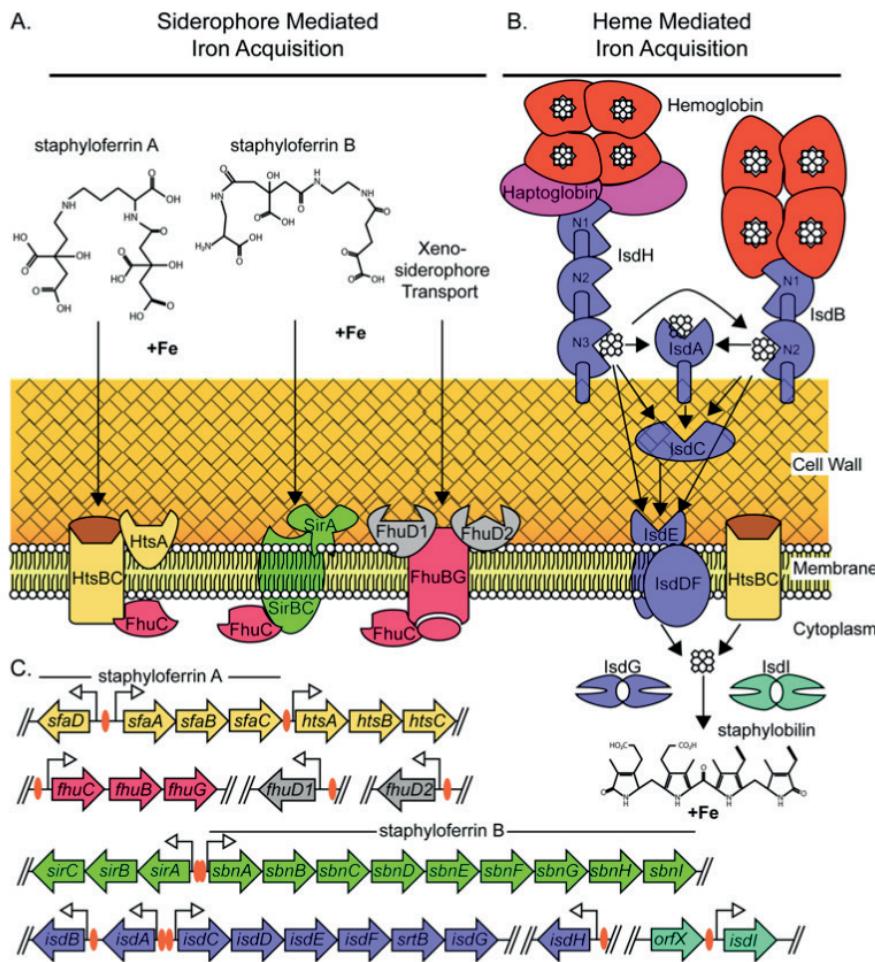
Au cours de l'infection, l'acquisition du fer est essentielle pour la survie et la propagation des bactéries pathogènes, y compris les staphylocoques (Contreras *et al.*, 2014). En effet, le fer est nécessaire pour de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la réPLICATION de l'ADN, la glycolyse, le transport des électrons et la protection contre les ERO (Contreras *et al.*, 2014). Les agents pathogènes ont donc développé des voies spécialisées pour récupérer du fer afin de satisfaire leurs besoins nutritionnels (Contreras *et al.*, 2014).

#### 3.1. Généralités sur le fer

Le fer représente le quatrième élément le plus abondant sur terre qui est retrouvé soit sous une forme réduite appelée fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) ou soit sous une forme oxydée nommée fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) (Schröder *et al.*, 2003). L'état du fer dépend de la teneur en oxygène, ainsi le fer ferreux est présent en absence d'oxygène alors que le fer ferrique est retrouvé en présence d'oxygène (Schröder *et al.*, 2003). Néanmoins, le fer ferreux pose des problèmes de toxicité en présence d'oxygène, puisqu'il entraîne la production des ERO. Cela est un réel inconvénient car les bactéries ne peuvent utiliser le fer que sous sa forme réduite (Andrews *et al.*, 2003). Elles ont alors mis en place divers mécanismes pour « détoxifier » le fer intracellulaire et contrer les problèmes imposés par leur dépendance au fer (Andrews *et al.*, 2003).

#### 3.2. Acquisition du fer

Le corps humain est un riche réservoir d'oligo-éléments essentiels pour les bactéries qui doivent satisfaire leurs besoins nutritionnels dans le but de survivre et parfois de provoquer une infection. Cependant, cette dépendance en nutriments est exploitée par l'hôte pour limiter la prolifération bactérienne et ce processus qui permet ainsi de prévenir l'infection est appelé « immunité nutritionnelle » (Hood et Skaar, 2012). En effet, le fer est rare et limitant car les fluides corporels et les tissus sont activement appauvris en fer par l'hôte ce qui empêche la croissance bactérienne (Hood et Skaar, 2012) (**Figure 52**).



**Figure 53 : Un modèle des voies d'acquisition du fer de *S. aureus*.**

A : *S. aureus* produit deux sidérophores, la staphyloferrine A et la staphyloferrine B.

B : L'acquisition de l'hème est médiée par le système Isd.

C : Loci génétiques impliqués dans les voies d'acquisition du fer de *S. aureus*.

D'après Hammer et Skaar, 2011.

Pour contourner la stratégie de séquestration du fer par l'hôte, les bactéries pathogènes ont dû élaborer des systèmes d'acquisition du fer. Ces systèmes d'absorption du fer impliquent soit l'acquisition du fer à partir de l'hème, soit par la sécrétion de sidérophores qui vont permettre d'extraire le fer lié à des protéines (transferrine, lactoferrine, ferritine) (Hammer et Skaar, 2011) (**Figure 53**).

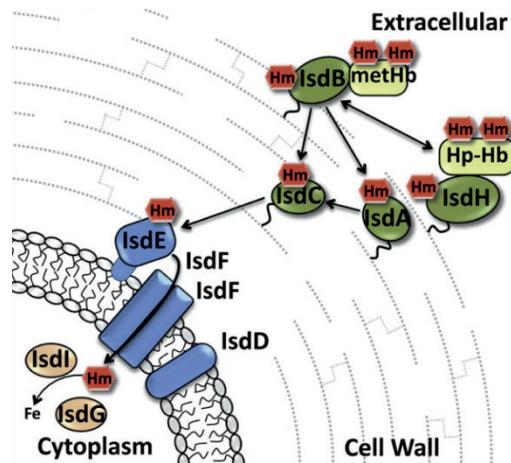
### 3.2.1. Acquisition du fer dépendante de l'hème

Chez l'Homme, le fer est présent principalement dans l'hème, qui est retrouvé dans des hémoprotéines telles que l'hémoglobine, l'hémopexine, la léghémoglobine et la myoglobine (Contreras *et al.*, 2014). L'hème contenu dans l'hémoglobine a été identifié comme étant la principale source de fer chez l'Homme et représente jusqu'à 75 % du fer total de l'hôte, dont la majorité se trouve dans les érythrocytes circulants (Brozyna *et al.*, 2014). De plus, des études ont montré qu'il est la source de fer privilégiée des bactéries virulentes lorsqu'elles pénètrent dans les tissus (Contreras *et al.*, 2014).

À noter que l'hème a été la première molécule dont le mécanisme d'importation à travers la paroi cellulaire a été élucidé chez les bactéries à Gram positif (Hammer et Skaar, 2011). Les bactéries peuvent séquestrer l'hème des hémoprotéines de l'hôte en sécrétant des protéines appelées hémophores (ou récepteurs d'hémoprotéines) présents au niveau de la membrane, ou en utilisant des systèmes qui permettent de capturer et de transporter l'hème à travers la membrane (Contreras *et al.*, 2014).

- **Le système Isd**

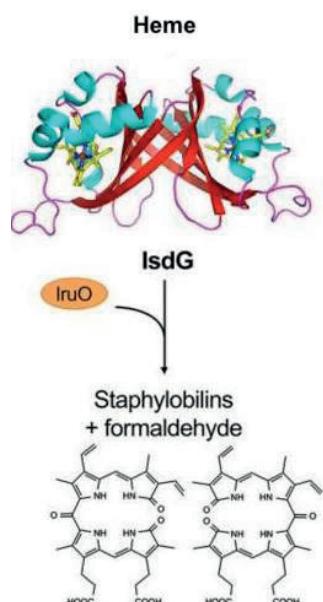
Il existe plusieurs mécanismes impliqués dans la capture et le métabolisme du fer lié à l'hème chez les staphylocoques, parmi eux figure le système Isd qui a été identifié chez *S. aureus* et chez trois espèces de CoNS que sont *S. lugdunensis*, *S. capititis* et *S. caprae* (Mazmanian *et al.*, 2002 ; Heilbronner *et al.*, 2011 ; Sun *et al.*, 2020).



**Figure 54 : Représentation schématique du système Isd de *S. aureus* impliqué dans le transport de l'hème.**

Les protéines ImdA, ImdB, ImdC et ImdH (vert) sont ancrées de manière covalente à la paroi cellulaire. ImdE, ImdF et ImdG (bleu) sont les composants de la protéine de liaison et d'un transporteur ABC (ATP Binding Cassette). ImdG et ImdI sont des enzymes cytoplasmiques dégradant l'hème. Les préférences de ligand pour chaque membre sont illustrées par Hm (hème), metHb (méthémoglobine) et Hp (haptoglobine-hémoglobine). La voie de transfert d'hème prédominante dans le système Isd est représentée par des flèches.

D'après Grigg *et al.*, 2010.



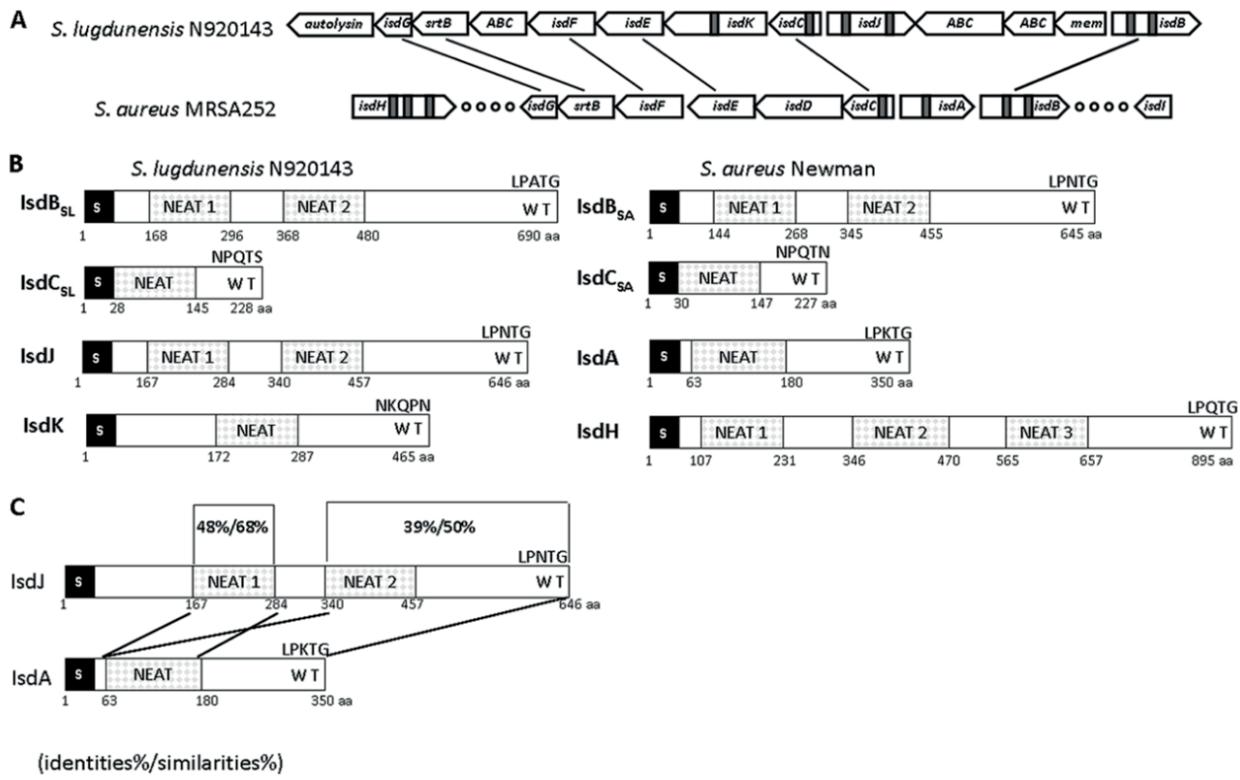
**Figure 55 : Dégradation de l'hème par la protéine ImdG de *S. aureus*.**

La dégradation de l'hème par ImdG provoque la production de staphylobilines et de formaldéhyde.

D'après Contreras *et al.*, 2014.

Ce système a été découvert chez *S. aureus* et a été identifié comme voie principale d'absorption du fer hémique (Mazmanian *et al.*, 2002 ; Grigg *et al.*, 2010) (**Figure 54**). Il est codé par le locus *isd* composé de 9 gènes (*isdABCDEFGHI*) et caractérisé par des protéines dont certaines abritent un ou plusieurs domaines NEAT (NEAr iron Transporter) (Hammer et Skaar, 2011). Ces motifs NEAT de 125 acides aminés sont retrouvés dans des transporteurs putatifs du fer et sont capables de lier une molécule d'hème (Hammer et Skaar, 2011). Les protéines *IsdA*, *IsdB*, *IsdC* et *IsdH* possèdent toutes des domaines NEAT dont 3 motifs en tandem pour *IsdH* et 2 motifs en tandem pour *IsdB* (Hammer et Skaar, 2011). Ces 4 protéines sont localisées dans la paroi cellulaire, dont l'ancrage est assuré par la *SrtA* pour *IsdA*, *IsdB* et *IsdH* car elles possèdent un motif LPXTG. *IsdC*, possédant un motif NPTQN, est ancrée *via* la sortase B (*SrtB*) (Mazmanian *et al.*, 2002). *IsdB* et *IsdH* permettent de capturer l'hème contenu dans l'hémoglobine de l'hôte (Contreras *et al.*, 2014). L'hème est ensuite conduit à la membrane cytoplasmique *via* une cascade de transfert spécifique de l'hème jusqu'à sa prise en charge par *IsdC* en association avec *IsdA* (Contreras *et al.*, 2014). Puis, il est transporté à travers la membrane par la lipoprotéine membranaire *IsdE* et le transporteur de type ABC *IsdDF* (Contreras *et al.*, 2014). *IsdF* correspond à la perméase qui transporte l'hème dans le cytoplasme en utilisant l'énergie fournie par l'activité d'hydrolyse de l'ATP (Adénosine-Triphosphate) de l'*IsdD* (Hammer et Skaar, 2011). Afin d'utiliser l'hème comme source de fer, les bactéries doivent posséder des mécanismes permettant d'extraire et de libérer l'atome de fer présent dans l'hème (Hammer et Skaar, 2011). Dans le système *Isd*, les protéines cytoplasmiques *IsdG* et *IsdI* sont des hème-oxygénases impliquées dans la dégradation de l'hème (Contreras *et al.*, 2014). Une distorsion de la molécule d'hème est permise par ces deux protéines favorisant ainsi sa dégradation (Contreras *et al.*, 2014). Chez *S. aureus*, l'oxydoréductase du fer *IruO* est également nécessaire pour la dégradation de l'hème par les protéines *IsdG* et *IsdI*, et entraîne la production de staphylobilines et de formaldéhyde (Contreras *et al.*, 2014) (**Figure 55**). Les hème-oxygénases sont responsables du clivage du cycle porphyrine de l'hème, libérant ainsi le fer qui peut alors être utilisé à des fins métaboliques (Reniere *et al.*, 2007).

Parmi les CoNS, le locus *isd* a d'abord été trouvé chez *S. lugdunensis* grâce à l'analyse de la séquence génomique de la souche N920143 (Heilbronner *et al.*, 2011). Par la suite, en 2020, une étude a identifié la présence de ce système chez deux autres CoNS, *S. capitis* et *S. caprae*, mais pas chez *S. epidermidis* (Sun *et al.*, 2020). L'identification de ce locus chez ces trois espèces indique leur capacité à acquérir l'hème en tant que source de fer nutritif pendant l'infection, comme pour *S. aureus* (Sun *et al.*, 2020).



**Figure 56 : Représentations schématiques du locus *isd* et des protéines *Isd* de *S. lugdunensis* en comparaison avec *S. aureus*.**

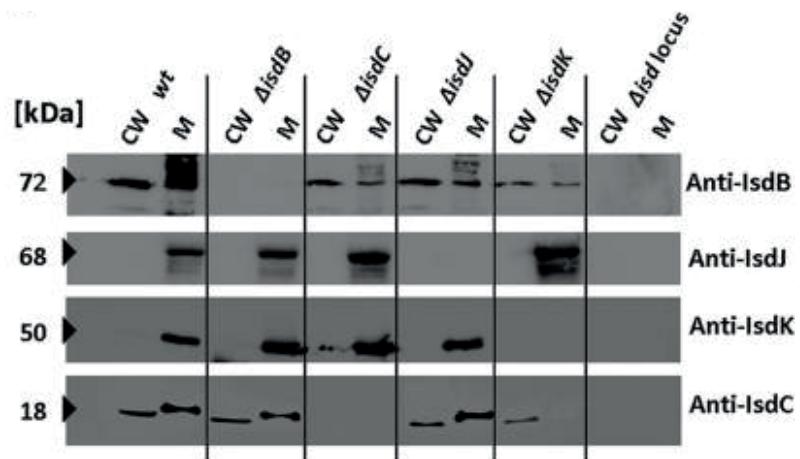
A : Comparaison des loci *isd* de *S. aureus* et *S. lugdunensis*. Les lignes noires relient les gènes orthologues. Les domaines NEAT sont indiqués par des cases grises.

B : Représentation schématique des protéines putatives *IsdB*, *IsdC*, *IsdJ* et *IsdK* ancrées à la paroi cellulaire de *S. lugdunensis* et *IsdA*, *IsdB*, *IsdC* et *IsdH* de *S. aureus*. Les positions des domaines NEAT ont été déterminées à partir de leurs structures prédictes basées sur l'homologie avec les structures cristallines disponibles des protéines *Isd* de *S. aureus*. Les séquences signal (S) et les motifs d'ancrage cellulaire putatifs (WT) sont indiqués.

C : Schéma représentant la conservation dans des régions spécifiques entre *IsdA* de *S. aureus* et *IsdJ* de *S. lugdunensis*.

D'après Zapotoczna *et al.*, 2012.

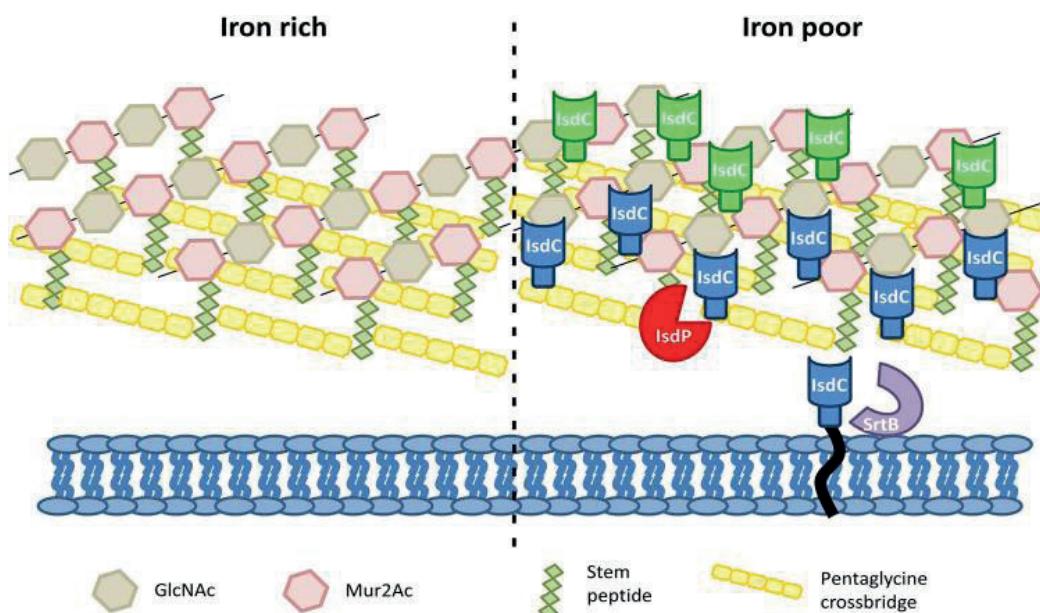
Le locus *isd* identifié chez *S. lugdunensis* présente une organisation génétique similaire avec celui de *S. aureus* (Heilbronner *et al.*, 2011) (**Figure 56**). De plus, les protéines *Isd* de *S. lugdunensis* partagent un fort pourcentage d'identité avec celles de *S. aureus* (36,8 % pour *IsdB*, 57,6 % pour *IsdC*, 74,7 % pour *IsdE*, 57,7 % pour *IsdF*, 58,2 % pour *SrtB* et 68,2 % pour *IsdG*) (Heilbronner *et al.*, 2011). Cependant, quelques différences entre ces deux loci ont été mises en évidence. En effet, deux gènes codant des transporteurs ABC sont présents dans le locus *isd* de *S. lugdunensis* (un entre les gènes *srtB* et *isdF*, l'autre entre les gènes *isdJ* et *isdB*) alors qu'ils sont absents chez *S. aureus* (Heilbronner *et al.*, 2011). Contrairement à *S. aureus* qui possède 4 protéines ancrées à la paroi cellulaire (*IsdA*, *IsdB*, *IsdC* et *IsdH*), seules 2 protéines d'ancrage ont été retrouvées chez *S. lugdunensis*, *IsdB* et *IsdC*, dont les domaines NEAT sont conservés. Les domaines NEAT1 et NEAT2 de *IsdB* chez *S. lugdunensis* sont identiques à 60 % et à 56 % aux domaines NEAT1 et NEAT2 de *IsdB* chez *S. aureus*, respectivement (Zapotoczna *et al.*, 2012) (**Figure 56**). Les protéines *IsdJ* et *IsdK* chez *S. lugdunensis* présentent également des similitudes avec la protéine *IsdA* de *S. aureus*, notamment dans les domaines NEAT (de 39 % à 68 %), ce qui indique que ces deux protéines pourraient être des protéines d'ancrage à la paroi chez *S. lugdunensis* (Zapotoczna *et al.*, 2012) (**Figure 56**). De plus, les gènes *isdD*, *isdI* et *isdH* sont absents chez *S. lugdunensis*, cependant le gène *isdD* est remplacé par le gène *isdK* dont la séquence comprend un motif NEAT (Heilbronner *et al.*, 2011). Il est intéressant de noter que dans le locus *isd* de *S. lugdunensis*, un gène codant une autolysine putative a été identifié en aval du gène *isdG* alors qu'aucun gène orthologue n'est présent chez *S. aureus* (Heilbronner *et al.*, 2011). Aussi, les différences observées entre ces deux loci peuvent être expliquées par la localisation chromosomique du locus *isd* qui est différente entre ces deux espèces : le système *Isd* de *S. lugdunensis* est proche de l'origine de réPLICATION du chromosome alors qu'il est situé au milieu du chromosome chez *S. aureus* (Heilbronner *et al.*, 2011). Les gènes localisés à proximité de l'origine de réPLICATION sont généralement considérés comme présents à un nombre élevé de copies lors de la réPLICATION (Heilbronner *et al.*, 2016). Par ailleurs, une duplication et une amplification du locus *isd* ont été retrouvées dans l'isolat clinique *S. lugdunensis* HKU09-01, soulignant l'importance de ce locus pour cette espèce (Heilbronner *et al.*, 2016). Cette amplification a augmenté le niveau d'expression des protéines *Isd* et a amélioré la liaison de l'hémoglobine à la surface cellulaire de *S. lugdunensis*, donnant un avantage compétitif lorsqu'il subit des pressions environnementales telles que l'immunité nutritionnelle (Heilbronner *et al.*, 2016).



**Figure 57 : Détection de l'expression des protéines Isd de la souche sauvage (WT) et des mutants  $\Delta isdB$ ,  $\Delta isdC$ ,  $\Delta isdJ$ ,  $\Delta isdK$  et  $\Delta isd$  de *S. lugdunensis* N920143 dans les fractions de la paroi cellulaire (CW) et de la membrane (M).**

L'immunotransfert a été réalisé avec de l'IgG anti-Isd de lapin suivi de la protéine A conjuguée à la peroxydase de raifort.

D'après Zapotoczna *et al.*, 2012.



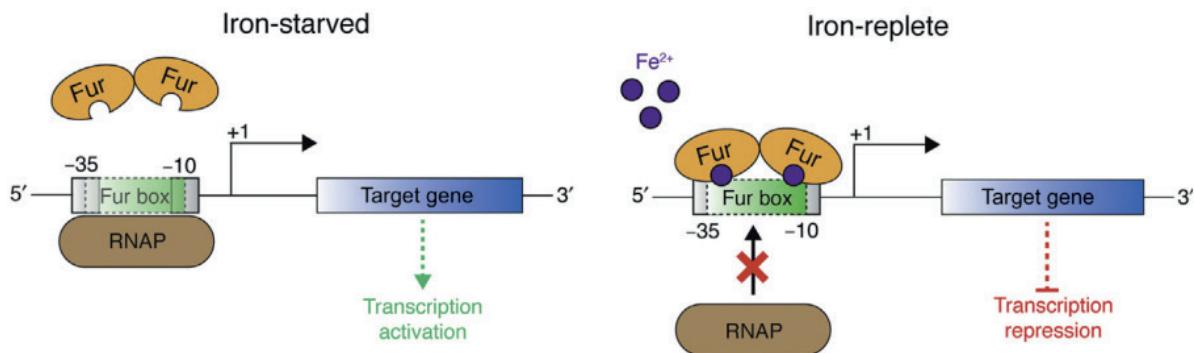
**Figure 58 : Modèle de contribution de la protéine IsdP à l'acquisition d'hème chez *S. lugdunensis*.**

Dans des conditions riches en fer, les protéines IsdC et IsdP sont absentes.

Dans des conditions de restriction en fer, IsdP remodèle la paroi cellulaire en clivant les ponts pentaglycine permettant l'attachement d'IsdC (bleu) à la paroi via SrtB. Une sous-population d'IsdC (vert) est également présentée à la surface de la bactérie.

D'après Farrand *et al.*, 2015.

Plusieurs protéines lsd chez *S. lugdunensis* ont fait l'objet d'études, notamment lsdG, lsdB, lsdC, lsdJ et lsdK, ainsi que la protéine lsdP décrite en 2015 (Haley *et al.*, 2011 ; Zapotoczna *et al.*, 2012 ; Farrand *et al.*, 2015). lsdG de *S. lugdunensis* a été caractérisée comme une hème-oxygénase et qui apparaît être régulée par la concentration en fer. En effet, son expression est augmentée lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions de limitation en fer (utilisation d'un chélateur de fer, 2,2'-dipyridyl, nommé DIP) (Haley *et al.*, 2011). Il a été montré qu'lsdG avait la capacité de se lier et de dégrader l'hème, ce qui entraînait la libération du fer libre et la production de la staphylobiline permettant ainsi à *S. lugdunensis* d'utiliser l'hème comme source de fer pendant l'infection (Haley *et al.*, 2011). Une autre investigation sur la fonctionnalité des protéines lsd de *S. lugdunensis* a permis de mettre en évidence que, comme lsdG, les protéines lsdB, lsdC, lsdJ, lsdK sont exprimées dans des cultures cultivées dans un milieu appauvri en fer et sont donc directement régulées par le taux en fer (Zapotoczna *et al.*, 2012). Les protéines lsdB et lsdC de *S. lugdunensis*, impliquées dans la capture de l'hème, possèdent un motif d'ancrage à la paroi cellulaire, cependant il semble qu'elles ne soient que partiellement ancrées à la paroi puisqu'elles ont également été détectées dans la fraction membranaire (Zapotoczna *et al.*, 2012) (**Figure 57**). Les protéines lsdJ et lsdK n'ont été détectées que dans la fraction membranaire ce qui signifie qu'elles ne sont pas présentes sur la paroi cellulaire (Zapotoczna *et al.*, 2012). Ensemble, ces données suggèrent l'existence de deux voies d'acquisition de l'hème chez *S. lugdunensis*, la première nécessitant l'utilisation des protéines lsdB et lsdC de la paroi et la seconde utilisant des protéines sécrétées (lsdB, lsdJ et lsdK) qui acquièrent l'hème de l'environnement et le transmettent à lsdC (Zapotoczna *et al.*, 2012). Cependant, l'incapacité d'lsdB à se lier à l'hémoglobine murine a entravé les tentatives de compréhension au niveau moléculaire du système lsd de *S. lugdunensis* dans des modèles d'infection de souris (Heilbronner et Foster, 2021). En aval du gène *lsdC*, *S. lugdunensis* possède un gène codant une autolysine putative (Farrand *et al.*, 2015). Le produit de ce gène, nommé protéine lsdP, a été décrit comme une hydrolase du peptidoglycane impliquée dans la modification de la localisation de la paroi cellulaire d'lsdC et dans l'acquisition de l'hème dépendant de l'hémoglobine (Farrand *et al.*, 2015) (**Figure 58**).

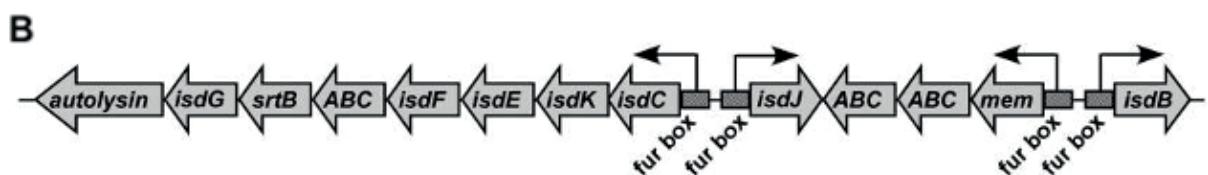


**Figure 59 : Mécanisme d'activation du régulateur Fur chez *S. aureus*.**

Lorsque le fer libre est limité, le dimère apo-Fur se dissocie de la Fur-box ce qui initie la transcription par l'ARN polymérase (RNAP). Dans des conditions riches en fer, le dimère de Fur se fixe à la Fur-box et obstrue les sites d'initiation -35 et/ou -10, ce qui inhibe la liaison de la RNAP et réprime la transcription du gène.

D'après Price et Boyd, 2020.

**A** consensus GATAATGATTATCATTAT  
*S. aureus isdG* GATAAT**CATTATTATT****TA**  
*S. lugdunensis isdG* GATAAT**CATT****TTCA****AT****TA**



**Figure 60 : Les régions Fur-box du locus *isd* de *S. lugdunensis*.**

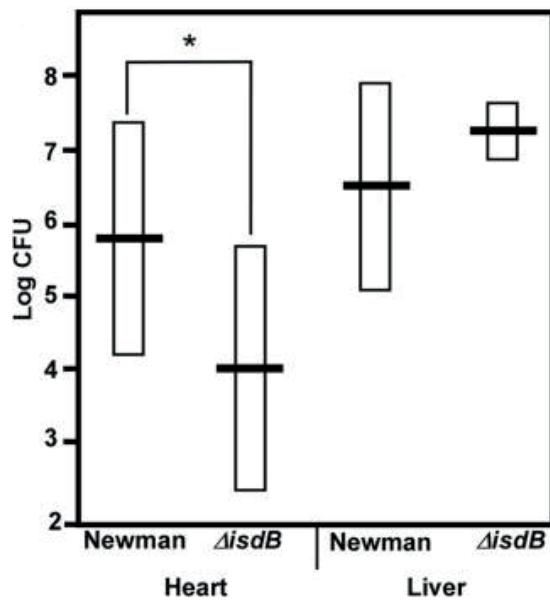
A : Alignement de la séquence nucléotidique de la séquence consensus de la Fur-box de *S. aureus*, de la séquence de la Fur-box du gène *isdG* de *S. aureus* et de la séquence de la Fur-box du gène *isdG* de *S. lugdunensis*. Les nucléotides qui diffèrent de la séquence consensus sont indiqués en gras.

B : Localisation des régions Fur-box dans le locus *isd* de *S. lugdunensis*.

D'après Haley *et al.*, 2011.

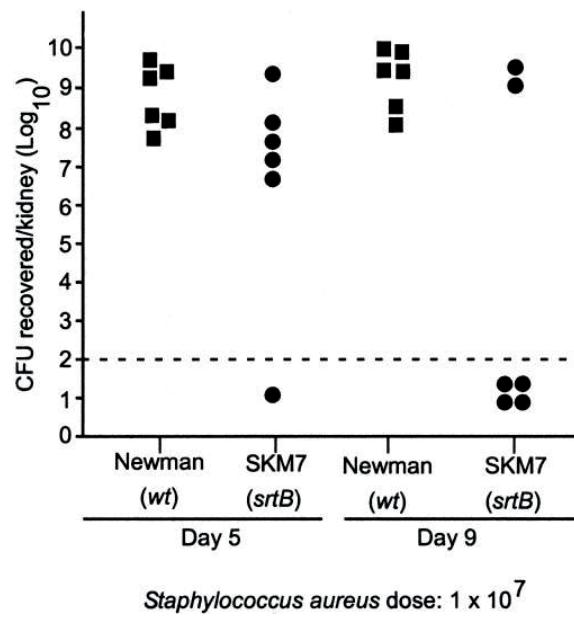
Pour résumer, *S. lugdunensis* possède et utilise le système Isd pour acquérir du fer à partir de l'hème, comme *S. aureus*. IsdB est un récepteur présent à la surface de la paroi cellulaire qui reconnaît et capture l'hémoglobine (Zapotoczna *et al.*, 2012). IsdP réorganise la paroi et permet l'attachement d'IsdC au peptidoglycane *via* la SrtB (Farrand *et al.*, 2015). IsdC, récepteur de l'hème situé dans la paroi cellulaire, peut recevoir de l'hème soit par IsdB, soit par IsdJ et IsdK (Zapotoczna *et al.*, 2012). En effet, IsdJ et IsdK sont des protéines de liaison à l'hème présentes dans la membrane cytoplasmique et le milieu extracellulaire (Zapotoczna *et al.*, 2012). L'hème lié à IsdC est ensuite transféré sur les transporteurs membranaires putatifs IsdE et IsdF (Zapotoczna *et al.*, 2012). Enfin, IsdG extrait et dégrade l'hème, et l'atome de fer ainsi libéré peut alors être utilisé par *S. lugdunensis* (Haley *et al.*, 2011).

Lorsque *S. aureus* provoque une infection chez l'hôte, il détecte un environnement appauvri en fer et induit alors l'expression du système Isd pour satisfaire ses besoins en fer nutritif (Hammer et Skaar, 2011). L'induction de l'expression des gènes *isd* est médiée par le régulateur transcriptionnel dépendant du fer nommé Fur (Ferric uptake regulator) (Price et Boyd, 2020). En présence de fer, le régulateur Fur se lie à une séquence nucléotidique consensus connue sous le nom de Fur-box qui est située en amont des gènes régulés par Fur (Price et Boyd, 2020) (**Figure 59**). En condition de limitation en fer, Fur ne se fixe plus sur les régions Fur-box, ce qui entraîne une levée de la répression transcriptionnelle et permet l'expression des gènes cibles (Price et Boyd, 2020) (**Figure 59**). Fur régule l'expression des facteurs de virulence staphylococciques impliqués dans l'attachement aux cellules de l'hôte, la formation de biofilm, l'échappement au système immunitaire, la survie bactérienne et la pathogénicité (Hammer et Skaar, 2011). Comme chez *S. aureus*, le système Isd de *S. lugdunensis* possède des motifs Fur-box en amont des codons d'initiation des gènes *isdB*, *isdC*, *isdJ* et du gène codant un transporteur ABC (entre les gènes *isdJ* et *isdB*) (Haley *et al.*, 2011) (**Figure 60**). Par conséquent, la présence de ces Fur-box dans le locus *isd* indique une possible régulation par le taux en fer et l'expression de ce locus sera donc maximale en condition de limitation en fer (Haley *et al.*, 2011). Plusieurs études ont montré que les protéines IsdG, IsdB, IsdC, IsdJ, IsdK et IsdP étaient significativement exprimées de façon plus abondante en condition de carence en fer (Haley *et al.*, 2011 ; Zapotoczna *et al.*, 2012 ; Farrand *et al.*, 2015). Des analyses globales de transcriptomique et de protéomique en réponse à la limitation en fer chez *S. lugdunensis* ont confirmé la surexpression des gènes *isd* et une abondance plus importante des protéines Isd (Aubourg *et al.*, 2020 ; Aubourg *et al.*, 2021).



**Figure 61 : IsdB de *S. lugdunensis* est exprimée dans le cœur des souris infectées et contribue à la colonisation cardiaque.**

D'après Pishchany *et al.*, 2009.

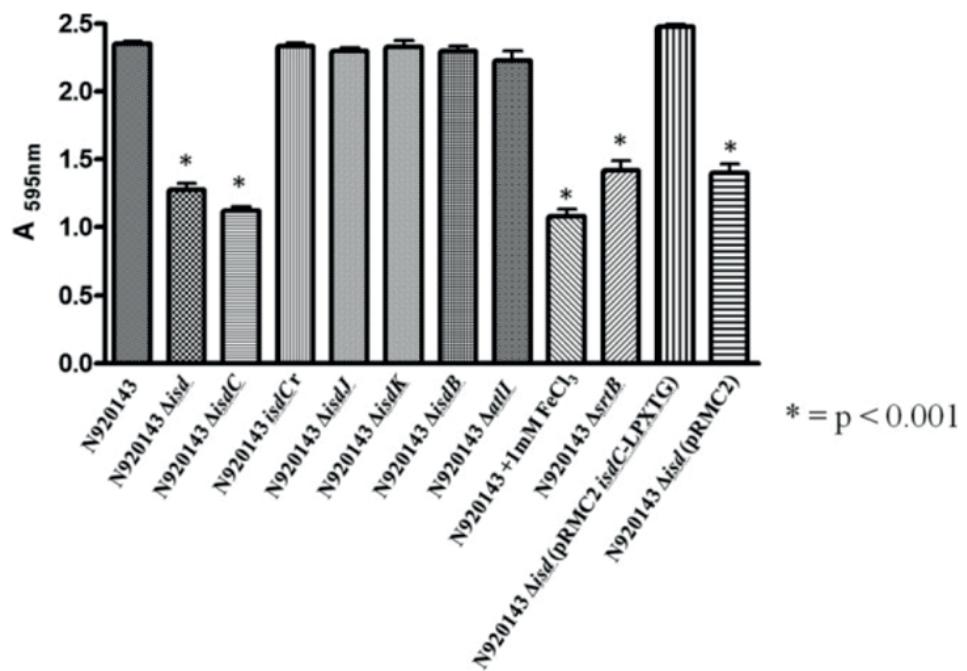


**Figure 62 : SrtB est requis pour la persistance de *S. aureus* pendant l'infection de l'hôte.**

Les mutants  $\Delta srtB$  sont défectueux dans la persistance des infections rénales des souris. Des souris Swiss-Webster ont reçu une injection intraveineuse de  $1 \times 10^7$  unités formant colonie (UFC) de l'isolat clinique Newman de *S. aureus* (■) ou du mutant  $\Delta srtB$  (SKM7) (●).

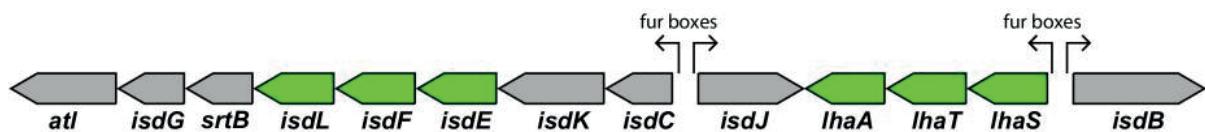
D'après Mazmanian *et al.*, 2002.

Le locus *isd* est un facteur qui facilite ainsi la survie et le développement de *S. lugdunensis* lorsqu'il se retrouve en condition de limitation en fer dans les tissus de l'hôte pendant l'infection. Compte tenu des besoins en fer, le rôle du système Isd dans la pathogénèse de *S. aureus* a été montré. La délétion du gène *isdA* chez *S. aureus* a été responsable d'une diminution de la capacité de colonisation de la peau humaine (Clarke *et al.*, 2007). IsdA diminue l'hydrophobie cellulaire bactérienne ce qui permet aux bactéries de résister aux acides gras et aux peptides bactéricides présents sur la peau (Clarke *et al.*, 2007). L'inactivation de IsdB chez *S. aureus* a entraîné une diminution de la charge bactérienne dans la rate, le cœur et les reins après une infection chez la souris (Pishchany *et al.*, 2009) (**Figure 61**). De plus, IsdB favorise l'adhésion et l'agrégation de *S. aureus* aux plaquettes puisque le mutant  $\Delta isdB$  était incapable d'adhérer aux plaquettes (Majlovic *et al.*, 2010). Ces résultats indiquent que la reconnaissance de l'hémoglobine par IsdB chez *S. aureus* est importante dans la pathogénicité de *S. aureus* (Pishchany *et al.*, 2009 ; Pishchany *et al.*, 2010). Aussi, la virulence des mutants délétés pour les gènes codant les hème-oxygénases de *S. aureus*, *isdG* et *isdI*, était diminuée comparée à celle de la souche sauvage dans un modèle murin de formation d'abcès (Reniere et Skaar, 2008). Les protéines IsdG et IsdI sont indépendamment requises pour une virulence totale de *S. aureus* au cours d'une infection ce qui suggère le système Isd comme cible d'une intervention thérapeutique (Reniere et Skaar, 2008). Par ailleurs, une étude a montré que la protéine IsdH facilitait la conversion de la protéine d'opsonine du complément C3b en iC3b permettant ainsi à *S. aureus* d'éviter la phagocytose par les neutrophiles (Visai *et al.*, 2009). Enfin, les sortases SrtA et SrtB exprimées par *S. aureus*, sont également décrites comme des facteurs de virulence. En effet, la virulence du mutant  $\Delta srtA$  de *S. aureus* était significativement diminuée dans un modèle d'abcès rénal murin par rapport à la souche sauvage (Mazmanian *et al.*, 2000). De plus, une réduction significative de la charge bactérienne des mutants  $\Delta srtB$  dans les reins infectés a été observée comparée à la souche sauvage (Mazmanian *et al.*, 2002) (**Figure 62**). SrtA semble être impliquée dans l'établissement initial de l'infection à *S. aureus*, alors que SrtB apparaît être nécessaire pour la persistance dans les tissus infectés.



**Figure 63 : Effet de la délétion du locus *isd* sur la formation de biofilm par *S. lugdunensis* dans des conditions limitantes en fer.**

D'après Missineo *et al.*, 2014.



**Figure 64 : Schéma de l'opéron *IhaSTA* et de l'opéron *isd* de *S. lugdunensis* N920143.**

Les séquences codantes, la direction de la transcription et les sites de liaison au régulateur Fur sont indiqués. Les transporteurs membranaires ABC sont représentés en vert.

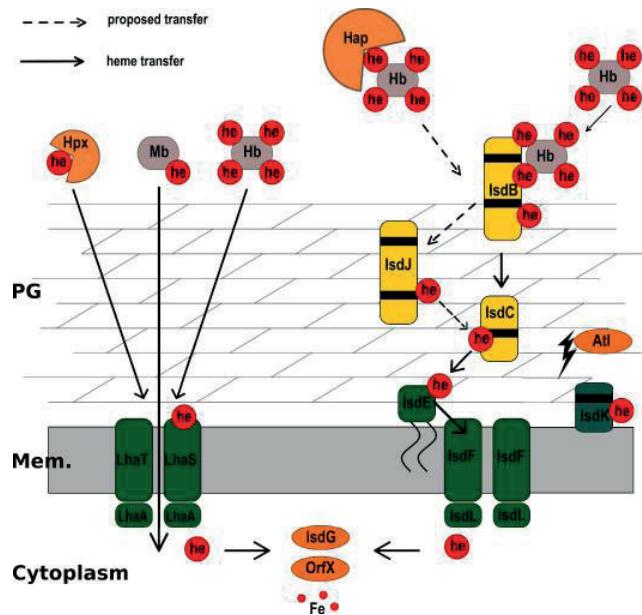
D'après Jochim *et al.*, 2020.

À ce jour, il existe peu d'études qui ont caractérisé un rôle supplémentaire du système Isd chez *S. lugdunensis*. Son implication dans la formation de biofilm, notamment par la protéine IsdC, a été montrée dans des conditions limitantes en fer (Missineo *et al.*, 2014). IsdC a été identifiée comme principal facteur responsable des interactions entre les cellules, de la formation et de l'accumulation de biofilm (Missineo *et al.*, 2014). Dans cette étude, les mutants délétés pour le locus, *isdC* et *srtB* n'étaient plus capables de former du biofilm (Missineo *et al.*, 2014) (**Figure 63**). A cet égard, le système Isd de *S. lugdunensis* peut être considéré comme un facteur de virulence puisque la formation de biofilm est une étape clé dans les infections staphylococciques liées aux dispositifs médicaux (Missineo *et al.*, 2014).

- **Le transporteur ABC de type ECF**

Pour assurer une acquisition continue du fer au sein de l'hôte, il existe d'autres systèmes qu'Isd permettant de capturer des molécules contenant du fer chez les Staphylocoques (Jochim *et al.*, 2020). Les transporteurs ABC de type ECF (Energy-Coupling Factor) sont des systèmes impliqués dans l'acquisition des nutriments présents à l'état de trace. Ces transporteurs ECF sont membranaires et hautement hydrophobes, et possèdent une affinité élevée pour leurs substrats ce qui leur permet de piéger de très petites quantités dans l'environnement (Jochim *et al.*, 2020). Un certain nombre de molécules ont été identifiées comme substrats des transporteurs ECF mais la capacité de tels systèmes à acquérir le fer a uniquement été découverte chez *S. lugdunensis* (Jochim *et al.*, 2020).

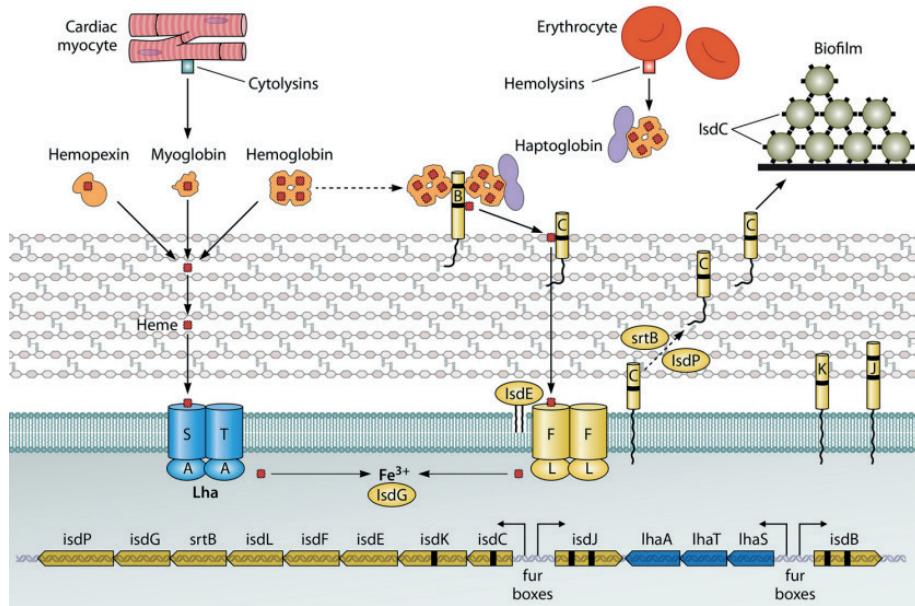
Un transporteur ECF nommé LhaSTA a été retrouvé dans le génome de *S. lugdunensis* (Jochim *et al.*, 2020). L'opéron *lhaSTA* (*lugdunensis* heme acquisition) est situé dans l'opéron *isd* de *S. lugdunensis* et code les 3 gènes du transporteur ABC putatif qui sont localisés entre les gènes *isdJ* et *isdB* (Jochim *et al.*, 2020) (**Figure 64**). L'analyse de ces 3 gènes a permis de les identifier comme des composants d'un transporteur ECF dont le gène *lhaS* code une sous-unité de spécificité, le gène *lhaT* code une sous-unité transmembranaire et le gène *lhaA* code une ATPase (Jochim *et al.*, 2020). Un motif Fur-box a été découvert en amont du gène *lhaS* ce qui indique une possible régulation médiée par le régulateur Fur. La régulation de l'expression de *lhaSTA* fonction de la présence de fer a été confirmée par une analyse de PCR quantitative (qPCR) révélant la surexpression des gènes *lhaS* et *lhaA* en condition de limitation en fer en utilisant un chélateur de fer (Ethylene Diamine Diortho Hydrophenyl Acid, nommé EDDHA) (Jochim *et al.*, 2020).



**Figure 65 : Modèle d'acquisition d'hème par le système LhaSTA et le système Isd chez *S. lugdunensis*.**

Les transporteurs membranaires ABC (vert), les protéines Isd ancrées à la paroi (jaune) et les motifs NEAT (cases noires) sont indiqués. He : hème ; hb : hémoglobin ; PG : peptidoglycane ; Mem : membrane ; Hap : haptoglobine ; Hpx : hémopexine ; Atl : autolysine.

D'après Jochim *et al.*, 2020.



**Figure 66 : Les systèmes d'acquisition de fer à partir de l'hème chez *S. lugdunensis*.**

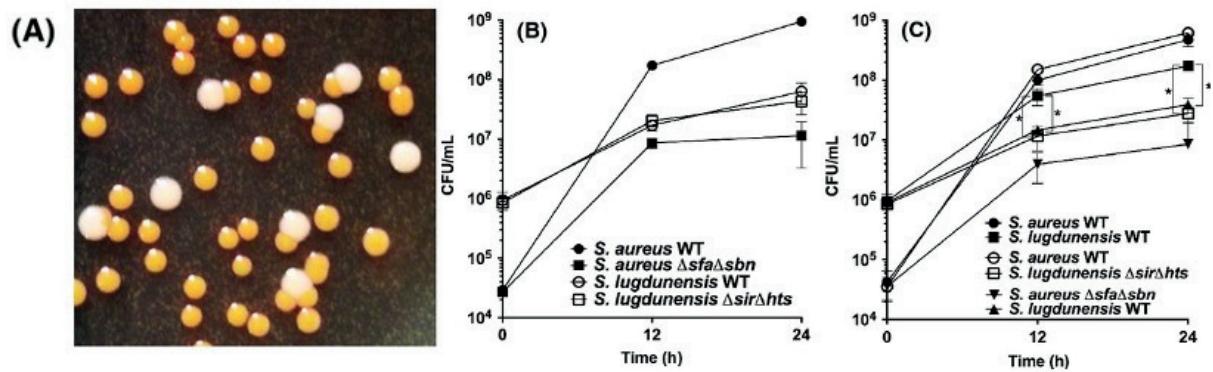
Les protéines Isd (côté droit) et les protéines Lha (côté gauche) sont représentées. Les hémoprotéines sont schématisées avec leurs molécules d'hème liées (rectangles rouges). Les tirets noirs dans les gènes et les protéines indiquent les domaines NEAT.

D'après Heilbronner et Foster, 2021.

Ce système LhaSTA apparaît donc impliqué dans l'acquisition du fer spécifique de l'hème. En effet, la protéine LhaS est capable de se lier à l'hème présent dans plusieurs hémoprotéines de l'hôte telles que l'hémoglobine, la myoglobine et l'hémopexine, et permet l'accumulation du fer dans le cytoplasme (Jochim *et al.*, 2020). Ce nouveau système représente ainsi une nouvelle stratégie pour surmonter la limitation nutritionnelle en fer chez *S. lugdunensis* lors d'une infection. L'expression du transporteur LhaSTA a permis la prolifération de *S. lugdunensis* en présence de cellules humaines telles que les érythrocytes et les myocytes cardiaques comme seule source de fer ce qui suggère fortement que ce système peut utiliser ces cellules de l'hôte pour acquérir du fer lors d'une maladie invasive (Jochim *et al.*, 2020).

Par ailleurs, l'étude a mis en évidence que la fonction de LhaSTA était indépendante du système Isd. Une souche de *S. lugdunensis* exprimant les gènes *lhaSTA* et déficiente du locus *isd* était capable de se lier à l'hème de plusieurs hémoprotéines (Jochim *et al.*, 2020). Ce résultat indique que le transporteur LhaSTA possède une gamme de substrats hémoprotéiques qui diffère de celle du système Isd, ce qui permet à *S. lugdunensis* de surmonter la restriction nutritionnelle en fer (Jochim *et al.*, 2020) (**Figure 65**).

Les auteurs supposent que ce nouveau système d'acquisition de nutriments pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse bactérienne et dans la résistance aux défenses immunitaires de l'hôte, cependant des expériences complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de ces transporteurs dans la limitation en fer. Jusqu'à présent, *S. lugdunensis* est le seul staphylocoque qui possède, en plus du système Isd, un transporteur ABC de type ECF également impliqué dans l'acquisition de l'hème (**Figure 66**). Comme nous le verrons dans la suite de notre travail, un autre transporteur ECF apparaît fortement induit en situation de carence en fer. Il sera donc nécessaire par la suite de déterminer si ces transporteurs ECF sont présents chez d'autres agents pathogènes bactériens (Jochim *et al.*, 2020).



**Figure 67 : Les sidérophores produits par *S. aureus* peuvent améliorer la croissance de *S. lugdunensis* en condition restreinte en fer.**

A : Photo de colonies de *S. aureus* RN6390 (grande et blanche) et *S. lugdunensis* (plus petite et jaune).

B : Courbes de la croissance des souches (individuelle) dans du C-TMS + 20 % de sérum.

C : Courbes de la croissance des souches en cocultures.

D'après Brozyna *et al.*, 2014.

### 3.2.2. Acquisition du fer indépendante de l'hème

Chez l'hôte, le fer extracellulaire peut également être complexé à des protéines telles que la transferrine, la lactoferrine et la ferritine, qui représentent des cibles potentielles pour les sidérophores afin de récupérer le fer (Hammer et Skaar, 2011). La production de sidérophores « piégeurs de fer » est une autre stratégie mise en place par les bactéries pour acquérir du fer. Les sidérophores sont de petites molécules possédant une forte affinité pour le fer. *S. aureus* a la capacité de produire et de sécréter deux sidérophores nommés staphyloferrine A et staphyloferrine B (Hammer et Skaar, 2011). Les gènes impliqués dans la biosynthèse et l'importation de ces deux sidérophores sont régulés par le régulateur Fur et sont donc pleinement exprimés dans des conditions de limitation en fer (Lindsay et Riley, 1994). Chez *S. aureus*, il a été montré que les staphyloferrines A et B sont importantes pour l'acquisition du fer et qu'elles représentent le mécanisme dominant par lequel *S. aureus* capture le fer lié à la transferrine (Park *et al.*, 2005).

Malgré l'absence de production de staphyloferrines chez *S. lugdunensis*, il est à noter que *S. lugdunensis* est doté de transporteurs fonctionnels permettant leur absorption et leur acquisition. Cela amène à supposer que *S. lugdunensis* peut « s'approprier » des staphyloferrines produites par d'autres espèces staphylococciques pour son propre métabolisme (Brozyna *et al.*, 2014). Une étude a montré que la croissance de *S. lugdunensis* dans des conditions de limitation en fer était significativement améliorée lorsqu'il était en coculture avec *S. aureus* grâce à la présence dans son génome de *htsABC* et *sirABC* (possédant des motifs Fur-box dans les régions promotrices) qui fonctionnent comme des transporteurs pour la staphyloferrine A et la staphyloferrine B (Brozyna *et al.*, 2014) (**Figure 67**).

De plus, *S. lugdunensis* possède dans son génome un gène codant un transporteur ABC de type ferrichrome FhuD qui est décrit comme un récepteur pour les sidérophores hydroxamates (Lebeurre *et al.*, 2019). La protéine FhuD, connue pour favoriser l'importation du ferrisidérophore chez *S. aureus* (Beasley *et al.*, 2009) et faciliter l'absorption de l'hème dans le sang et le sérum (Malachowa *et al.*, 2011), pourrait donc être impliquée dans l'acquisition du fer par *S. lugdunensis*.

L'analyse génomique a également permis d'identifier chez *S. lugdunensis* la présence des gènes codant le système d'acquisition des sidérophores catécholates Sst et ce locus a été retrouvé en duplication chez 20 des 21 isolats cliniques de *S. lugdunensis* étudiés (Lebeurre *et al.*, 2019). L'ensemble de ces résultats suggèrent que *S. lugdunensis* pourrait acquérir du fer à partir des hormones de l'hôte comme l'épinéphrine, mais cette hypothèse reste à être démontrée expérimentalement (Heilbronner et Skaar, 2021).



# TRAUX EXPÉRIMENTAUX



# 1. LES OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE

Les axes de recherche au sein du laboratoire U2RM portent essentiellement sur l'étude des pathogènes à Gram positif tels que les entérocoques et les staphylocoques, issus des maladies humaines ou animales (notamment les équidés), ainsi que sur la compréhension des mécanismes de résistance aux antibiotiques et le développement de traitements alternatifs des pathogènes résistants aux antibiotiques.

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de mon stage de Master 2, réalisé au laboratoire dont le sujet concernait l'étude de la virulence de *S. lugdunensis* en modèle *Galleria mellonella* et la construction du mutant du régulateur transcriptionnel AgrA. Dans le but de poursuivre ce travail, le projet doctoral sur l'étude des facteurs d'opportunisme chez *S. lugdunensis* a été entrepris.

Le premier objectif était de poursuivre la construction des mutants  $\Delta agrA$  et  $\Delta ARNIII$  de *S. lugdunensis*, codant des régulateurs potentiellement impliqués dans la virulence staphylococcique, et de les caractériser phénotypiquement. Ensuite, afin d'identifier les membres du régulon AgrA et du régulon ARNIII, des analyses transcriptomique et protéomique ont été effectuées.

Le deuxième objectif était d'évaluer l'impact de la limitation en fer sur l'expression de la pathogénicité de *S. lugdunensis* qui représente un stress rencontré par les bactéries pendant l'infection. La réponse à cette carence a été étudiée par des approches phénotypique, transcriptomique et protéomique.

Ces deux thématiques de recherche s'inscrivent dans l'objectif de mieux comprendre le caractère opportuniste de ce CoNS responsable d'infections graves.



## 2. LES TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

### 2.1. Étude du régulateur transcriptionnel AgrA de *S. lugdunensis*

#### 2.1.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude

Au cours de l'infection, les bactéries pathogènes doivent moduler l'expression de leurs facteurs de virulence, dans le but d'assurer principalement la colonisation et la survie dans l'hôte (Cheung *et al.*, 2004 ; Novick, 2003). Ces facteurs de virulence sont sous le contrôle d'un réseau complexe de régulation qui permet aux bactéries pathogènes de s'adapter rapidement à leur environnement (Novick, 2003).

*S. lugdunensis* est décrit comme un commensal de la peau humaine qui appartient au groupe des CoNS, cependant il se distingue des autres espèces de CoNS car il est responsable de nombreuses infections similaires à celles provoquées par *S. aureus* (Liu *et al.*, 2010 ; Parthasarathy *et al.*, 2020). *S. lugdunensis* est considéré comme l'espèce la plus agressive parmi les CoNS (Heilbronner et Foster, 2021). Plusieurs facteurs de virulence ont été caractérisés chez *S. lugdunensis* dont le système Isd qui permet d'acquérir du fer nutritionnel et qui est impliqué dans la formation de biofilm, la virulence et la résistance au stress oxydatif (Aubourg *et al.*, 2020 ; Aubourg *et al.*, 2021). La capacité à survivre et à s'adapter aux différents stress rencontrés lors de l'entrée dans l'hôte est un élément qui permet aux bactéries de persister et devenir pathogène. La régulation des mécanismes de réponse aux stress est en partie orchestrée par des régulateurs transcriptionnels. Le seul système de régulation étudié expérimentalement chez *S. lugdunensis* est le système à deux composants LytSR qui joue un rôle dans la pathogénèse de *S. lugdunensis* en raison de son implication dans la formation de biofilm et dans l'expression de certains facteurs de virulence (Dahyot *et al.*, 2020).

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2 de l'introduction, un des systèmes majeurs de régulation de la virulence caractérisé chez *S. aureus* est le système Agr qui est composé d'un système de QS et un système classique à deux composants (Novick *et al.*, 1995). Le locus *agr* comprend deux transcrits divergents, *ARNII* et *ARNIII*, qui sont sous le contrôle des promoteurs P2 et P3, respectivement (Novick *et al.*, 1995). L'*ARNII* est un opéron composé de 4 gènes dont les gènes *agrBD* codent le QS et les gènes *agrCA* codent le système à deux composants (Novick *et al.*, 1995).



AgrA est un régulateur transcriptionnel qui régule positivement les gènes codant les PSM et négativement des gènes du métabolisme (Queck *et al.*, 2008). L'ARNIII est un ARN régulateur impliqué dans la régulation positive des facteurs de virulence et dans la régulation négative des gènes codant les protéines de surface et d'adhésion (Boisset *et al.*, 2007).

Le système Agr de *S. lugdunensis* possède 63 % d'homologie de séquence avec celui de *S. aureus* et ces deux systèmes présentent une organisation génétique similaire (Vandenesh *et al.*, 1993b). Comparé à *S. aureus*, l'ARNIII de *S. lugdunensis* ne possède pas le gène *hld* (Sakinc *et al.*, 2004). A cet égard, l'activité hémolytique chez *S. lugdunensis* est conférée par l'action de trois peptides Slush codés par l'opéron *slushABC* (Donvito *et al.*, 1997a). À noter que l'absence du gène *hld* dans l'ARNIII de *S. lugdunensis* n'a pas modifié la capacité de l'ARNIII à exercé sa fonction d'ARN régulateur puisqu'il a été capable d'induire l'expression des gènes de virulence et la production de plusieurs exoprotéines régulées par le système Agr dans un mutant  $\Delta agr$  de *S. aureus* (Benito *et al.*, 1998).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'étudier expérimentalement le rôle du régulateur transcriptionnel AgrA de *S. lugdunensis*. La stratégie a été de construire le mutant de délétion pour le gène *agrA* dans la souche de *S. lugdunensis* N920143 et de réaliser une caractérisation phénotypique de ce mutant par comparaison avec la souche sauvage.

De nombreux tests phénotypiques ont été menés et les effets majeurs de la délétion du gène codant le régulateur AgrA furent observés au niveau de la pigmentation des colonies, la formation de biofilm, la survie en macrophages de souris, et la résistance aux stress osmotique et oxydatif.



Les résultats ont en effet révélé que la souche sauvage *S. lugdunensis* N920143 était capable de synthétiser naturellement un pigment jaune qui confère une coloration légèrement dorée des colonies tandis que les colonies du mutant  $\Delta agrA$  sont apparues nettement plus blanches. La formation de biofilm a été évaluée par la technologie de microscopie 3D et par la méthode du crystal violet. Ces deux approches ont permis d'observer un biofilm plus important, plus dense et plus volumineux pour la souche sauvage que pour le mutant  $\Delta agrA$ . Ce résultat montre un impact différent d'AgrA sur la capacité à former un biofilm comparé à *S. aureus* où un mutant de ce régulateur a produit plus de biofilm que la souche sauvage (Vuong *et al.*, 2000). Des tests de survie en macrophages après infection de souris ont été utilisés pour étudier la virulence. Nos données ont révélé un nombre moins important de cellules du mutant  $\Delta agrA$  récupérées dans les macrophages murins par rapport à la quantité de cellules de la souche sauvage. Cette observation semble étroitement corrélée à la diminution de la résistance au stress oxydatif également observée chez le mutant  $\Delta agrA$ . En effet, en présence de 0,4 mM d' $H_2O_2$ , la phase de latence du mutant  $\Delta agrA$  est significativement augmentée par rapport à celle de la souche sauvage. De plus, en présence de 1 mM d' $H_2O_2$ , le taux de survie du mutant  $\Delta agrA$  était significativement diminué par rapport à celui de la souche sauvage. La résistance au stress osmotique a également été étudiée. En présence de 10 % de NaCl, la croissance du mutant  $\Delta agrA$  a été plus impactée par rapport à celle de la souche sauvage.

Dans le but d'étudier l'impact moléculaire de la délétion du gène *agrA*, des études de protéomique et de transcriptomique globales ont été effectuées par spectrométrie de masse et par RNA-seq (séquençage du transcriptome), respectivement.

Parmi les 2368 protéines potentiellement codées dans le génome de *S. lugdunensis*, l'analyse protéomique a révélé une différence de production significative (Fold-Change FC > 2 et *p*-value < 0,05) pour 162 protéines dont 78 étaient plus produites et 84 étaient moins abondantes. La délétion du gène *agrA* a eu un impact sur des protéines impliquées dans divers métabolismes (énergie, acides nucléiques, acides aminés, nitrates) ainsi que des protéines de stress. Fait intéressant, les protéines identifiées comme les plus surproduites dans le mutant  $\Delta agrA$  sont l'autolysine, la protéine B du transport du fer ferreux et la protéine de stress CspC. En revanche, les protéines qui ont été retrouvées de façon moins abondante dans le mutant  $\Delta agrA$  sont des enzymes impliquées dans la réponse au stress (Asp23, AmaP, Clp, OpuC) et notamment dans le stress oxydatif (MsrA, MsrB et KatA).



L'analyse transcriptomique a permis d'identifier le régulon AgrA de *S. lugdunensis*. L'inactivation du gène *agrA* a affecté de manière significative ( $-1 > \log_2 \text{FC} > 1$ ) l'expression de 400 gènes. Parmi eux, 149 gènes étaient surexprimés et 251 étaient réprimés. La majorité des gènes dérégulés a été identifié comme étant impliquée dans le métabolisme, le transport, et la régulation transcriptionnelle. Il est intéressant de noter que la délétion du gène *agrA* a montré un impact important sur la régulation des gènes impliqués dans la réponse au stress et la virulence de *S. lugdunensis*. Ainsi, l'expression des gènes *katA*, *sodA* et *coADR*, impliqués dans la résistance au stress oxydatif liée à la détoxification des ERO, est apparue significativement diminuée dans le mutant  $\Delta\text{agrA}$ . De même, les gènes liés à la synthèse de la bêtaïne connue pour être importante dans l'osmoprotection (Vijaranakul *et al.*, 1995) étaient également dérégulés chez le mutant  $\Delta\text{agrA}$ . Les gènes *crtM* et *crtN*, qui codent des enzymes responsables de la synthèse des pigments caroténoides impliqués dans la résistance aux ERO (Xue *et al.*, 2019), sont apparus significativement réprimés dans le mutant  $\Delta\text{agrA}$ . Des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer sont apparus régulés positivement par AgrA. Par ailleurs, l'analyse transcriptomique a révélé que l'expression de certains facteurs de virulence chez *S. lugdunensis* était sous le contrôle du régulateur AgrA, notamment la répression du gène *isaA* et des gènes de l'opéron *lug* et l'induction des gènes *slushABC* et du gène *asp23* dans le mutant  $\Delta\text{agrA}$ .

Comme nous l'attendions, la transcription de l'*ARNIII* est apparue réduite dans le mutant  $\Delta\text{agrA}$  et il était légitime de supposer que les phénotypes observés chez le mutant  $\Delta\text{agrA}$  pouvaient résulter de la dérégulation de l'*ARNIII*. La stratégie a été de construire le mutant déléte pour le gène *ARNIII* de *S. lugdunensis* et de réaliser les mêmes études expérimentales que celles effectuées avec le mutant  $\Delta\text{agrA}$ . De façon surprenante, aucune différence phénotypique et aucune modification dans le profil protéomique n'ont été observées dans le mutant  $\Delta\text{ARNIII}$  comparé à la souche sauvage.

La dérégulation des 400 gènes observée dans le mutant  $\Delta\text{agrA}$  n'est probablement pas directement médiée par le régulateur AgrA d'autant que l'expression de 20 régulateurs transcriptionnels a été modifiée (9 surexprimés et 11 sous-exprimés) dans le mutant  $\Delta\text{agrA}$ . Dans le but d'identifier les cibles directes du régulateur AgrA, le motif de liaison d'AgrA (WMMGTTNRK) (Nikolskaya et Galperin, 2002) a été recherché dans les régions promotrices des 400 gènes dérégulés identifiés par l'analyse transcriptomique. Celui-ci a été retrouvé en amont de 48 cadres ouverts de lecture dont les gènes *isdB*, *cspC*, *slushA* et un gène codant un transporteur de type osmoprotecteur. Comme attendu, le motif de liaison AgrA a été retrouvé dans la région intergénique entre le locus *agr* et l'*ARNIII*.



L'ensemble de ces données a permis de conclure que *S. lugdunensis* possède un système Agr qui lui permet de modifier l'expression de ses gènes afin d'être plus virulent, d'induire la formation de biofilm et de s'adapter aux stress environnementaux, notamment les stress osmotique et oxydatif. Cette étude a mis en évidence l'importance du régulateur AgrA dans le comportement opportuniste de *S. lugdunensis* et peut être envisagé comme une cible thérapeutique intéressante pouvant interférer avec la pathogénicité des staphylocoques.

Les résultats de ce travail ont été valorisés par la présentation d'un poster scientifique à l'European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) en juillet 2021 ([Annexe 1](#)) ainsi que d'une communication orale au congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM) en septembre 2021 ([Annexe 2](#)).

Ce travail fait l'objet d'un article scientifique, actuellement en cours de soumission dans le journal « *Microbiology Spectrum* ».



### 2.1.2. Publication n°1

**Inactivation of the response regulator AgrA has a pleiotropic effect on biofilm formation, pathogenesis and stress response in *Staphylococcus lugdunensis*.**

Marion Aubourg, Marine Pottier, Albertine Léon, Benoit Bernay, Anne Dhalluin, Margherita Cacacie, Riccardo Torellie, Pierre Ledormand, Cecilia Martini, Maurizio Sanguinetti, Michel Auzou, François Gravey, Jean-Christophe Giard. En cours de soumission dans le journal « Microbiology Spectrum ».



1       **Inactivation of the response regulator AgrA has a pleiotropic effect on biofilm**  
2       **formation, pathogenesis and stress response in *Staphylococcus lugdunensis***

3

4       Running title: Role of AgrA in *Staphylococcus lugdunensis*

5

6       Marion Aubourg<sup>a</sup>, Marine Pottier<sup>b,c</sup>, Albertine Léon<sup>a,c</sup>, Benoit Bernay<sup>d</sup>, Anne Dhalluin<sup>a</sup>,  
7       Margherita Cacaci<sup>e</sup>, Riccardo Torelli<sup>e</sup>, Pierre Ledormand<sup>f</sup>, Cecilia Martini<sup>e</sup>, Maurizio  
8       Sanguinetti<sup>e</sup>, Michel Auzou<sup>g</sup>, François Gravey<sup>b</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>a\*</sup>

9

10      <sup>a</sup>Université de Caen Normandie, EA4655 U2RM (équipe «Antibio-résistance»), 14033 Caen,  
11      France

12      <sup>b</sup>Université de Caen Normandie, GRAM 2.0, CHU de Caen, Service de Microbiologie, 14033  
13      Caen, France

14      <sup>c</sup>LABÉO Frank Duncombe, 14053 Caen, France

15      <sup>d</sup>Plateforme Proteogen SFR ICORE 4206, Université de Caen Normandie, 14032 Caen, France,

16      <sup>e</sup>Catholic University of Sacred Heart, Institute of Microbiology, L. go F. Vito 1, 00168 Rome,  
17      Italy

18      <sup>f</sup>Université de Caen Normandie, ABTE, 14032 Caen, France.

19      <sup>g</sup>CHU de Caen, Laboratoire de Microbiologie, 14033 Caen, France

20

21      \*Corresponding author

22      E-mail: [jean-christophe.giard@unicaen.fr](mailto:jean-christophe.giard@unicaen.fr)

23

24      **Keywords:** *Staphylococcus lugdunensis*, AgrA, transcriptional regulation, *agr* system

25

26

27 **ABSTRACT**

28

29 *Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative *Staphylococcus* that emerges as an  
30 important opportunistic pathogen. However, little is known about the regulation underlying the  
31 transition from commensal to virulent state. Based on knowledge of *S. aureus* virulence, we  
32 suspected that the *agr* quorum sensing system may be an important determinant for the  
33 pathogenicity of *S. lugdunensis*. We investigated the functions of the transcriptional regulator  
34 *AgrA* using the *agrA* deletion mutant. *AgrA* played a role in cell pigmentation:  $\Delta$ *argA* mutant  
35 colonies were white while the parental strains were slightly yellow. Compared to the wild-type  
36 strain, the  $\Delta$ *argA* mutant was affected in its ability to form biofilm and was less able to survive  
37 in mice macrophages. Moreover, the growth of  $\Delta$ *agrA* was significantly reduced by the addition  
38 of 10 % NaCl or 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and its survival after 2 h in presence of 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was more  
39 than 10-fold reduced. To explore the mechanisms involved beyond these phenotypes, the  $\Delta$ *agrA*  
40 proteome and transcriptome were characterized by mass spectrometry and RNA-Seq. We found  
41 that *AgrA* controlled several virulence factors as well as stress-response factors, which are well  
42 correlated with the reduced resistance of the  $\Delta$ *agrA* mutant to osmotic and oxidative stresses.  
43 These results were not the consequence of the deregulation of RNAIII of the *agr* system, since  
44 no phenotype or alteration of the proteomic profile has been observed for the  $\Delta$ RNAIII mutant.  
45 Altogether, our results highlighted that the *AgrA* regulator of *S. lugdunensis* played a key role  
46 in its ability to become pathogenic.

47

48 **IMPORTANCE**

49 Although belonging to the natural human skin flora, *Staphylococcus lugdunensis* is recognized  
50 as a particularly aggressive and destructive pathogen. This study aimed to characterize the role  
51 of the response regulator AgrA, which is a component of the quorum-sensing *agr* system and  
52 known to be a major element in the regulation of pathogenicity and biofilm formation in  
53 *Staphylococcus aureus*. In the present study, we showed that, contrary to *S. aureus*, the *agrA*  
54 deletion mutant produced less biofilm. Inactivation of *agrA* conferred a white colony phenotype  
55 and impacted *S. lugdunensis* in its ability to survive in mice macrophages and to cope with  
56 osmotic and oxidative stresses. By global proteomic and transcriptomic approaches, we  
57 identified the AgrA regulon, bringing molecular bases underlying the observed phenotypes.  
58 Together, our data showed the importance of AgrA in the opportunistic pathogenic behavior of  
59 *S. lugdunensis* allowing it to be considered as an interesting therapeutic target.

60

61 **INTRODUCTION**

62       Thanks to gene regulatory networks, pathogenic bacteria can rapidly adapt to their  
63 environment and modulate the expression of virulence-associated factors. First described in  
64 *Staphylococcus aureus*, the *agr* locus (for accessory gene regulator) combines a classical two-  
65 component system and a quorum-sensing system (1, 2). In addition, it plays a role in the  
66 regulation of virulence factors and metabolism genes (3, 4). This *agr* locus comprises two  
67 divergent transcripts, RNAII and RNAIII, driven by the P2 and P3 promoters, respectively (5).  
68 RNAII is an operon that encodes four genes (*agrBDCA*), within *agrB* and *agrD* genes are  
69 involved in quorum-sensing while *agrC* and *agrA* genes constitute the two-component system.  
70 The *agr* system appears conserved throughout the *Staphylococcus* genus, but sequence  
71 variations are mainly present in the *agrB*, *agrD*, and *agrC* genes whereas the *agrA* sequence is  
72 much more conserved (6). AgrD is the precursor of the auto-inducing peptide (AIP) which is  
73 secreted by the membrane protein AgrB. The accumulation of AIP in the extracellular matrix  
74 is detected by the transmembrane histidine kinase AgrC, which in turn induces the activation  
75 of the transcriptional regulator AgrA by phosphorylation (5, 7). Phosphorylated AgrA, via its  
76 C-terminal LytTR domain, recognizes imperfect direct repeats of DNA with a consensus  
77 sequence (TA)(AC)(CA)GTTN(AG)(TG) located in the intergenic region between the P2 and  
78 P3 promoters (8). In addition to the regulation of its own promoter (P2) and RNAIII, AgrA  
79 directly regulates transcription of genes encoding phenol-soluble modulin (PSM) peptides as  
80 well as *bsaA* encoding the glutathione peroxidase, essential for *S. aureus* resistance to oxidative  
81 stress (9, 10). A study on gene expression also showed the important role of the *agr* locus in  
82 the control of catabolic pathways, nutrient uptake, and energy metabolism (4). RNAIII is a  
83 pleiotropic effector that upregulates transcription of most extracellular protein genes and  
84 downregulates the transcription of many surface protein genes (7, 11). In *S. aureus*, the RNAIII  
85 transcript contains the *hld* gene encoding the delta-hemolysin which is an important virulence  
86 factor of *S. aureus* (7, 12).

87       *S. lugdunensis* is a coagulase-negative staphylococci (CoNS) that is part of the  
88 commensal human skin flora but is distinguished from other CoNS species due to its ability, as  
89 *S. aureus*, to cause many infections such as acute endocarditis, skin and soft-tissue infections,  
90 pneumonia, meningitis and osteoarticular infections (13, 14). It is probably the most aggressive  
91 CoNS species and several virulence factors have been characterized (15). Likewise, *S.*  
92 *lugdunensis* is well-equipped for the acquisition of nutritional iron, which has been shown to  
93 be crucial for biofilm formation, virulence, and resistance to oxidative stress (16, 17). This *a*  
94 *priori* harmless commensal CoNS should therefore be regarded as an opportunistic pathogen.

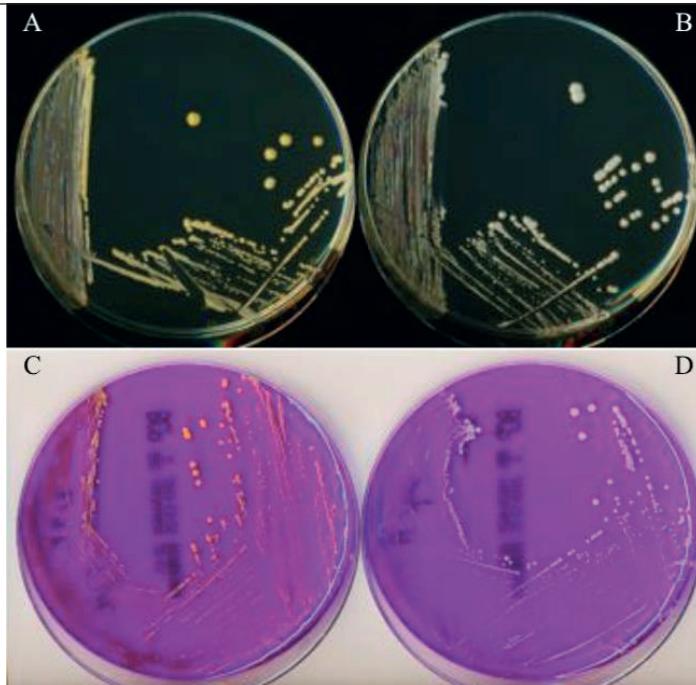
95 In this context, the regulation of immune system evasion and stress response mechanisms  
 96 orchestrated by transcriptional regulators constitutes the keys to explain the ambivalence of this  
 97 species. LytSR is the only regulatory system that has been experimentally studied in *S.*  
 98 *lugdunensis* (18). This two-component system appeared implicated in pathogenesis likely due  
 99 to its involvement in biofilm formation and the control of the transcription of virulence factors  
 100 such as fibrinogen-binding protein (Fbl), autolysin (Atl), and the type VII secretion system (18).  
 101 The *agr* locus of *S. lugdunensis* has a genomic organization similar to that of *S. aureus*, with  
 102 63 % sequence homology, and with a highly conserved intergenic region comprising the P2 and  
 103 P3 promoters (19). Interestingly, the *hld* gene is in the RNAIII transcript in most staphylococci  
 104 except *S. lugdunensis* and *S. saprophyticus* (20, 21). Therefore, the synergistic hemolytic  
 105 activity is generated by three peptides encoded by the *slushABC* locus in *S. lugdunensis* (22).  
 106 However, the absence of the *hld* gene did not alter the ability of *S. lugdunensis* RNAIII to  
 107 function as a regulatory molecule since it was able to induce transcriptional and phenotypic  
 108 complementation of several *agr*-regulated exoproteins in an *S. aureus* *agr* mutant (23).

109 Based on these data, the present study aimed to investigate the role of the transcriptional  
 110 regulator ArgA in *S. lugdunensis*. We constructed the  $\Delta agrA$  deletion strain of *S. lugdunensis*  
 111 N920143 and showed that this mutation had an impact on cell pigmentation, biofilm formation,  
 112 oxidative and osmotic stress responses, and survival in mice macrophages. Additionally, to  
 113 identify the AgrA regulon and molecular determinants underlying these phenotypes, we  
 114 performed a comprehensive proteomic study and genome-wide analysis by mass spectrometry  
 115 and RNA-seq, respectively.

116

## 117 RESULTS

118 **Phenotypic characterization of *S. lugdunensis* N920143  $\Delta agrA$  mutant.** To  
 119 investigate the role of AgrA of *S. lugdunensis*, the corresponding deletion mutant was  
 120 constructed and phenotypically analyzed. First,  $\Delta agrA$  mutant and its parental strains displayed  
 121 the same growth curves under standard condition at 37 °C in Brain Heart Infusion (BHI) as well  
 122 as the same antimicrobial susceptibility profiles (data not shown). In addition, transmission  
 123 electron microscopy of cells harvested at the onset of stationary phase and after 24 h did not  
 124 reveal any morphological difference between wild type (WT) and mutant strains (data not  
 125 shown). *S. lugdunensis* N920143 naturally synthetizes slight yellow pigment which  
 126 macroscopically colors the colonies, and surprisingly, the  $\Delta agrA$  mutant colonies appeared  
 127 clearly whiter on Tryptic Soy (TS) (Fig. 1A-B) as well as on BromoCresol Purple (BCP) agar  
 128 (Fig. 1C-D).



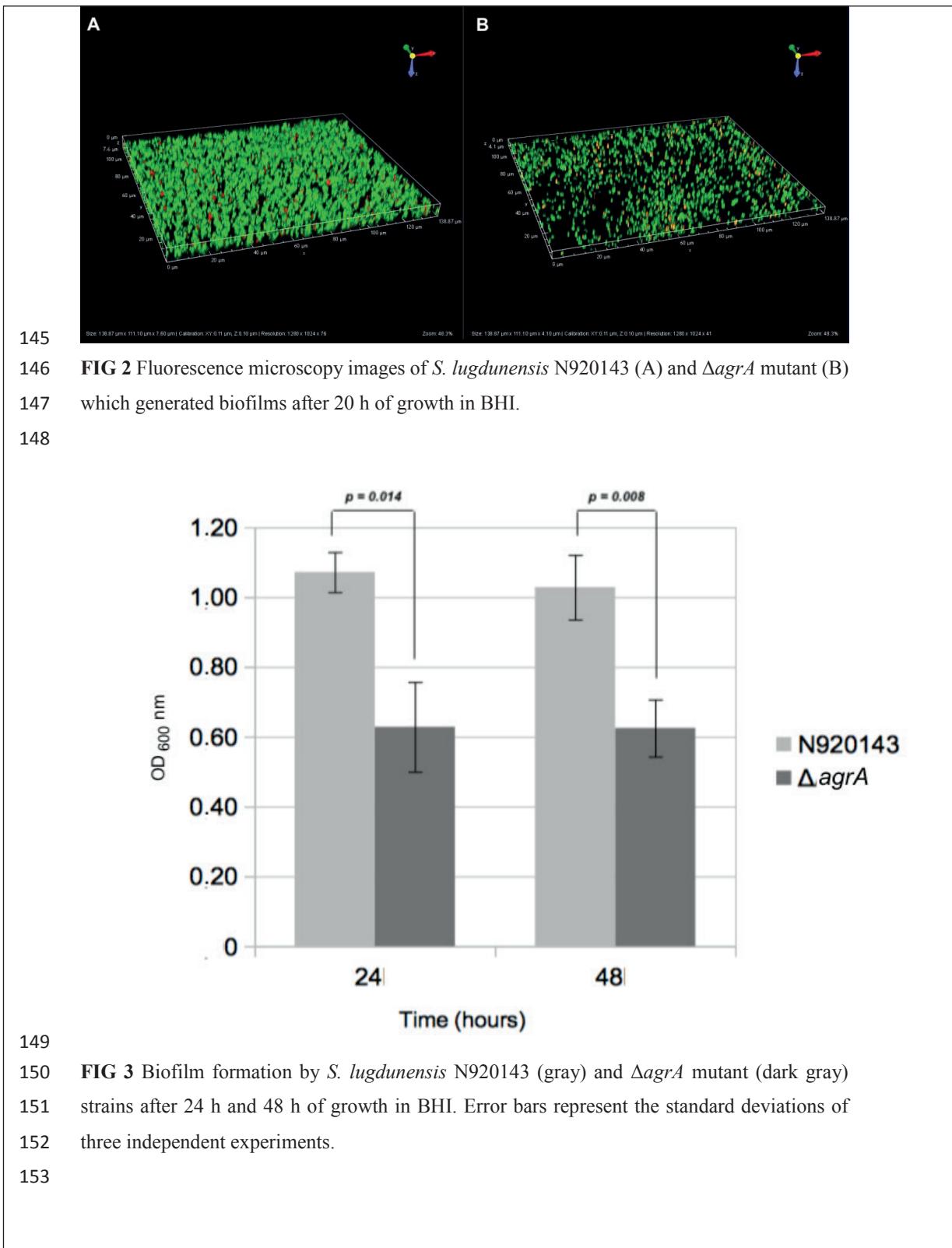
129

130 **FIG 1** Pigmentation of the bacterial colonies of *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta$ *agrA* mutant  
131 strains. A-C: Yellow colonies of the *S. lugdunensis* N920143 strain after 24 hours of incubation  
132 on TS (A) and BCP (C) agar. B-D: White colonies of the  $\Delta$ *agrA* mutant after 24 hours of  
133 incubation on TS (B) and BCP (D) agar.

134

135 Because the quorum-sensing system contributes to the synchronization of mechanisms  
136 leading to biofilm formation (2, 3), we analyzed the role of the AgrA regulator in this  
137 phenotype. By 3D-microscopy technology, we observed that the biofilm produced by the WT  
138 strain was obviously denser (Fig. 2A) than that produced by the  $\Delta$ *agrA* mutant of *S. lugdunensis*  
139 (Fig. 2B). Based on three independent experiments, means quantifications of the biofilm  
140 volumes were  $16,707 \mu\text{m}^3$  and  $2,402 \mu\text{m}^3$  for the WT and the mutant strains, respectively ( $p =$   
141 0.037). To confirm the reduced ability of the  $\Delta$ *agrA* mutant to produce biofilm, we showed that,  
142 after one or two days in BHI, the  $\Delta$ *agrA* mutant produced half less biofilm in polypropylene  
143 microtiter plates than its parental strain by measuring crystal violet staining (Fig. 3).

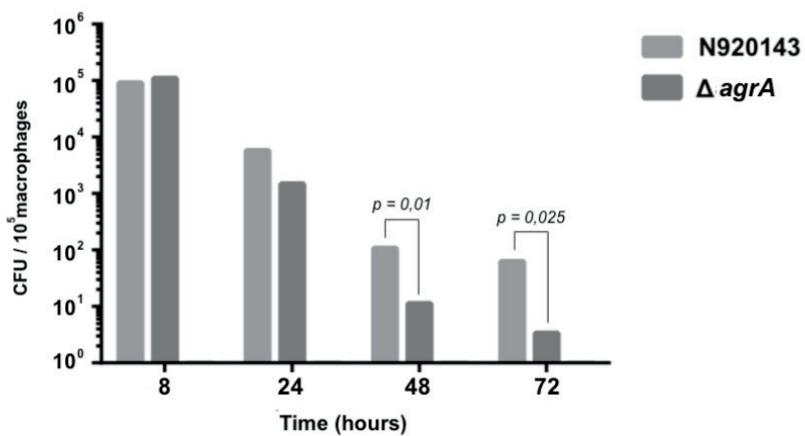
144



154

155 To know if AgrA may be a virulence factor in *S. lugdunensis*, survival of *S. lugdunensis*  
 156 N920143 and  $\Delta agrA$  mutant cells in murine peritoneal macrophages was carried out. Over three  
 157 days, significantly fewer  $\Delta agrA$  mutant cells were retrieved into mice macrophages than *S.*  
 158 *lugdunensis* N920143 cells. As shown in Figure 4,  $1.1 \times 10^1$  and  $0.33 \times 10^1$  colony forming units  
 159 (CFU) of mutant cells were enumerated into  $10^5$  macrophages after 48 h and 72 h, respectively,  
 160 whereas  $1 \times 10^2$  and  $6.2 \times 10^1$  CFU of *S. lugdunensis* N920143 were counted ( $p = 0.01$ ,  $p = 0.025$ ,  
 161 respectively). These data strongly argued for an important role of AgrA in the pathogenicity of  
 162 *S. lugdunensis*.

163



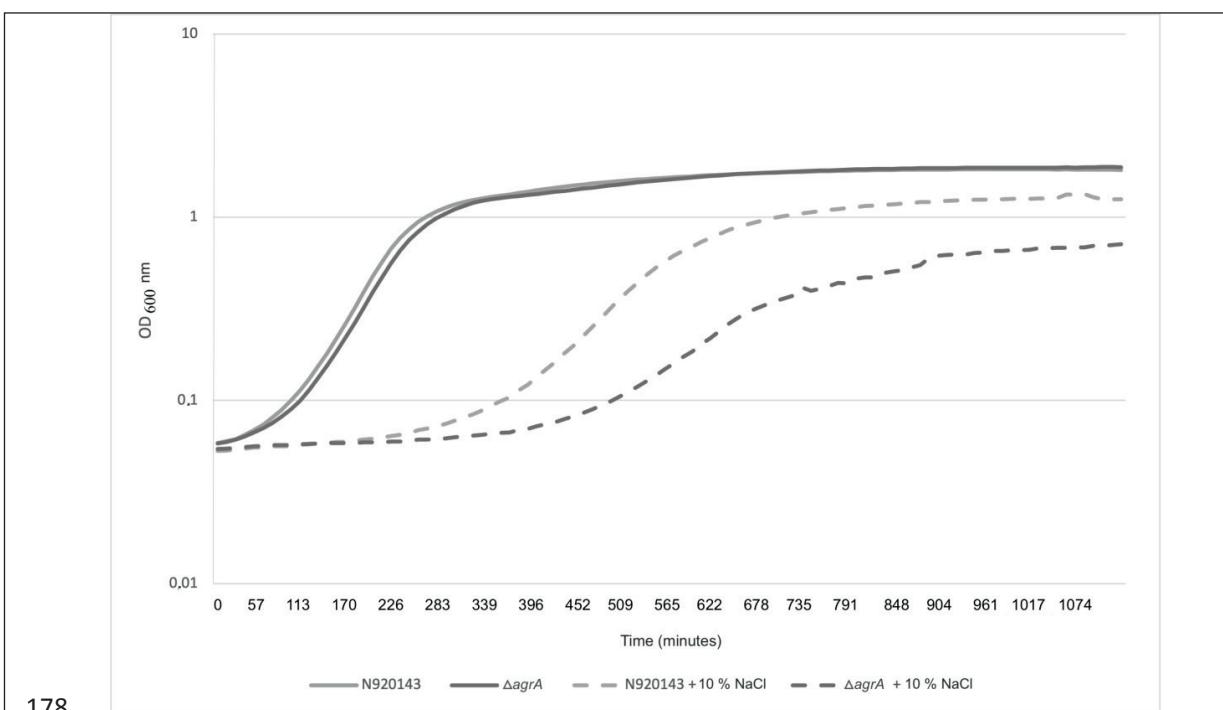
164

165 **FIG 4** Time course of intracellular survival of *S. lugdunensis* N920143 (gray) and  $\Delta agrA$   
 166 mutant (dark gray) within mice peritoneal macrophages. The results are numbers of viable  
 167 intracellular bacteria per  $10^5$  macrophages and are the means  $\pm$  standard deviations from three  
 168 independent experiments with three wells each.

169

170 Next, in order to show the role of AgrA in the bacterial fitness, we evaluated whether  
 171 AgrA of *S. lugdunensis* was involved in mechanisms of resistance to osmotic stress. In the  
 172 presence of 10 % NaCl, the growth of the  $\Delta agrA$  mutant cells was much more impacted than  
 173 that of the WT: 825 min and 525 min were required to reach an  $OD_{600}$  (optical density measured  
 174 at 600 nm) of 0.5 for the  $\Delta agrA$  mutant and parental cells, respectively (Fig. 5). Moreover, in  
 175 stationary phase, the  $OD_{600}$  under the osmotic stress condition was reduced for the mutant strain  
 176 (0.7 *versus* 1.25 for the WT,  $p = 0.0012$ ) indicating a lower cell density (Fig. 5).

177

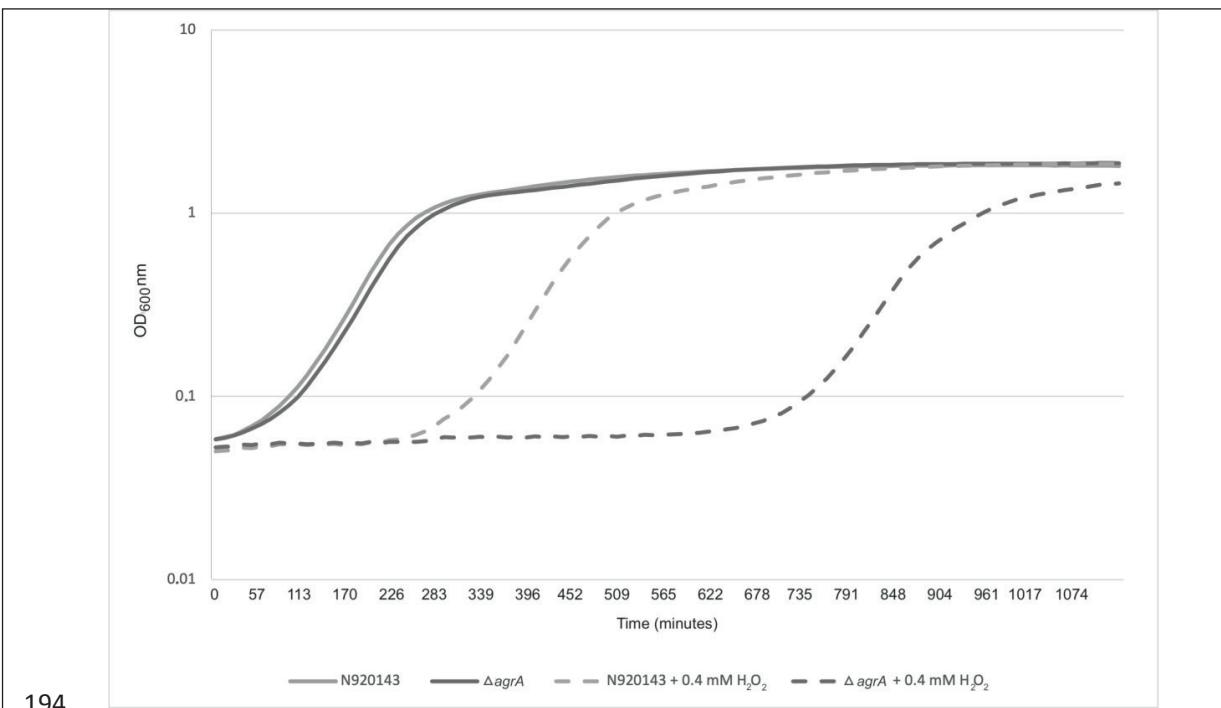


178

179 **FIG 5.** Representative growth curves of *S. lugdunensis* N920143 in BHI (continuous gray line),  
 180 *S. lugdunensis* N920143 in BHI with 10 % of NaCl (spaced gray line),  $\Delta agrA$  mutant in BHI  
 181 (continuous dark gray line), and  $\Delta agrA$  mutant in BHI with 10 % of NaCl (spaced dark gray  
 182 line).

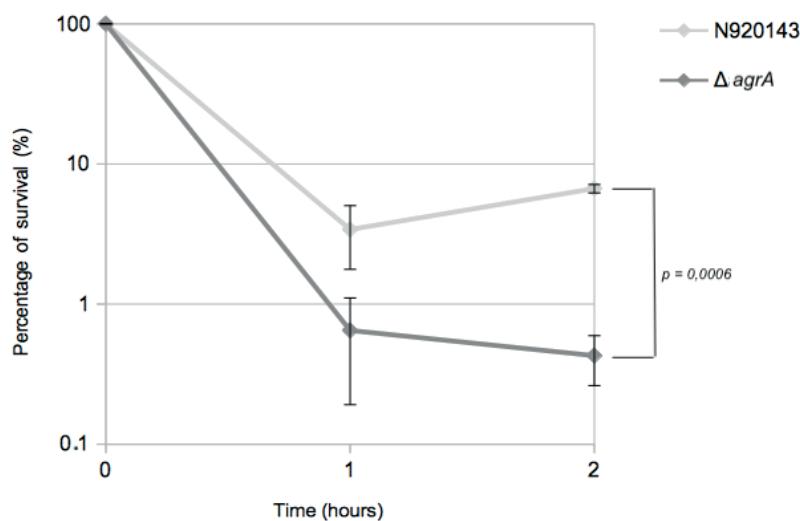
183

184 The role of AgrA in the ability of *S. lugdunensis* to cope with reactive oxygen species  
 185 (ROS) was then studied. As observed in Figure 6, the increased lag phase of growth triggered  
 186 by the addition of 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was much more pronounced for the  $\Delta agrA$  mutant than for the  
 187 WT strain. Under this oxidative stress condition, OD<sub>600</sub> of 0.5 was reached after around 7 h and  
 188 more than 14 h for *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta agrA$  mutant, respectively. We also confirmed  
 189 that AgrA conferred resistance to oxidative stress by comparison of survival of *S. lugdunensis*  
 190 N920143 and  $\Delta agrA$  mutant cells in presence of a lethal concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 7). After  
 191 2 h with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the rates of survival of *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta agrA$  mutant were  
 192 6.7 % and 0.4 %, respectively ( $p = 0.0006$ ) (Fig. 7). Our data demonstrated that AgrA of *S.*  
 193 *lugdunensis* was involved in oxidative stress response.



194

195 **FIG 6** Representative growth curves of *S. lugdunensis* N920143 in BHI (continuous gray line),  
 196 *S. lugdunensis* N920143 in BHI with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (spaced gray line),  $\Delta$ agrA mutant in BHI  
 197 (continuous dark gray line), and  $\Delta$ agrA mutant in BHI with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (spaced dark gray  
 198 line).



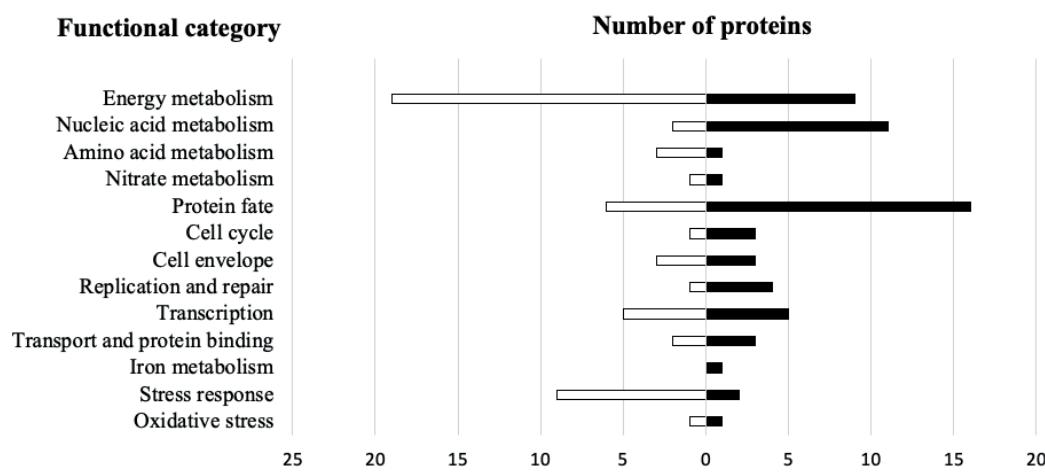
199

200 **FIG 7** Representative survival curves of *S. lugdunensis* N920143 in BHI with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 201 (gray) and  $\Delta$ agrA mutant in BHI with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dark gray). Mean, SD and *p*-value are  
 202 presented.

203

204 **The *S. lugdunensis* *agrA* proteome.** The *S. lugdunensis* *agrA* proteome was analyzed  
 205 by mass-spectrometry after trypsin digestion. Among the 2368 proteins potentially encoded by  
 206 the genome, 162 polypeptides appeared differentially expressed in the  $\Delta$ *agrA* mutant regarding  
 207 the following parameters: fold changes greater or smaller than 2 fold with a *p*-value less than  
 208 0.05. 78 were significantly more produced while 84 were less abundant (Table S1, Fig. S1).  
 209 The functional annotation of differentially produced proteins revealed various cellular  
 210 metabolisms impacted by the deletion of *agrA*: energy (n = 28), nucleic acids (n = 13), amino  
 211 acids (n = 4), nitrate (n = 2), protein fate (n = 22) (Fig. 8). In addition, the inactivation of the  
 212 transcriptional regulator AgrA also interfered with the expression of stress proteins.  
 213 Interestingly, the autolysin, ferrous iron transport protein B and cold-shock protein CspC were  
 214 among the most over-produced proteins in the mutant strain. Conversely, enzymes involved in  
 215 oxidative stress such as MsrA, MsrB (peptide methionine sulfoxide reductases), KatA  
 216 (catalase), or in general stress response (Asp23, AmaP, Clp proteases, OpuC, general stress  
 217 protein) were less abundant in the  $\Delta$ *agrA* cells (Table S1, Fig. 8). Note that some of the  
 218 corresponding genes were found significantly deregulated in our transcriptomic results (Table  
 219 S2, see below).

220



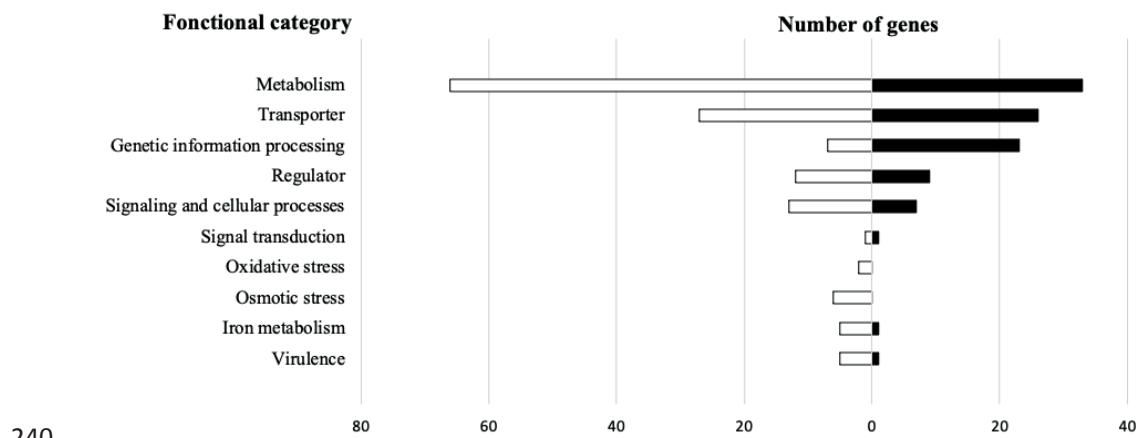
221

222 **FIG 8** Functional classification of proteins significantly upregulated (black bars) and  
 223 downregulated (white bars) of growing cell (OD<sub>600</sub> of 1) of *S. lugdunensis* N920143 compared  
 224 to  $\Delta$ *agrA* mutant.

225

226       **Global regulation of gene expression by AgrA.** To identify genes with altered  
 227 expression due to the deletion of the transcriptional regulator AgrA, a global transcriptomic  
 228 study of *S. lugdunensis* N920143 was undertaken and compared to  $\Delta agrA$  mutant cells. Using  
 229 *S. lugdunensis* N920143 as a reference genome, 98.46–99.61 % of the high-quality sequenced  
 230 reads (Phred score>30) were uniquely mapped (Table S3). Overall, the  $\Delta agrA$  deletion  
 231 significantly affected the expression of 400 genes (Log<sub>2</sub> Fold Change (Log<sub>2</sub>FC) less than -1 or  
 232 higher than 1). Among them, 149 were upregulated and 251 were downregulated (Table S3,  
 233 Fig. S2). Most upregulated genes included those involved in metabolism (n=33), transport  
 234 (n=26) and genetic information processes (n=23) whose 9 regulators (Fig. 9). Some  
 235 downregulated genes were also associated with metabolism (n=66), transport (n=27), CRISPR  
 236 system (n=8) and transcriptional regulation (n=11) (Fig. 9). Nonetheless, *agr* showed an  
 237 important influence on the regulation of genes involved in the bacterial stress response and the  
 238 virulence of *S. lugdunensis* (see below).

239



240

241       **FIG 9** Schematic representation of the functional classification of genes upregulated (black  
 242 bars) and downregulated (white bars) of *S. lugdunensis* N920143 cells compared to  $\Delta agrA$   
 243 mutant cells (OD<sub>600</sub> of 1).

244

245       As expected, transcription of RNAIII was dramatically reduced in the  $\Delta agrA$  mutant  
 246 (Table S2). It was thus tempting to hypothesize that phenotypes observed in the  $\Delta agrA$  mutant  
 247 could result from this deregulation of RNAIII. Therefore, we have constructed and analyzed  
 248 the  $\Delta$ RNAIII mutant strain of *S. lugdunensis*. Until yet, no phenotypical difference nor  
 249 proteomic profile modification has been observed when compared with the WT strain. RT-  
 250 qPCR performed with some genes identified by RNA-seq (*slushABC*, *crtM*, *crtN*, *katA*, *agrA*

251 and RNAIII) confirmed the downregulation in the  $\Delta agrA$  mutant as well as the absence of the  
 252 RNAIII involvement (Table 1).

253

254 **Table 1:** Analysis of transcriptional level of *slushABC*, *crtM*, *crtN*, *katA*, *agrA*, and RNAIII  
 255 genes in *S. lugdunensis* N920143 *versus*  $\Delta agrA$  mutant or  $\Delta$ RNAIII mutant.

Gene	Fonction	$\Delta agrA$ mutant		$\Delta$ RNAIII mutant	
		Fold Change	<i>p</i> -value	Fold Change	<i>p</i> -value
<i>slushABC</i>	Hemolytic activity	-15.8	7.5e-05	1.2	0.57
<i>crtM</i>	Staphyloxanthin biosynthesis	-12.4	2.8e-05	1.2	0.55
<i>crtN</i>	Staphyloxanthin biosynthesis	-13.6	4.6e-05	1.1	0.73
<i>katA</i>	Oxidative stress	-5.1	1.0e-04	1.4	0.38
<i>agrA</i>	Regulator			1.2	0.93
RNAIII	Regulator	-88.5	0.84		

256

257 **Regulation of stress factors.** One of the most striking observations was the impact of  
 258 *agrA* on the stress response, especially the oxidative and osmotic stresses. The transcription of  
 259 three major genes involved in the detoxification of ROS, *katA* (encoding catalase), *sodA*  
 260 (encoding superoxide dismutase) and SLU\_18820 (encoding coenzyme A-disulfide reductase,  
 261 CoADR) were significantly downregulated in the  $\Delta agrA$  mutant (Table S2). It is noteworthy  
 262 that KatA and CoADR were also less abundant in our proteomic study (Table S1). *S.*  
 263 *lugdunensis* was obviously able to produce pigments and possesses *crtM* and *crtN* genes (likely  
 264 in operon structure with SLUG\_01810-01840 loci) coding for squalene desaturase and squalene  
 265 synthase, respectively. CrtMN enzymes catalyzed the two first reactions of the pathway of  
 266 staphyloxanthin biosynthesis in *S. aureus* allowing the formation of 4,4'-Diaponeurosporene  
 267 that is a yellow pigment (24). Since such carotenoid pigment with conjugated double bonds can  
 268 scavenge ROS, the downregulation of *crtMN* operon in the  $\Delta agrA$  mutant was well correlated  
 269 with the reduced resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in addition to the white color phenotype of the mutant.

270 Our transcriptomic results indicated that AgrA negatively regulated the expression of  
 271 genes of synthesis of betaine from choline (*cudTAB* operon) and positively those involved in  
 272 the osmoprotectant (glycine betaine) transport (*opuCABCD* operon) (Table S2). Staphylococci  
 273 are of the most halotolerant eubacteria and face high NaCl concentrations by accumulating  
 274 compatible solutes as glycine betaine (25). Based on our data, the Agr system seemed  
 275 implicated in the osmotic stress resistance of *S. lugdunensis* by favoring import of  
 276 osmoprotectants.

277 *S. lugdunensis* is particularly well equipped with iron-metabolism enzymes playing an  
278 important role in the “nutritional immunity” setting up by the host to limit access to essential  
279 ions. Interestingly, we identified several AgrA up-regulated genes known to be involved in iron  
280 homeostasis (*isdB*, *isdE*, *efeB*) and hemin detoxification (SLUG\_06770, SLUG\_06780) (17).

281 Among stress-inducible genes members of the AgrA regulon, two genes coding for Clp  
282 ATPases (*clpB* and *clpL*) were under-expressed in the  $\Delta$ *agrA* mutant (Table S2). ClpB and ClpL  
283 are molecular chaperones that are required for the development of induced thermotolerance in  
284 *S. aureus* (26). Of note that the ClpL protein was also recovered as less abundant in the mutant  
285 strain (Table S2).

286

287 **Regulation of the virulence genes.** The *agr* system with RNAIII are classically  
288 associated with the virulence of *S. aureus* since up-regulate the production of degradative  
289 enzymes and toxins and down-regulate proteins involved in colonization (11). In *S.*  
290 *lugdunensis*, the expression of some putative virulence factors appeared under AgrA control.  
291 *isaA*, encoding the immunodominant *S. aureus* antigen A (IsaA), was significantly  
292 overexpressed in the  $\Delta$ *agrA* mutant of *S. lugdunensis* (Table S2). This lytic transglycosylase is  
293 both exposed to the cell surface and secreted and plays a role in peptidoglycan turnover, cell  
294 wall hydrolysis and cell separation (27). Moreover, IsaA has been identified as a major antigen  
295 of *S. aureus* (28). Our RNA-seq results also revealed that the well-recognized virulence factor  
296 genes *slushABC* were strongly repressed in absence of AgrA (Table S2). These three synergistic  
297 hemolytic peptides have shown their participation in pathogenicity (22, 29). Interestingly, the  
298 transcription of three of the seven genes of the *lug* operon (SLUG\_08110, *lugB*, SLUG\_08140),  
299 was slightly reduced in the  $\Delta$ *agrA* mutant (Log<sub>2</sub>FC of -1.05 to -1.21). The downregulation of  
300 the other genes of the operon (*lugR*, *lugA*, *lugC*, and *lugD*) was also observed downregulated  
301 but with Log<sub>2</sub> fold changes from -0.43 to -0.9. Because these values were just below our  
302 threshold, these genes were not included in Table S2. *lug* encodes a complex allowing the non-  
303 ribosomal synthesis of lugdunin, a bioactive cyclic peptide that prevents *S. aureus* colonization  
304 of the human nose (30).

305 Our transcriptomic and proteomic results revealed that AgrA positively regulated the  
306 transcription of *asp23* in *S. lugdunensis* (Tables S1 and S2). In *S. aureus*, Asp23, belonging to  
307 the Gls24 superfamily has been identified as an alkaline shock protein whose corresponding  
308 gene expression is controlled by the alternative sigma factor SigB (31, 32). It may be suspected  
309 that *asp23* could be a virulence-associated gene because Gls24, first characterized as a general

310 stress protein, has also been shown to be important for virulence in *Enterococcus faecalis* (33,  
311 34).

312

313 **Regulatory networks.** It is evident that the 400 genes deregulated in the  $\Delta agrA$  mutant  
314 of *S. lugdunensis* were not all directly under the control of AgrA. In this study, we observed  
315 that twenty transcriptional regulators exhibited a modification of their expression: nine were  
316 upregulated and eleven were repressed in the mutant strain (Table S2, Fig. 9). Most of them  
317 were suspected of being involved in cellular metabolism. However, interestingly, *saeR*, coding  
318 for the regulator of the two-component system (TCS) SaeRS, was upregulated in the  $\Delta agrA$   
319 mutant. In *S. aureus*, this TCS is an additional regulator of virulence factors *in vivo* (11, 35,  
320 36).

321 With the aim to identify putative direct AgrA targets, we looked for the presence of the  
322 possible AgrA-binding box (WMMGTTNRK) in the promoter regions of the deregulated genes  
323 identified by our global transcriptomic study (8). This motif was recovered in front of 48 open  
324 reading frames which could constitute the direct ArgA regulon (Table S2). In addition to the  
325 expected ArgA-box found in the intergenic region between the *agr* and RNAIII loci, it is  
326 noteworthy that this putative binding site was present in the promoter regions of *isdB*, *cspC*,  
327 *slushA*, and SLUG\_20840 (coding an osmoprotectant transporter system) (Table S2).

328

## 329 DISCUSSION

330 One of the major systems for regulating virulence in *S. aureus* is the *agr* locus. It  
331 upregulates secreted virulence factors and represses cell surface proteins in parallel with the  
332 regulation of the intracellular effector molecule RNAIII (5). It displays sequence homology and  
333 similar genetic organization to those of *S. lugdunensis*. Of note that in *S. lugdunensis*, the *hld*  
334 open reading frame coding for the delta-hemolysin was not found in the RNAIII sequence (23).  
335 In the present study, we intended to provide information on the role of the quorum-sensing  
336 regulator AgrA in this important opportunistic pathogen. Therefore, we constructed the  $\Delta agrA$   
337 mutant strain and performed phenotypic and global transcriptomic and proteomic studies.

338 Surprisingly, we observed that the  $\Delta agrA$  mutant cells of *S. lugdunensis* showed reduced  
339 biofilm formation compared to the parental strain, contrary to what was observed for *S. aureus*  
340 and *S. epidermidis* (3, 38, 39). Based on our analysis of the AgrA-regulated genes, it can be  
341 hypothesized that the downregulation of genes involved in iron homeostasis could lead to  
342 reduced biofilm formation. In *S. lugdunensis*, it has been clearly shown that the iron-limitation  
343 condition triggered biofilm production in parallel with overexpression of *isd* operon (16, 40).

344 Note that the *isd* operon is not present in the *S. epidermidis* genome and was not identified as  
345 an AgrA-regulated gene in *S. aureus* (4).

346 The Agr system is necessary for the pathogenicity of staphylococci, and it was long  
347 believed that up-regulation of virulence factors was mainly due to the RNAIII-dependent gene  
348 regulation (41). RNAIII acts as a post-translational regulator by interacting with target  
349 transcripts inhibiting the production of surface proteins (such as protein A) and other  
350 transcriptional regulators (41, 42). Interestingly, trans-complementation experiments showed  
351 that, despite the absence of delta-hemolysin and low overall homology with RNAIII from *S.*  
352 *aureus*, RNAIII from *S. lugdunensis* was able to regulate the expression of *S. aureus* target  
353 genes (23). We thus constructed the  $\Delta$ RNAIII mutant and performed proteomic profiles  
354 comparison. Astonishingly, no significant difference in protein abundance was observed.  
355 Moreover, transcriptional analysis by RT-qPCR of some genes deregulated in the  $\Delta$ agrA mutant  
356 did not reveal differential expression in the  $\Delta$ RNAIII mutant either. Most virulence factors  
357 directly or indirectly under RNAIII control (enterotoxins, alpha-toxin, leukocidins,  
358 exoenzymes) in *S. aureus* are not present in *S. lugdunensis*, which makes the role of this  
359 regulatory RNA questionable in this strain. It is tempting to speculate that RNAIII from *S.*  
360 *lugdunensis* could be an evolutionary residue kept in the strain probably because it does not  
361 provide additional fitness cost.

362 In *S. aureus*, the AgrA transcriptional regulator binds to the promoters of the *agr* and  
363 RNAIII loci (P2 and P3) as well as the *psm* operons (9). The latter encodes phenol-soluble  
364 modulins (PSMs) which are peptide toxins (29). Likewise, in *S. lugdunensis*, we showed that  
365 the *agr* operon, RNAIII and *slushABC* (encoding PSMs) possessed a putative ArgA binding  
366 motif in the promoter regions and were downregulated in the  $\Delta$ agrA mutant. The gene coding  
367 for IsaA was overexpressed in the  $\Delta$ agrA mutant. IsaA is a soluble transglycosylase involved  
368 in peptidoglycan turnover and cell division but is highly immunogenic (27). Levels of anti-IsaA  
369 IgG were significantly higher in plasma samples from healthy *S. aureus* carriers than from non-  
370 carries (43). In this context, AgrA, repressing the expression of *isaA*, could participate in the  
371 immune escape of *S. lugdunensis*. AgrA has also been shown to be a positive regulator of  
372 Asp23, a stress protein that may be a virulence factor based on homology to Gls24 of *E. faecalis*  
373 (34). The *asp23* gene is well known to be regulated by the alternative sigma factor SigB and  
374 our result highlighted the likely crosstalk between both transcriptional regulators AgrA and  
375 SigB (31).

376 Remarkably, AgrA regulated factors involved in colonization and stress responses.  
377 Lugdunin is a non-ribosomally synthesized bioactive peptide antibiotic produced by *S.*

378 *lugdunensis* which prevents nasal colonization by *S. aureus* (30). In the present study, we  
379 showed that the expression of the *lug* operon was, at least in part, controlled by AgrA.  
380 Commensal staphylococci have to cope with a wide range of salt concentrations in human  
381 habitats. The osmotic stress response consists in the transport and accumulation of osmolytes  
382 such as glycine betaine, choline, L-proline, and taurine from the environment like skin or in the  
383 synthesis of betaine by choline-conversion pathway (25, 44). Under osmotic stress, the growth  
384 of the  $\Delta$ *agrA* mutant was obviously more affected than the WT strain of *S. lugdunensis*. In  
385 parallel, we showed a highly reduced transcription of osmoprotectant transporter genes. This  
386 again proved that AgrA played an important role in the environmental adaptation of these  
387 bacteria.

388 As we also observed, the *agrA* mutants of *S. aureus* and *S. epidermidis* were more  
389 susceptible to hydrogen peroxide stress (10, 45). AgrA from *S. aureus* has a built-in oxidation-  
390 sensing mechanism *via* an intramolecular disulfide bond formation between Cys-199 and Cys-  
391 228 located in the DNA-binding domain of the regulator (10). This mechanism modulated  
392 transcription of *bsaA* coding for the glutathione peroxidase essential for the resistance to  
393 oxidative stress in *S. aureus* (10). *S. lugdunensis* possesses Cys-199 and Cys-228 amino acids  
394 in the AgrA sequence but no BsaA homologue. Nevertheless, our transcriptomic and proteomic  
395 data indicated that catalase, the major oxidoreductase enzyme crucial for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification  
396 was less produced in the  $\Delta$ *agrA* mutant. Several other AgrA up-regulated genes products  
397 converged toward the protection to oxidative stress. Thus, the reduced transcriptional levels of  
398 *sodA* (superoxide dismutase), SLU\_18820 (coenzyme A-disulfide reductase, CoADR), *crtM*,  
399 and *crtN* (squalene desaturase and synthase, respectively) in the  $\Delta$ *agrA* strain were in  
400 accordance with the lower resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in term of growth and survival) and the absence  
401 of carotenoid pigments. In addition to its function to maintain the reduced state of Coenzyme  
402 A, CoADR was shown to be also important for *S. aureus* virulence (46, 47). Of note, *sodA*,  
403 *katA*, and SE0669 (coding for CoADR) were also found by microarray analysis of the  $\Delta$ *agrA*  
404 mutant of *S. epidermidis*, and *crtN* was among *agr*-upregulated genes in *S. aureus* (4, 45). Both  
405 peptide methionine sulfoxide reductases (MsrA and MsrB) were less abundant in the  $\Delta$ *agrA*  
406 mutant. These proteins are known to not only repair oxidative alterations to methionine residues  
407 through the oxidation/reduction cycle, but also serve as ROS scavengers and protect cells from  
408 more extensive damages (48). Oxidative stress is one of the main deleterious aggressions  
409 encountered by bacteria into phagocytic cells (48). Thus, the influence of AgrA to cope with  
410 oxidants appears to be closely related to the reduced ability of the  $\Delta$ *agrA* mutant to survive in  
411 mice macrophages.

412 16.3 % of *S. lugdunensis* genes (400 over 2440 annotated genes) were deregulated in  
413 the  $\Delta agrA$  mutant whereas 40 harbored putative AgrA binding sites in their promoter regions.  
414 The important number of likely indirect AgrA-targets, mainly involved in diverse cellular  
415 metabolisms, may be explained by the impact on other regulators. AgrA controlled the  
416 expression of twenty transcriptional regulators among which the repression of the SaeRS TCS  
417 (11, 37). In *S. aureus*, the latter may be a virulence factor since influenced the transcription of  
418 hemolysins, leukotoxins, and coagulase genes, which are not present in *S. lugdunensis* (49).  
419 The role of the regulatory cascade involving AgrA and SaeRS remains to be elucidated.  
420 Contrary to *S. epidermidis*, neither *sarA* nor *sigB* transcription was influenced by the *agrA*  
421 deletion in *S. lugdunensis*. Nevertheless, some known *S. aureus* SigB regulated genes as *asp23*,  
422 *clpL*, *crtMN*, *opuD* and *katA* were members of the ArgA regulon in *S. lugdunensis* (50, 51). The  
423 alternative sigma B factor SigB of the RNA polymerase is a master regulator of a large regulon  
424 responding to a variety of stress conditions (50). Characterization of the SigB regulon in *S.*  
425 *lugdunensis* should provide additional information to better understand how this opportunistic  
426 pathogen can cope with environmental stresses.

427 In conclusion, *S. lugdunensis* cells with an active *agr* system appeared much well  
428 equipped to protect against environmental stresses (especially oxidative and osmotic), more  
429 able to form biofilm, and likely more virulent. Our phenotypic and global analyses proved that  
430 AgrA acted as a pleiotropic regulator and provided a snapshot of the direct and indirect targets.  
431 These data brought information about mechanisms that may at least in part explain how these  
432 commensal bacteria can become a worrying pathogen and thus support the use of AgrA as an  
433 interesting therapeutic target that can interfere with staphylococci pathogenicity (52).

434

## 435 MATERIALS AND METHODS

436 **Bacterial strains and growth conditions.** The sequenced *S. lugdunensis* N920143  
437 strain was used in this study (GenBank FR870271) (53). Overnight cultures of *S. lugdunensis*  
438 N920143 and  $\Delta agrA$  mutant were diluted 2:100 in BHI. These bacterial suspensions were used  
439 to fill the wells of a 96-wells flat-bottom sterile polystyrene microplate. Growth measurements  
440 (OD<sub>600</sub> every 10 min) were performed using the microtiter plate reader Tecan infinite 200 pro  
441 (Tecan, Männedorf, Switzerland) and *p*-values were determined using a variance Student t-test.

442 Bacterial colony pigmentation was macroscopically detected after 24 h of incubation at  
443 37 °C on agar TS and BCP agar.

444

445       **Construction of the *S. lugdunensis* N920143 *ΔagrA* mutant strain.** Isolates were  
 446       grown overnight at 37 °C on BHI agar. DNA was extracted using the InstaGene Matrix kit (Bio-  
 447       Rad, Hercule, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. PCRs were performed  
 448       using a BIO-RAD Thermal Cycler (Bio-Rad) in a final volume of 50 µL containing 0.5 µL Q5  
 449       polymerase (New England BioLabs, Every, France), 10 µM of each primer, and 2 µL of DNA.  
 450       When necessary, PCR products were purified and verified by sequencing. The plasmids were  
 451       extracted with QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

452       The *agrA* deletion mutant was constructed by homologous recombination using pMAD  
 453       plasmid (54). The fragment containing the upstream region of *agrA* (with respect to the *agrA*  
 454       translation initiation site) and the downstream region (with respect to the *agrA* stop codon) were  
 455       amplified by a two-step overlap PCR reaction using the oligonucleotide pairs AgrA-1F-  
 456       EcoRI/AgrA-1R-NotI and AgrA-2F-NotI/AgrA-2R-BamHI (Table S4). The purified PCR  
 457       products were digested with NotI restriction enzyme (New England BioLabs) and ligated into  
 458       the pTOPO plasmid with TOPO TA Cloning Kit (ThermoFisher, Carlsbad, USA) and cloned  
 459       into *Escherichia coli* TOP10. PCR reaction using the oligonucleotide M13-F and M13-R was  
 460       performed for verification (Table S4). The purified PCR product was then digested with EcoRI  
 461       restriction enzyme and ligated into the pMAD vector with T4 DNA ligase (New England  
 462       BioLabs) following the manufacturer's instructions and then cloned into *E. coli* SL01B (55).  
 463       Clones containing the resulting recombinant pMAD $\Delta$ *agrA* vector were selected on BHI  
 464       supplemented with ampicillin (50 µg/mL). pMAD $\Delta$ *agrA* was purified and used to transform  
 465       the WT *S. lugdunensis* N920143 strain by electroporation as previously described (55). After  
 466       incubation at 30 °C for 5 days, clones containing the plasmid integrated into the chromosome  
 467       were selected, and the double-crossover event was performed by a shift of temperature to 43  
 468       °C and in the presence of erythromycin (54). The loss of the free plasmid was obtained after  
 469       successive shifts between 30 and 43 °C and in absence of antibiotics. Successful deletion of the  
 470       *agrA* gene was verified by PCR and sequencing.

471       The RNAIII deletion mutant was also constructed by homologous recombination using  
 472       pMAD plasmid and oligonucleotide pairs listed in Table S4 using the protocol described above.  
 473

474       **Biofilm formation.** To generate biofilms, 50 µL of overnight culture (adjusted at OD<sub>600</sub>  
 475       of 0.1 with BHI) of *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta$ *agrA* mutant were inoculated into the wells  
 476       of the µ-Plate Angiogenesis 96 well (ibidi, Madison, WI, USA). After twenty hours, the  
 477       planktonic cells were discarded and the wells were washed with 50 µL of sterile water. Then,  
 478       25 µL of labeling solution (LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, Invitrogen) was

479 added. Following incubation for 15 min at 20-25 °C, the biofilms were mounted using one drop  
480 of ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Life Technologies, Oregon, USA), and the plate  
481 was incubated for 24 h at room temperature in darkness. The live and dead fluorescent cells  
482 present in the biofilms were observed using the inverted microscope Nikon Eclipse Ti-S (x60  
483 microscopic lens) equipped with the Nikon Digital Sight DS-Ri1 camera (Nikon, Tokyo,  
484 Japan). The pictures were obtained and analyzed using the NIS Element AR software (version  
485 5.01.00) (Nikon). The results represent the mean of biofilm volume ( $\mu\text{m}^3$ ) of three independent  
486 experimental values, and *p*-values were determined using a variance Student t-test.

487 Biofilm formation was also detected using the crystal violet staining method previously  
488 described (56). Overnight cultures of *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta\text{agrA}$  mutant were diluted  
489 to obtain OD<sub>600</sub> of 0.1 in BHI. Sterile polypropylene microplates (Eppendorf, Montesson,  
490 France) were loaded with 200  $\mu\text{L}$  of bacterial suspensions and incubated for 24 h at 37 °C.  
491 Adherent cells were stained with 0.1 % crystal violet for 15 minutes and, after three washes  
492 with sterile water, wells were air-dried. For quantitative estimation of the biofilm density, bound  
493 crystal violet was solubilized with 70 % ethanol and the absorbance of the solubilized dye was  
494 read at 600 nm with the microtiter plate reader. Three independent experiments (each in  
495 duplicate) were performed, and *p*-values were determined using a two-tailed, two-sample  
496 unequal variance Student t-test.

497

498 **Survival experiment in mice peritoneal macrophages.** Survival of *S. lugdunensis*  
499 N920143 and  $\Delta\text{agrA}$  mutant in mice peritoneal macrophages was tested using an *in vivo-in vitro*  
500 infection model, as previously described (57). Bacterial cells were pelleted and suspended in  
501 an adequate volume of phosphate-buffered saline (PBS) for injection. Male BALB/c mice (10  
502 weeks old; Harlan Italy S.r.l., San Pietro al Natisone, Udine, Italy) were infected with  $4.8 \times 10^7$   
503  $\pm 0.3 \times 10^7$  cells of each strain (estimated by CFU determination) by intraperitoneal injection  
504 of 200  $\mu\text{L}$  of the PBS-*staphylococcus* suspension. After a 6 h infection period, the macrophages  
505 were collected by peritoneal lavage, centrifuged, and suspended in Dulbecco's modified Eagle's  
506 medium (DMEM) containing 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 10 % fetal bovine serum, and  
507 1X nonessential amino acids, supplemented with vancomycin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and gentamicin (150  
508  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The cell suspension was dispensed into 24-well tissue culture plates and incubated at  
509 37 °C under 5 % CO<sub>2</sub> for 2 h. After exposure to antibiotics (i.e., 8 h post-infection) to kill  
510 extracellular bacteria, the infected macrophages were washed, and triplicate wells of  
511 macrophages were lysed with detergent. After dilution with BHI broth, the lysates were plated  
512 on BHI agar to quantitate the viable intracellular bacteria. The remaining wells of infected

513 macrophages were maintained in DMEM with the antibiotics for the duration of the experiment.  
514 The same procedure was performed at 24, 48, and 72 h post-infection. In parallel, supernatant  
515 fluids from each well were removed, and extracellular bacteria were quantitated by counting on  
516 BHI agar plates. To assess their viability, macrophages were detached from tissue culture wells  
517 with cell scrapers and stained with trypan blue, and viable macrophages were counted with a  
518 hemacytometer. The procedure was repeated three times, and the results were analyzed using a  
519 one-way analysis of variance with a Bonferroni correction posttest with SPSS statistical  
520 software (SPSS, Chicago, IL, USA). All statistical analyses were performed using Prism  
521 software (version 5.00) for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For all  
522 comparisons, a *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

523 The experiments were performed under a protocol approved by the Institutional Animal  
524 Use and Care Committee at Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy (Permit number:  
525 Z21, 11/01/2010) and authorized by the Italian Ministry of Health, according to Legislative  
526 Decree 116/92, which implemented the European Directive 86/609/EEC on laboratory animal  
527 protection in Italy. Animal welfare was routinely checked by veterinarians of the Service for  
528 Animal Welfare.

529

530 **Osmotic and oxidative stress conditions.** Overnight cultures of *S. lugdunensis*  
531 N920143 and  $\Delta agrA$  mutant were diluted 2:100 in BHI with 10 % NaCl or 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. These  
532 bacterial suspensions were used to fill the wells of a 96-wells flat-bottom sterile polystyrene  
533 microplate and growth measurements (OD<sub>600</sub> every 10 min) were carried out using the  
534 microtiter plate reader. Experiences were performed at least three times and *p*-values were  
535 determined using a variance Student t-test.

536 The oxidative killing assays of *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta agrA$  mutant were  
537 performed as previously described (16). Briefly, bacteria were grown 24 h in BHI broth and  
538 sub-cultured in 10 mL broth at a starting density of OD<sub>600</sub> of 0.1. Cultures were grown to mid-  
539 exponential phase (OD<sub>600</sub>=0.5) and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. Samples were immediately taken,  
540 as well as 1 h and 2 h following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge at 37 °C, and rapidly diluted in 0.9 % NaCl  
541 solution. Viability was determined by spreading of appropriate serial dilutions on BHI agar,  
542 and CFUs were determined after 48 h incubation at 37 °C.

543

544 **Mass-spectrometry (MS).** The total protein extraction and the mass-spectrometry were  
545 done as described previously (16). Briefly, 200 mL of *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta agrA$   
546 mutant cell cultures were centrifuged (6000 g) for 15 min at 4 °C, washed twice with recovery

547 buffer (Tris HCl 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, glycerol 15 %), and incubated for 12 hours at -80 °C.  
548 Cells were disrupted using the Fast Prep instrument (MP Biomedical LLC, Santa Ana, CA,  
549 USA) for 3 min at 6.5 m/s followed by centrifugation for 10 min at 10,000 g at 4 °C to remove  
550 the cell debris. Proteins were prepared from three independent biological samples and the  
551 quantification was realized with the Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher, Waltham,  
552 MA, USA).

553 Five µg of each protein extract were digested with trypsin/Lys-C overnight at 37 °C.  
554 After protein or peptide desalting and concentration, the chromatography step was performed  
555 on a NanoElute (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) ultrahigh-pressure Nano flow  
556 chromatography system. Mass spectrometry experiments were carried out on a TIMS-TOF pro  
557 mass spectrometer (Bruker Daltonics) and spectra were acquired in the positive mode in the  
558 mass range from 100 to 1700 m/z. These data were processed with MaxQuant version 1.6.7.0  
559 and the MS/MS spectra were searched by the Andromeda search engine against the Uniprot *S.*  
560 *lugdunensis* database. Bioinformatic analysis and visualization were performed in Perseus.  
561 Three sample tests were performed using Student's t-test with a Permutation-based FDR of  
562 0.05.

563

564 **RNA extraction.** RNAs were extracted from cells of *S. lugdunensis* N920143 and  
565  $\Delta$ *agrA* mutant cultured in BHI harvested in the late-exponential phase (OD<sub>600</sub> of 1) as  
566 previously described (16). Following incubation of the cell pellets for 12 hours at -80 °C, RNAs  
567 were extracted with the Direct-zol RNA miniprep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and  
568 residual DNA was removed using Turbo DNase (ThermoFisher) according to the  
569 manufacturer's instructions. RNAs integrities and quantifications were measured by the Agilent  
570 TapeStation system (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Four independent samples for each strain  
571 were used.

572

573 **RNA-Seq and reads mapping.** cDNAs from the RNA samples were sequenced with  
574 the Illumina HiSeq 4000 platform generating reads of 50 pb (iGE3 Genomics Platform,  
575 University of Geneva, Swiss). For each condition, RNA-Seq analyses have been carried out  
576 using the four independent RNA samples. The fastqc software, the STAR algorithm (version  
577 2.7.5b), and the package HTSeq (version 0.13.5) were used to perform the quality assessments,  
578 reads mapping to the *S. lugdunensis* genome (assembly: ASM27046v1 accession number:  
579 NC\_017353.1), and table of counts, respectively. For the identification of genes differentially  
580 expressed in the  $\Delta$ *agrA* mutant *versus* the *S. lugdunensis* N920143 parental strain, normalized

581 data of reads were compared using the R package edgeR (version 3.26.8) and correction of the  
582 *p*-value was performed by the Benjamini–Hochberg method. Values of  $\log_2$  fold changes  
583 ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ) less than  $-1$  or higher than  $1$  with a corrected *p*-value less than  $0.05$  were considered  
584 to be statistically down or up deregulated.

585

586 **RT-qPCR experiments.** One  $\mu\text{g}$  of RNA was reverse transcribed using the BIORAD  
587 iScript Select cDNA synthesis Kit (Bio-Rad). The resulting cDNA was then amplified by qPCR  
588 using iSC SYBR green supermix in the iCycler iQ instrument (BioRad) according to the  
589 manufacturer's instructions. The primers used for this study are listed in Table S1. These  
590 experiments were performed in triplicate from three independent RNA extractions. We  
591 considered a significant modification in gene expression when the fold changes were greater  
592 than  $2$  or less than  $-2$  with a *p*-value  $< 0.05$ .

593

594 **Search for the putative AgrA binding site.** The reference genome used for this  
595 analysis was ASM27046v1 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000270465.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000270465.1)).  
596 First, using a homemade script, the coordinates of the non-coding regions and all the CDS were  
597 extracted. Then the coordinates of the putative AgrA-binding motif defined as  
598 “WMMGTTNRK” (8) were extracted from the fasta file of the genome using SeqUtils and  
599 SeqIO from Biopython, on both DNA strands. Finally, among genes whose transcriptions were  
600 modified in the  $\Delta\text{agrA}$  mutant, those with a motif found in the non-coding regions  
601 corresponding to the putative promoter regions, were suspected to be directly under AgrA  
602 control.

603

#### 604 **ACKNOWLEDGMENTS**

605 The authors warmly thank Sébastien Galopin, Sophie Castagnet and Mamadou Godet  
606 for technical assistance.

607 MAub and FG works are supported by grants from the Ministère de l'Enseignement  
608 Supérieur et de la Recherche and the Region Normandy, respectively.

609 MAub, MAuz, and JCG conducted the experiments and drafted the manuscript. PL and  
610 MAub constructed the mutant strains. MP and AL performed the biofilm experiments. BB  
611 conducted the proteomic analysis. FG and MAub performed transcriptomic and statistical  
612 analysis. MC, RT, CM and MS conducted the experiments of survival in macrophages. MAub,  
613 AD, FG, AL, MP and JCG participated to the results interpretation and editing manuscript.

614 We declare no competing interests.

615

616 **DATA AVAILABILITY**

617 The LC-MS/MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange  
618 Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD028347  
619 (<https://www.ebi.ac.uk/pride>).

620 All the RNA-Seq data are available in the GEO database with accession number  
621 GSE181857 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>).

622

623 **REFERENCES**

624

- 625 1. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. 1986. Regulation  
626 of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 202:58–  
627 61.
- 628 2. Yarwood JM, Schlievert PM. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin  
629 Invest* 112:1620–1625.
- 630 3. Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. 2000. Impact of the *agr* quorum-sensing system on  
631 adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182:1688–1693.
- 632 4. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL,  
633 Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ. 2001. Transcription profiling-based identification of  
634 *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol* 183:7341–  
635 7353.
- 636 5. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F,  
637 Moghazeh S. 1995. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in  
638 *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 248:446–458.
- 639 6. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J, Lina G.  
640 2002. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol*  
641 184:1180–1186.
- 642 7. Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of  
643 staphylococcal virulence. *Mol Micro* 48:1429–1449.
- 644 8. Nikolskaya AN, Galperin MY. 2002. A novel type of conserved DNA-binding domain in  
645 the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res* 30:2453–  
646 2459.
- 647 9. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach T-HL, Khan BA, Sturdevant DE, Ricklefs  
648 SM, Li M, Otto M. 2008. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-

- 649 sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus*  
 650 *aureus*. *Mol Cell* 32:150–158.
- 651 10. Sun F, Liang H, Kong X, Xie S, Cho H, Deng X, Ji Q, Zhang H, Alvarez S, Hicks LM,  
 652 Bae T, Luo C, Jiang H, He C. 2012. Quorum-sensing *agr* mediates bacterial oxidation  
 653 response via an intramolecular disulfide redox switch in the response regulator AgrA. *Proc  
 654 Natl Acad Sci U S A* 109:9095–9100.
- 655 11. Bronner S, Monteil H, Prévost G. 2004. Regulation of virulence determinants in  
 656 *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 28:183–200.
- 657 12. Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Posseko M, Chevalier C,  
 658 Helfer AC, Benito Y, Jacquier A, Gaspin C, Vandenesch F, Romby P. 2007. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors  
 659 and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* 21:1353–1366.
- 660 13. Liu PY, Huang YF, Tang CW, Chen YY, Hsieh KS, Ger LP, Chen YS, Liu YC. 2010.  
 661 *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: a literature review and analysis of risk  
 662 factors. *J Microbiol Immunol Infect* 43:478–484.
- 663 14. Parthasarathy S, Shah S, Raja Sager A, Rangan A, Durugu S. 2020. *Staphylococcus*  
 664 *lugdunensis*: review of epidemiology, complications, and treatment. *Cureus*.  
 665 <https://doi.org/10.7759/cureus.8801>.
- 666 15. Heilbronner S, Foster TJ. 2021. *Staphylococcus lugdunensis*: a skin commensal with  
 667 invasive pathogenic potential. *Clin Microbiol Rev*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00205-20>.
- 668 16. Aubourg M, Dhalluin A, Gravey F, Pottier M, Thomy N, Bernay B, Goux D, Martineau  
 669 M, Giard JC. 2020. Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited  
 670 condition in *Staphylococcus lugdunensis*. *BMC Microbiol*.  
 671 <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02016-x>.
- 672 17. Aubourg M, Gravey F, Dhalluin A, Giard JC. 2021. Identification of the iron-limitation  
 673 stimulon in *Staphylococcus lugdunensis*. *Arch Microbiol* 203:3687–3694.
- 674 18. Dahyot S, Oxaran V, Niepceron M, Dupart E, Legris S, Destruel L, Didi J, Clamens T,  
 675 Lesouhaitier O, Zerdoumi Y, Flaman JM, Pestel-Caron M. 2020. Role of the LytSR two-  
 676 component regulatory system in *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation and  
 677 pathogenesis. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00039>.
- 678 19. Vandenesch F, Projan SJ, Kreiswirth B, Etienne J, Novick RP. 1993. *Agr*-related  
 679 sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* 111:115–122.
- 680 681

- 682 20. Sakinc T, Kulczak P, Henne K, Gatermann SG. 2004. Cloning of an *agr* homologue of  
683 *Staphylococcus saprophyticus*. FEMS Microbiol Lett 237:157–161.
- 684 21. Frank KL, del Pozo JL, Patel R. 2008. From clinical microbiology to infection  
685 pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. Clin  
686 Microbiol Rev 21:111–133.
- 687 22. Donvito B, Etienne J, Denoroy L, Greenland T, Benito Y, Vandenesch F. 1997.  
688 Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three  
689 peptides encoded by a non-*agr* genetic locus. Infect Immun 65:95–100.
- 690 23. Benito Y, Lina G, Greenland T, Etienne J, Vandenesch F. 1998. *trans*-Complementation  
691 of a *Staphylococcus aureus* *agr* mutant by *Staphylococcus lugdunensis* *agr* RNAIII. J  
692 Bacteriol 180:5780–5783.
- 693 24. Xue L, Chen YY, Yan Z, Lu W, Wan D, Zhu H. 2019. Staphyloxanthin: a potential target  
694 for antivirulence therapy. Infect Drug Resist 12:2151–2160.
- 695 25. Vijaranakul U, Nadakavukaren MJ, de Jonge BL, Wilkinson BJ, Jayaswal RK. 1995.  
696 Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed  
697 *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. J Bacteriol 177:5116–5121.
- 698 26. Frees D, Chastanet A, Qazi S, Sørensen K, Hill P, Msadek T, Ingmer H. 2004. Clp  
699 ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation  
700 in *Staphylococcus aureus*. Mol Micro 54:1445–1462.
- 701 27. Stapleton MR, Horsburgh MJ, Hayhurst EJ, Wright L, Jonsson IM, Tarkowski A, Kokai-  
702 Kun JF, Mond JJ, Foster SJ. 2007. Characterization of IsaA and SceD, two putative lytic  
703 transglycosylases of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 189:7316–7325.
- 704 28. Lorenz U, Ohlsen K, Karch H, Hecker M, Thiede A, Hacker J. 2000. Human antibody  
705 response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus*  
706 *aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 29:145–153.
- 707 29. Cheung GYC, Joo HS, Chatterjee SS, Otto M. 2014. Phenol-soluble modulins - critical  
708 determinants of staphylococcal virulence. FEMS Microbiol Rev 38:698–719.
- 709 30. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, Burian M,  
710 Schilling NA, Slavetinsky C, Marschal M, Willmann M, Kalbacher H, Schittek B, Brötz-  
711 Oesterhelt H, Grond S, Peschel A, Krismer B. 2016. Corrigendum: Human commensals  
712 producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. Nature 539:314.
- 713 31. Kuroda M, Ohta T, Hayashi H. 1995. Isolation and the gene cloning of an alkaline shock  
714 protein in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun  
715 207:978–984.

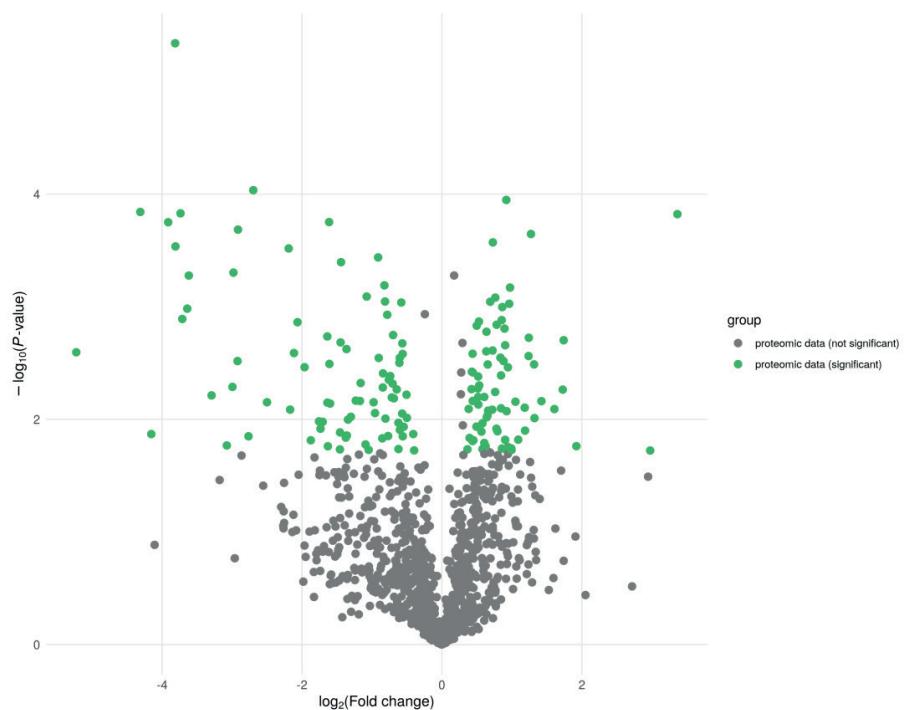
- 716 32. Miyazaki E, Chen JM, Ko C, Bishai WR. 1999. The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (orf159)  
717 gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J Bacteriol* 181:2846–2851.
- 718 33. Giard JC, Rince A, Capiaux H, Auffray Y, Hartke A. 2000. Inactivation of the stress- and  
719 starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress  
720 sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 182:4512–4520.
- 721 34. Teng F, Nannini EC, Murray BE. 2005. Importance of *gls24* in virulence and stress  
722 response of *Enterococcus faecalis* and use of the Gls24 protein as a possible  
723 immunotherapy target. *J Infect Dis* 191:472–480.
- 724 35. Giraudo AT, Rampone H, Calzolari A, Nagel R. 1996. Phenotypic characterization and  
725 virulence of a *sae*- *agr*- mutant of *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol* 42:120–123.
- 726 36. Matsumoto M, Nakagawa S, Zhang L, Nakamura Y, Villaruz AE, Otto M, Wolz C,  
727 Inohara N, Núñez G. 2021. Interaction between *Staphylococcus* *Agr* virulence and  
728 neutrophils regulates pathogen expansion in the skin. *Cell Host Microbe* 29:930-940.e4.
- 729 37. Giraudo AT, Calzolari A, Cataldi AA, Bogni C, Nagel R. 1999. Corrigendum to: “The  
730 *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system”. *FEMS*  
731 *Microbiol Lett* 180:117.
- 732 38. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. 2003. Quorum-sensing control  
733 of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 188:706–718.
- 734 39. Vuong C, Kocanova S, Yao Y, Carmody AB, Otto M. 2004. Increased colonization of  
735 indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in  
736 vivo. *J Infect Dis* 190:1498–1505
- 737 40. Missineo A, Di Poto A, Geoghegan JA, Rindi S, Heilbronner S, Gianotti V, Arciola CR,  
738 Foster TJ, Speziale P, Pietrocola G. 2014. IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* induces  
739 biofilm formation under low-iron growth conditions. *Infect Immun* 82:2448–2459.
- 740 41. Le KY, Otto M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front*  
741 *Microbiol* 6:1174.
- 742 42. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. 1993. Synthesis  
743 of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J*  
744 12:3967–3975.
- 745 43. Kloppot P, Selle M, Kohler C, Stentzel S, Fuchs S, Liebscher V, Müller E, Kale D, Ohlsen  
746 K, Bröker BM, Zipfel PF, Kahl BC, Ehricht R, Hecker M, Engelmann S. 2015.  
747 Microarray-based identification of human antibodies against *Staphylococcus aureus*  
748 antigens. *Proteomics Clin Appl* 9:1003–1011.

- 749 44. Ming T, Geng L, Feng Y, Lu C, Zhou J, Li Y, Zhang D, He S, Li Y, Cheong L, Su X.  
750 2019. iTRAQ-based quantitative proteomic profiling of *Staphylococcus aureus* under  
751 different osmotic stress conditions. *Front Microbiol* 10:1082.
- 752 45. Yao Y, Vuong C, Kocanova S, Villaruz AE, Lai Y, Sturdevant DE, Otto M. 2006.  
753 Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response:  
754 quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. *J Infect Dis*  
755 193:841–848.
- 756 46. delCardayré SB, Stock KP, Newton GL, Fahey RC, Davies JE. 1998. Coenzyme A  
757 disulfide reductase, the primary low molecular weight disulfide reductase from  
758 *Staphylococcus aureus*: purification and characterization of the native enzyme. *J Biol*  
759 *Chem* 273:5744–5751.
- 760 47. Mallett TC, Wallen JR, Karplus PA, Sakai H, Tsukihara T, Claiborne A. 2006. Structure  
761 of coenzyme A-disulfide reductase from *Staphylococcus aureus* AT 1.54 Å resolution.  
762 *Biochemistry* 45:11278–11289.
- 763 48. Singh VK, Singh K, Baum K. 2018. The role of methionine sulfoxide reductases in  
764 oxidative stress tolerance and virulence of *Staphylococcus aureus* and other bacteria.  
765 *Antioxidants (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/antiox7100128>.
- 766 49. Liu Q, Yeo WS, Bae T. 2016. The SaeRS two-component system of *Staphylococcus*  
767 *aureus*. *Genes (Basel)* 7:81.
- 768 50. Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, Mounts W, Berger-Bächi  
769 B, Projan S. 2004. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* σB regulon. *J*  
770 *Bacteriol* 186:4085–4099.
- 771 51. Pané-Farré J, Jonas B, Förstner K, Engelmann S, Hecker M. 2006. The sigmaB regulon in  
772 *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol* 296:237–258.
- 773 52. Khan BA, Yeh AJ, Cheung GYC, Otto M. 2015. Investigational therapies targeting  
774 quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Opin*  
775 *Investig Drugs* 24:689–704.
- 776 53. Heilbronner S, Holden MT, van Tonder A, Geoghegan JA, Foster TJ, Parkhill J, Bentley  
777 SD. 2011. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows  
778 identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS Microbiol Lett*  
779 322:60–67.
- 780 54. Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. 2004. New vector for efficient allelic  
781 replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria.  
782 *Appl Environ Microbiol* 70:6887–6891.

- 783 55. Heilbronner S, Hanses F, Monk IR, Speziale P, Foster TJ. 2013. Sortase A promotes  
784 virulence in experimental *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Microbiology*.  
785 159:2141-2152.
- 786 56. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM,  
787 Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue  
788 culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.  
789 *J Clin Microbiol* 22:996–1006.
- 790 57. Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, Sesto N, Guet-Revillet H, Balestrino D, Loh E,  
791 Gripenland J, Tiensuu T, Vaitkevicius K, Barthelemy M, Vergassola M, Nahori MA,  
792 Soubigou G, Régnault B, Coppée JY, Lecuit M, Johansson J, Cossart P. 2009. The *Listeria*  
793 transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459:950–956.
- 794
- 795

796

797



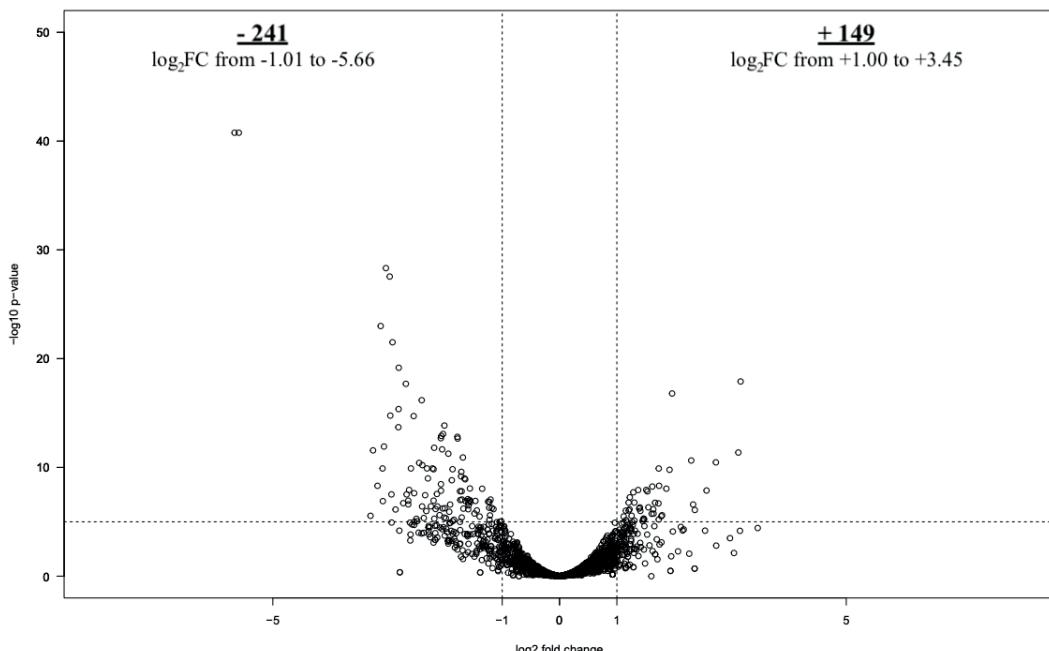
798

799

800 **FIG S1** Volcano plots of proteins differentially expressed of growing cell (OD<sub>600</sub> of 1) of *S. lugdunensis* N920143 compared to  $\Delta agrA$  mutant.  
801

802

803



804

805

806 **FIG S2** Volcano plots of genes differentially expressed of growing cell (OD<sub>600</sub> of 1) of *S.*  
807 *lugdunensis* N920143 compared to  $\Delta agrA$  mutant.

808

809

810

811 **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

812

813 **TABLE S1** List of proteins significantly upregulated and downregulated of growing cell (OD<sub>600</sub>  
814 of 1) of *S. lugdunensis* N920143 compared to  $\Delta agrA$  mutant.

815

816 **TABLE S2** List of all genes differentially expressed in *S. lugdunensis* N920143 cells compared  
817 to  $\Delta agrA$  mutant cells (OD<sub>600</sub> of 1).

818

819 **TABLE S3** Summary of RNAseq results of the samples of *S. lugdunensis* N920143 and  $\Delta agrA$   
820 mutant.

821

822 **TABLE S4** List of oligonucleotides used in this study.

823

824 **FIG S1** Volcano plots of proteins differentially expressed of growing cell (OD<sub>600</sub> of 1) of *S.*  
825 *lugdunensis* N920143 compared to  $\Delta agrA$  mutant.

826

827 **FIG S2** Volcano plots of genes differentially expressed of growing cell (OD<sub>600</sub> of 1) of *S.*  
828 *lugdunensis* N920143 compared to  $\Delta agrA$  mutant.

829

830

## 2.2. Analyse génomique comparative de souches pathogènes et de portage de *S. lugdunensis*

### 2.2.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude

Cette étude représente un travail sur *S. lugdunensis* mené en collaboration avec l'équipe de recherche du GRAM 2.0 de l'Université de Rouen Normandie dans l'article scientifique présenté.

*S. lugdunensis* est une bactérie commensale qui est retrouvée au niveau de la flore cutané de l'Homme. Cependant, il apparaît comme un pathogène émergent puisqu'il est responsable d'infections telles que des infections de la peau et des tissus mous, des infections ostéo-articulaires, des infections liées aux dispositifs médicaux et des EI (Parthasarathy *et al.*, 2020). *S. lugdunensis* fait partie des CoNS, néanmoins il possède un pouvoir pathogène plus proche de celui de *S. aureus* et un degré élevé de virulence similaire à celui de *S. aureus*, le distinguant des autres CoNS (Frank *et al.*, 2008).

À ce jour, il existe peu d'études qui ont décrit les facteurs de virulence présents chez *S. lugdunensis* qui pourraient expliquer une telle pathogénicité chez cette espèce. Des méthodes de typage moléculaire comme la MLST et la MVLST (Multi-Virulence Locus Sequence Typing) sont de plus en plus utilisées pour rechercher un lien potentiel entre les variations génétiques clonales et la virulence. Chez *S. lugdunensis*, une première étude de typage a mis en évidence le caractère clonal de cette espèce et a décrit l'existence de sept CC (Chassain *et al.*, 2012). Ce travail de typage n'a cependant pas permis d'identifier de lien entre la virulence et le contexte clinique des souches. Cela a également été confirmé par une seconde étude basée sur l'étude du polymorphisme de motifs répétés en tandem (Dahyot *et al.*, 2018).

Malgré le faible nombre de génomes complets de *S. lugdunensis* disponibles dans les bases de données, l'étude de la comparaison des génomes entiers chez cette espèce a révélé qu'il est plus proche de celui de *S. aureus* que des autres CoNS, qu'il abrite des EGM, qu'il présente un pan-génome fermé et possède plusieurs systèmes qui limitent le transfert horizontal de gènes (Argemi *et al.*, 2017b ; Argemi *et al.*, 2018).



Les objectifs de cette étude étaient de séquencer le génome complet de trois isolats cliniques pathogènes et de trois souches isolées de portage puis de les comparer aux génomes présents dans la base de données du NCBI (21 souches au total). Le but était de caractériser le pan-génome, le core-génome et le génome accessoire, d'identifier des variations génétiques spécifiques en fonction de l'origine des souches (pathogènes ou de portage) ou des CC, et de rechercher des gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que des facteurs de virulence. Le modèle d'infection larvaire de *G. mellonella* a été utilisé pour la première fois afin d'évaluer la virulence des six souches de *S. lugdunensis*.

Mon travail a consisté à mettre au point un protocole pour évaluer la virulence de plusieurs souches de *S. lugdunensis* en modèle d'infection larvaire de *G. mellonella*. Brièvement, à l'aide d'un injecteur, les larves (de 0,3 g et de 3 cm de long environ) ont été infectées par voie sous-cutanée avec des cellules de *S. lugdunensis* provenant d'une culture de nuit en milieu BHI (Brain Heart Infusion). Les cellules ont été lavées avant injection, et à la suite de différents essais, la dose administrée retenue par larve était de  $3 (\pm 2) \times 10^6$  UFC contenue dans 10 µL de tampon salin stérile. Pour chaque test, 10 insectes ont été infectés et les expériences furent répétées au moins quatre fois. La survie des larves a été surveillée à 1, 2 et 3 jours après l'infection. Comme contrôle, un tampon salin stérile a également été testé dans les mêmes conditions. Les résultats ont été analysés à l'aide d'une étude de variance à sens unique avec une correction de Bonferroni avec le logiciel « R » et une valeur  $p < 0,05$  a été considérée comme significative.

Le séquençage du génome des six souches par la technologie Pacific Biosciences ainsi que l'annotation fonctionnelle des 21 génomes ont révélé la présence de 3077 gènes chez *S. lugdunensis* qui constituent le pan-génome, et parmi la totalité de ces gènes, 2185 sont retrouvés dans le core-génome et 892 dans le génome accessoire. Au sein des gènes qui composent le génome accessoire, la recherche de gènes potentiellement spécifiques des souches pathogènes et de portage a été effectuée, mais aucun locus spécifique n'a été identifié. Ce résultat suggère qu'il n'y a pas de corrélation entre le contenu génétique et la capacité de ces souches à provoquer des infections chez l'homme. Cependant, des gènes spécifiques ont été mis en évidence dans certains CC. En effet, seules les souches appartenant au CC1 possèdent les gènes codant le système CRISPR/Cas et seules les souches du CC6 présentent un système de R-M de type II.



L'analyse génomique a également permis d'identifier des EGM dont cinq nouvelles régions phagiques mais aucun gène de virulence et de résistance n'a été mis en évidence dans ces régions. Fait intéressant, une grande diversité génétique a été observée pour le locus *ess* qui code un SST7 homologue à celui de *S. aureus* impliqué dans la pathogenèse (Warne *et al.*, 2016).

L'étude de la virulence en modèle *G. mellonella* des six souches de *S. lugdunensis* a montré une virulence modérée pour les trois souches de portage et pour la souche isolée d'une infection sur prothèse alors que la virulence était significativement plus importante pour les deux autres souches pathogènes (isolées d'infection de la peau et d'une EI).

Ce travail réalisé en collaboration avec Jérémie Lebeurre dans le cadre de sa thèse de Doctorat a fait l'objet d'une publication présentée dans les pages suivantes.



2.2.2. Publication n°2

**Comparative genome analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows clonal complex-dependent diversity of the putative virulence factor, *ess*/type VII locus.**

Jérémie Lebeurre, Sandrine Dahyot, Seydina Diene, Amandine Paulay, Marion Aubourg, Xavier Argemi, Jean-Christophe Giard, Isabelle Tournier, Patrice François, Martine Pestel- Caron. *Front Microbiol.* 2019;10:2479.





# Comparative Genome Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Shows Clonal Complex-Dependent Diversity of the Putative Virulence Factor, *ess*/Type VII Locus

Jérémie Lebeurre<sup>1\*</sup>, Sandrine Dahyot<sup>2</sup>, Seydina Diene<sup>3</sup>, Amandine Paulay<sup>1</sup>, Marion Aubourg<sup>4</sup>, Xavier Argemi<sup>5</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>4</sup>, Isabelle Tournier<sup>6</sup>, Patrice François<sup>3</sup> and Martine Pestel-Caron<sup>2</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Frank T. Robb,  
University of Maryland, Baltimore,  
United States

### Reviewed by:

Timothy J. Foster,  
Trinity College Dublin, Ireland  
Ben Pascoe,  
University of Bath, United Kingdom  
Simon Hellbrunner,  
University of Tübingen, Germany

### \*Correspondence:

Jérémie Lebeurre  
jeremie.lebeurre@hotmail.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Evolutionary and Genomic  
Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 22 July 2019

Accepted: 15 October 2019

Published: 31 October 2019

### Citation:

Lebeurre J, Dahyot S, Diene S, Paulay A, Aubourg M, Argemi X, Giard J-C, Tournier I, François P and Pestel-Caron M (2019) Comparative Genome Analysis of *Staphylococcus lugdunensis* Shows Clonal Complex-Dependent Diversity of the Putative Virulence Factor, *ess*/Type VII Locus. *Front. Microbiol.* 10:2479. doi: 10.3389/fmicb.2019.02479

*Staphylococcus lugdunensis* is a commensal bacterium of human skin that has emerged as a virulent Coagulase-Negative *Staphylococcus* in both community-acquired and healthcare associated infections. Genotyping methods have shown a clonal population structure of this pathogen but failed to identify hypervirulent lineages. Here, complete genomes of three pathogenic and three carriage *S. lugdunensis* strains were obtained by Single-Molecule sequencing (PacBio) and compared to 15 complete genomes available in GenBank database. The aim was to identify (i) genetic determinants specific to pathogenic or carriage strains or specific to clonal complexes (CCs) defined by MultiLocus Sequence Typing, and (ii) antibiotic resistance genes and new putative virulence factors encoded or not by mobile genetic elements (MGE). Comparative genomic analysis did not show a strict correlation between gene content and the ability of the six strains to cause infections in humans and in a *Galleria mellonella* infection model. However, this study identified new MGEs (five prophages, two genomic islands and one plasmid) and genetic variations of some putative virulence-associated loci, especially in CC3 strains. For a clonal population, high variability and eight CC-dependent genetic organizations were observed for the *ess* locus, which encodes a putative type VII secretion system (T7SS) homologous to that of *S. aureus*. Further phenotypic and functional studies are needed to characterize this particular CC3 and to evaluate the role of T7SS in the virulence of *S. lugdunensis*.

**Keywords:** *Staphylococcus lugdunensis*, genomic comparative analysis, virulence, *ess*/type VII locus, clonal complexes

## INTRODUCTION

*Staphylococcus lugdunensis* is a Coagulase-Negative Staphylococcal species (CoNS) that is a part of the normal human skin flora. However, unlike other CoNS, *S. lugdunensis* exhibits a high degree of virulence similar in some respects to *Staphylococcus aureus* (Frank et al., 2008).

*Staphylococcus lugdunensis* is responsible for infections ranging from minor skin and soft tissue infections (Bocher et al., 2009; Arias et al., 2010) to invasive diseases such as infective endocarditis (Non and Santos, 2017), bone and joint infections (Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016; Argemi et al., 2017a), prosthetic device-infections (Anguera, 2005; Shah et al., 2010) and vascular catheter-related infections (Ebright et al., 2004), both in healthy host and immune-compromised patients. One of the characteristics of *S. lugdunensis* infections is the development of deep-seated abscess lesions that cannot be cleared without surgical intervention associated with effective antibiotic therapy (Arias et al., 2010). Interestingly, few virulence factors have been described to date to explain the high ability of *S. lugdunensis* to cause acute and suppurative infections, and particularly tissue damage and elevated mortality observed for infections such as infective endocarditis (Anguera, 2005; Sabe et al., 2014).

Several molecular typing methods have been described to search for a potential link between within-species genetic variations and pathogenic potential or virulence. Multi-Locus Sequence Typing (MLST) has shown a clonal population structure of this pathogen (Chassain et al., 2012), and has allowed the description of seven Clonal Complexes (CCs)<sup>1</sup> but failed to identify hypervirulent lineages or clusters specific to carriage strains. Multi-Virulence Locus Sequence Typing (Didi et al., 2014) as well as Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST) recently developed, have confirmed this absence of link between clustering and clinical settings (Dahyot et al., 2018).

Whole-genome sequencing (WGS) has become a powerful tool in microbiology allowing the sequencing of hundreds of *S. aureus* genomes but to date only 15 complete genomes of *S. lugdunensis* are available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The only two studies comparing *S. lugdunensis* whole genomes revealed that the genome (i) is closer to that of *S. aureus* than other CoNS, (ii) harbors mobile genetic elements (MGE) such as prophages and plasmids, but (iii) displays a closed pan-genome and several systems (restriction-modification, toxin/antitoxin and CRISPR/Cas systems) to prevent horizontal gene transfer (Argemi et al., 2017b, 2018).

In this context, we first sequenced the whole genome of three pathogenic and three carriage strains, previously characterized by MLST (Didi et al., 2014) and collected from four geographic origins in France and Sweden. These whole-genome sequences were compared with data from 15 genomes available in the GenBank database to identify genetic variations specific to

pathogenic or carriage strains or to CCs, antibiotic resistance genes and new putative virulence factors carried or not by MGE.

Comparative genomic analysis did not show correlation between gene content and the ability of the six strains to cause infections in humans and in a *Galleria mellonella* infection model. It showed CC-dependent genetic variations of some putative virulence-associated loci among 21 genomes analyzed. Surprisingly for a highly clonal population, a great diversity was observed for the *ess* locus, which putatively encodes a T7SS homologous to that of *S. aureus* in which this multiprotein complex plays a key role in pathogenesis. Indeed, it promotes chronically long-term persistence infections with abscesses, lesions and lethal outcomes in a mouse model (Burts et al., 2005, 2008).

## MATERIALS AND METHODS

### G. mellonella Infection Experiments

Infection of *G. mellonella* larvae with *S. lugdunensis* was performed as previously described (Michaux et al., 2011). Briefly, using a syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, United States), larvae (about 0.3 g and 3 cm in length) were infected subcutaneously with washed cells of *S. lugdunensis* from an overnight culture in Brain Heart Infusion, with  $3(\pm 2) \times 10^6$  CFU per larva administered in 10  $\mu$ l of sterile saline buffer. In each test, 10 insects were infected, and experiments were repeated at least four times. Larval killing was then monitored at 1-, 2- and 3-days post-infection. Sterile saline buffer was also tested under the same conditions as control. Results were analyzed using one-way analysis of variance with a Bonferroni correction with free "R" software. For all comparisons, a *p* value  $< 0.05$  was considered significant.

### Pacific Biosciences Sequencing

The complete genome of three pathogenic and three carriage strains of *S. lugdunensis* previously characterized by MLST and Multi-Virulence Locus Sequence Typing (Chassain et al., 2012; Didi et al., 2014) was sequenced using Single Molecule sequencing Pacific Biosciences technology (Gupta, 2008). Strains SL13, SL29 and SL55 were, respectively, isolated from infective endocarditis, vascular prosthesis infection and skin and soft tissue infection. Carriage strains were isolated from groin (SL118 and 122) and toe (SL117) (van der Mee-Marquet et al., 2003; Bieber and Kahlmeter, 2010). Four strains belonged to CC1 (SL13, SL29, SL117, SL122) and 2 to CC6, as defined by MLST (Chassain et al., 2012; Table 1).

High molecular weight genomic DNA was purified from 20-ml exponential-phase cultures by using genomic-tip-500g kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. DNA was precipitated in isopropanol, extensively washed with cold 75% ethanol and in 1  $\times$  Tris-EDTA buffer. Purity and quantity were assessed by using NanoDrop and Qubit assays, respectively, before size evaluation with a Tape Station (Agilent). DNA was sequenced on a Pacific Biosciences RS system at the Lausanne Genomic Technologies Facility, Center for Integrative Genomics. Using P6-C4 chemistry, libraries of approximately 8–20 kb were

<sup>1</sup><http://bigsdb.web.pasteur.fr/staphlugdunensis>

TABLE 1 | Whole genome sequence content of the 6 *S. lugdunensis* strains sequenced with Pacific Biosciences technology and the 15 *S. lugdunensis* genomes available on NCBI.

Strain	Isolation	ST <sup>a</sup>	CC <sup>b</sup>	Genome size (Mb)	% GC	Genes	Proteins	tRNA	rRNA	tmRNA	N920143 (%)	Phage	Plasmid	CRISPR/CAS <sup>c</sup>	MRS <sup>d</sup>
FDAARGOS222	SSTI	ST24	CC6	2.54	33.7	2479	2373	47	6	1	96.44122%	0	0	–	Type II
VISLISI_22	Infective endocarditis	ST24	CC6	2.58	33.8	2544	2400	70	20	1	97.40251%	1	1	–	Type II
N920143	SSTI	ST1	CC1	2.69	33.8	2675	2541	61	19	1	–	1	0	+	Type I
VISLISI_37	Infective endocarditis	ST1	CC1	2.66	33.8	2615	2480	61	19	1	98.76250%	1	0	+	Type I
VISLISI_27	Material	ST12	CC1	2.65	33.9	2591	2457	91	19	1	96.83107%	0	1	+	Type I
Bursitis	SSTI	ST3	CC3	2.62	33.8	2596	2465	59	19	1	96.40961%	0	0	–	–
FDAARGOS141	Abscess	ST3	CC3	2.61	33.8	2579	2452	59	15	1	95.40504%	0	0	–	–
FDAARGOS377	Abscess	ST3	CC3	2.49	33.8	2443	2338	48	4	1	95.44507%	0	1	–	–
FDAARGOS381	Carnage	ST3	CC3	2.54	33.8	2468	2340	59	16	1	96.40961%	0	0	–	–
Klug93G4	Bacteremia	ST3	CC3	2.56	33.7	2515	2396	59	7	1	94.61263%	0	0	–	–
VISLISI_21	SSTI	ST10	CC6	2.61	33.9	2527	2394	61	19	1	96.56137%	1	0	–	Type II
SL1.55*	Carnage	ST10	CC6	2.53	33.8	2425	2315	52	5	1	96.59604%	0	0	–	Type II
SL1.118*	Carnage	ST27	CC7	2.66	33.9	2604	2471	61	19	1	93.97828%	0	2	+	Type I
C33	Material	ST5	CC5	2.57	33.8	2514	2381	61	19	1	93.55531%	0	0	–	Type I
VISLISI_25	HKU10/01	ST1	CC1	2.66	33.7	2637	2523	56	5	1	97.86123%	1	0	+	Type I
VISLISI_33	Liver abscess	ST6	CC1	2.65	33.9	2601	2469	59	19	1	97.16748%	2	1	+	Type I
SL1.29*	Prosthetic infection	ST1	CC1	2.59	33.6	2547	2427	60	8	1	99.32308%	1	0	+	Type I
SL1.122*	Carnage	ST1	CC1	2.56	33.8	2514	2381	61	19	1	99.32308%	1	0	+	Type I
SL1.17*	Carnage	ST1	CC1	2.60	33.8	2545	2420	56	16	1	99.34146%	2	2	+	Type I
FDAARGOS143	SSTI	ST26	CC7	2.57	33.8	2512	2379	61	19	1	96.61349%	1	0	–	–
SL1.3*	Infective endocarditis	ST6	CC1	2.58	33.7	2527	2415	52	6	1	98.21626%	1	1	+	Type I

<sup>a</sup>Sequence type. <sup>b</sup>Clonal complex. <sup>c</sup>Clustered, regularly interspaced short, palindromic repeat-associated (cas) genes. <sup>d</sup>Modification-restriction system. \*Genomes sequenced in this study. SSTI, skin and soft tissue infection.

generated. Analyses of reads were carried out by using SMRT pipe version 2.3.0 software (Pacific Bioscience). The quality value (QV) threshold for motif calling was set at 30.

### Computational Analysis

In addition to the 6 genomes sequenced by PacBio, 15 complete genomes published or available were retrieved from GenBank for comparative analyses (Supplementary Table S1). All complete genomes were annotated using the software Prokka v1.13 (Seemann, 2014). Genomes were compared using orthologsorter<sup>2</sup> to generate ortholog clustering sequences among the overall 21 strains and to define the pan-genome, the core-, and the accessory-genome of *S. lugdunensis*. Genomes were also compared according to the clinical context (infection vs. carriage) and the CC of strains. A similarity matrix of complete genomes and a phylogenetic tree were created based on the neighbor-joining method with the software BioNumerics v7.6. Sequence Types (STs) and CCs defined by MLST were identified by extracting sequences of genes *aroE*, *dat*, *ddl*, *gmk*, *ldh*, *recA* and *yqiL* (Chassain et al., 2012). STs and CCs were obtained by submission of gene sequences into the international MLST database<sup>3</sup>. The presence of genes encoding restriction enzymes was predicted by comparison and Blastn with datasets of the Restriction Enzyme Database (Roberts et al., 2013).

Integrated prophage regions were identified and annotated by using the online PHAge Search Tool Enhanced Release (PHASTER) (Arndt et al., 2016)<sup>4</sup> with default parameters for the six genomes sequenced by PacBio, the complete genome sequences of the 5 FDAARGOS strains and the Klug93-G4 strain, available on NCBI, and for which no phage has been described to date. PHASTER provided the region length and position of the prophages on the chromosome, their GC content and the most common related phages. Known prophage sequences  $\Phi$ SL1 (Heilbronner et al., 2011),  $\Phi$ SL2,  $\Phi$ SL3,  $\Phi$ SL4 and  $\Phi$ SL5 (Argemi et al., 2017b) were compared with prophage regions identified and Mauve alignments were used to confirm PHASTER results.

Plasmid identification was done by using Prokka v1.13 for annotation of extra-chromosomal contigs obtained by PacBio sequencing and was compared to plasmid sequences retrieved from the NCBI database (pVISLISI\_1, pVISLISI\_2, pVISLISI\_3, pVISLISI\_4 pVISLISI\_5 (Argemi et al., 2017b) and to unnamed plasmid from the FDAARGOS381 strain). Nucleotide sequence similarities were investigated by Blastn to identify the closest related plasmid.

Virulence factors were identified using the Virulence Factors database (VFDB)<sup>5</sup> (Chen et al., 2016) and tBlastn searches were performed to compare the presence or absence of known virulence genes of staphylococci. Comparisons of *agr* and *cap* hypervariable regions were performed by extracting and aligning *agr* and *cap loci* with MUSCLE. Allelic *agr* type-I (*agrSI*-type I, accession number: AF173933) and type-II (*agrSI*-type II, accession number: AF346728) described by Dufour et al. (2002)

were used as reference. The hypervariable regions (*capH* to *capK*) from *S. aureus* *cap8* and *cap5* loci were downloaded from the NCBI database. Phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood method implemented in the PhyML program v3.0.

Resistance genes were identified by using ResFinder v3.1<sup>6</sup> (Zankari et al., 2012). A cutoff of 80% minimum length and 80% identity were used to search for resistance genes in the 21 genomes and plasmids of *S. lugdunensis*.

Comparisons of individual sequences of the *ess locus* were performed on the 21 genomes of *S. lugdunensis* by using Blastn and Blastp against the NCBI database, and were facilitated by using the Artemis Comparison Tool (Carver et al., 2005). T7SS genes and proteins were identified from available genomes of HO 5096 0412 (Accession number HE861097) (Holden et al., 2013) and RJ-ST398 reference strains (Accession number AM990992) (Wang et al., 2016). Pfam database was also used to identify protein domains.

## RESULTS

### *G. mellonella* Infection Experiments

In order to evaluate and compare the virulence of 6 *S. lugdunensis* strains (SL13, SL29, SL55, SL117, SL118 and SL122) under the same conditions *in vivo*, a *G. mellonella* model of infection was used.

As shown in Figure 1, carriage isolates (SL117, SL118, and SL122) as well as the pathogenic isolate SL29 (from vascular prosthesis infection) revealed moderate virulence in this model of infection. After 72 h, 31–87% of the larvae infected by these four isolates were still alive. However, they could not be clustered because statistical analysis displayed significant differences between them ( $p$  values  $<0.05$ ) (Table 2). In contrast, isolates SL13 (from infective endocarditis) and SL55 (from a skin and soft tissue infection) were significantly more virulent than the others since only 4 and 8% of the infected caterpillars survived 3-days post infection, respectively (Figure 1 and Table 2). No mortality was observed for the larvae into which sterile saline buffer was injected (data not shown). Of note, no differences were observed between strains in terms of colony morphology, hemolysis ( $\beta$ -hemolysis on blood agar) and growth characteristics under standard laboratory conditions.

### Pacific Biosciences Genome Sequences and Functional Genome Annotation

PacBio sequencing of 6 *S. lugdunensis* strains resulted in full genome recovery on a single contig with sequence length ranging from 2.53 (SL118) to 2.61 Mb (SL55). Between 67457 (SL55) and 79450 (SL118) post-filter polymerase reads were generated with an average read length ranging from 13.7 (SL55) to 14.8 kb (SL13). The N50 read length was comprised between 19.2 and 22.7 kb, and the average coverage between 272 $\times$  and 367 $\times$ . In addition to the contigs corresponding to

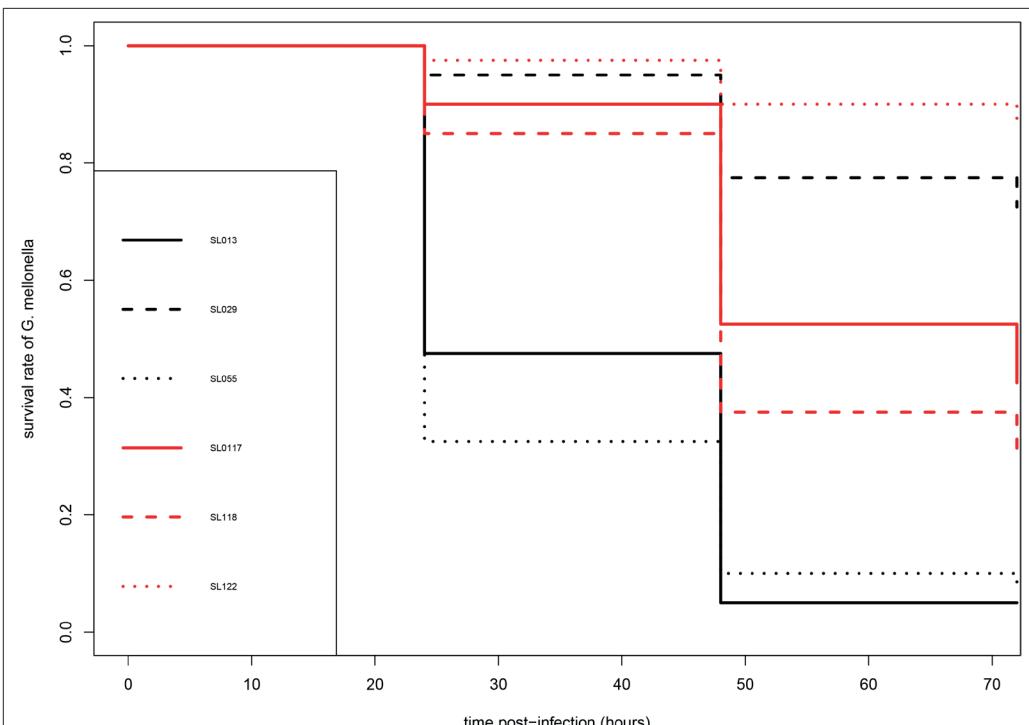
<sup>2</sup><https://git.facom.ufms.br/bioinfo/orthologsorter>

<sup>3</sup><https://bigdb.pasteur.fr/staphlugdunensis/>

<sup>4</sup><http://phaster.ca>

<sup>5</sup><http://www.mgc.ac.cn/VFs>

<sup>6</sup><https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>



**FIGURE 1** | Kaplan-Meier survival curves of infected larvae of *G. mellonella* after infection by *S. lugdunensis* strains. Pathogenic (SL13, SL29, SL55) and carriage (SL117, SL118, SL122) are shown in black and red, respectively.

genomes, 0 (SL29 and SL118) to 3 (SL117) extra-chromosomal contigs were generated.

The complete genome sequences of 15 different *S. lugdunensis* strains available in the NCBI database (Supplementary Table S1) were compared to the six genomes sequenced by PacBio. The size of these 21 complete genomes ranged between 2.53 (SL118) and 2.69 Mb (N920143). All strains presented similar %GC-content (33.6–33.9%). The number of genes automatically predicted by Prokka software ranged from 2443 (FDAARGOS381) to 2675 (N920143) genes encoding between 2338 and 2541 proteins. Genomic data for the 21 strains are shown in Table 1.

### Pan-, Core- and Accessory-Genome Analysis

Pan-genome analysis led to identification of the total gene repertoire of the species and sets of core and accessory genes available in each *S. lugdunensis* genome. The pan-genome of the 21 *S. lugdunensis* strains was found to be composed of a total repertoire of 3077 genes. Of these, 2185 genes (71.01%) were part of the core-genome, and 892 genes (28.99%) were

part of the accessory genome. Based on this analysis, no gene retrieved from the accessory genome belonged only to pathogenic or only to carriage strains. In the same way, no gene was specifically associated with strains isolated from a deep infection such as infectious endocarditis, deep abscess, or device-associated infection.

However, CC-dependent genetic variations were observed. Accessory-genome analysis of CC1 strains revealed that 18 genes were unique to these nine strains. Among them, nine genes were clustered, regularly interspaced, short, palindromic

**TABLE 2** | Pair test statistical comparison (*p* values) of the virulence of 6 strains of *S. lugdunensis* in a *Galleria mellonella* infection model.

	SL13	SL29	SL55	SL117	SL118
SL29	2.14e-10	NA	NA	NA	NA
SL55	1.00	1.71e-10	NA	NA	NA
SL117	5.72e-06	0.11	4.33e-06	NA	NA
SL118	0.0006	0.002	0.0003	1.00	NA
SL122	2.12e-13	1.00	1.52e-13	0.0004	2.68e-06

repeat (CRISPR) and *loci*-associated corresponding to type III-A proteins: Cas1, Cas2, Cas10, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, and Cas6. The *cas* locus from CC1 strains showed a sequence homology of 76% with that of *S. epidermidis* RP62a strain. In all CC1 strains, except strains SL29 and SL122, a potential frameshift is located in the gene encoding the Csm6 protein and probably results in a non-functional CRISPR/Cas system. The remaining nine genes unique to CC1 strains were carried by a transposon and encode arsenical resistance proteins.

Eight genes were unique to CC6 strains. Six of them encode hypothetical proteins but two encode a type II restriction-modification system (RMS). Indeed, we identified a C-5 cytosine-specific DNA methylase and a Type-2 restriction enzyme *Sau3AI* sharing 82% identity with RMS type II from *S. haemolyticus* JCSJ1435 strain. Only 2 genes were found specific to CC7 strains: one encoding a DUF600 protein and one encoding a hypothetical protein. No gene was identified as specific to CC3 strains.

### Mobile Genetic Elements

Five new intact prophage regions named  $\phi$ SL6 to  $\phi$ SL10 were identified by PHASTER analysis for 12 of the 21 strains (Table 3). Prophage regions  $\phi$ SL6,  $\phi$ SL7 and  $\phi$ SL8 were identified in CC1 strains (SL13, SL29, SL117, and SL122) while prophage regions  $\phi$ SL9 and  $\phi$ SL10 were found in CC6 (SL55 and SL118) and CC7 (FDAARGOS143) strains, respectively. The total length of these prophages ranged from 46.6 kb ( $\phi$ SL9) to 49.9 kb ( $\phi$ SL7); they encoded 26–69 proteins. Among these proteins, no virulence factors or antibiotic resistance-associated proteins were identified. However, we identified a putative bifunctional autolysin, a cell wall hydrolase *lytN* precursor, a collagen triple-helix protein and a *LexA* repressor which might be involved in the remodeling of the bacterial cell wall.

Functional annotation by using Prokka on additional contigs led to identification of three plasmids in two of the

six newly sequenced genomes: pSL1 in strain SL13, and pSL2 and pSL3 in strain SL117 (Table 3). The total length of the plasmids identified ranged from 1.9 (pSL3) to 3.9 kb (pSL1); they encode between 4 and 5 proteins. Plasmids pSL2 and pSL3 respectively correspond to cadmium resistance-associated plasmid pLUG10 (Poitevin-Later et al., 1992) and plasmid pVISLISI\_2 (Argemi et al., 2017b) previously described. Of note, no virulence factor was carried on these plasmids but tetracycline and cadmium resistance genes were found.

In addition, we identified a region of 13 kb length restricted to CC1 strains SL13 and VISLISI\_33. Around 5 kb of this region shared a sequence homology of 94% with the pathogenicity islands SaPITokyo11212 and SaPlivm60 of *S. aureus* strains Tokyo11212 and IVM60, respectively. This region encodes an integrase, an excisionase, a primase and a terminase. Other interesting genes were carried by this putative pathogenicity island as those encoding Ear penicillin binding protein, *FhuD* ferrichrome ABC transporter and a protein homologous to part of the *S. aureus* Pathogenicity Island (SAPI) domain.

### Resistome

Several antibiotic resistance-associated genes were identified by using the web tool ResFinder v3.0 (Table 4). A gene homologous (83% identity) to the *fosB* gene of *Bacillus cereus* AS4-12 was identified in the chromosome of all *S. lugdunensis* strains. A penicillin resistance-associated gene, *blaZ* was also identified. This gene was carried by a transposon and found in 7 of the 21 *S. lugdunensis* strains. The *blaZ* gene showed a homology ranging from 92 to 100% with the *blaZ* gene carried by the plasmid pSAP106A of *S. epidermidis*. Otherwise, annotation of the extra-chromosomal contig of SL13 strain led to identification of a *tetK* tetracycline resistance gene which shared 99% identity with *tetK* gene from the plasmid pT181 of *S. aureus*. Of note, no gene of methicillin resistance, within a composite staphylococcal chromosome cassette *mec* element, was found.

**TABLE 3 |** Prophage regions and plasmids identified among 21 genomes of *S. lugdunensis*.

	Prophages					Plasmids		
	$\phi$ SL6	$\phi$ SL7	$\phi$ SL8	$\phi$ SL9	$\phi$ SL10	pSL1	pSL2	pSL3
Host strain	SL13	SL29*, SL117, SL122	SL117	SL55, SL118	F143	SL13	SL117	SL117
Length (kb)	45.9	49.9	49.1	46.6	57	2.7	3.9	1.9
GC%	34.94	35.33	35.3	34.45	35.24	30.59	28.99	31.3
Coding sequences	51	26	62	69	61	4	5	4
Virulence factor gene	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance gene	0	0	0	0	0	<i>tet(k)/tet(L)</i>	<i>cadC</i>	0
Related phage	187	Stb12	CNPx	CNPx	CNPH82	–	–	–
Original host	<i>S. aureus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	–	–	–
Related plasmid	–	–	–	–	–	pSSTET1	pLUG10	pVISLISI_2
Identities with the related plasmid (%)	–	–	–	–	–	99%	98%	100%
Coverage (%)	–	–	–	–	–	100%	48%	100%

\*duplication.

TABLE 4 | Antibiotic resistance-associated genes identified among 21 genomes of *S. lugdunensis* and their genomic location.

Antibiotic	Gene	Strains										Genomic location									
		SL13	SL29	SL55	SL117	SL118	SL122	HKU09-01	N920143	V21	V22	V25	V27	V33	V37	C33	F41	F143	F222	F377	F381
Fosfomycin	fusB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicillin	blaZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fusidic acid	fusD																				
Tetracyclin	terK																				

Finally, we also identified a fusidic acid resistance gene located in a genomic island of 16 kb, only in strain VISLISI\_27. This gene had 91% homology with the *fusB* gene carried by a genomic island (SaRifusB) of the *S. aureus* CS6-EEFIC strain. In addition, in this genomic island, we identified a gene encoding a putative virulence factor, *vapE* (for virulence-associated protein E). *vapE* gene was also found in a genomic island of 40 kb in the genome of strain HKU09-01 with an identity of 85%. However, Blastn comparison of these two genomic islands showed 80% identity for only 3 kb, suggesting that strains VISLISI\_27 and HKU09-01 acquired these regions independently and from different sources.

### Virulome

Analysis of virulence gene composition based on the Virulence Factor Database (VFDB) showed a number of putative virulence factors that were detected in most of the *S. lugdunensis* isolates. To improve the identification of notable features, tblastn searches of well-characterized staphylococcal virulence factors and transcriptional regulators were performed (Table 5). No gene duplication was detected, except in *isd* locus for one strain (HKU09-01) and in *sst* locus for 20 of 21 strains.

The accessory gene regulator (*agr*) locus (*agrA*, *agrB*, *agrC* and *agrD*) was found in all *S. lugdunensis* strains. Phylogenetic analysis based on alignment of the hypervariable *agr* region (*agrB* to *agrC*) led to identification of 2 genetic groups, *agrSl*-types I and II (Supplementary Figure S1A). Of note, all CC3 isolates were clustered with allele *agrSl*-type II whereas all other strains were closer to allele *agrSl*-type I.

In a region of 16 kb in the genome of the 21 *S. lugdunensis* strains, 16 genes homologous to those encoding polysaccharide capsule type 5 or 8 in *S. aureus* were detected (Supplementary Figure S1B). In *S. lugdunensis*, only the central region composed of *capH*, *capI*, *capJ* and *capK* genes, was found different between strains; the 12 other genes of the *cap* locus were conserved. Based on phylogenetic analysis, the *cap* locus of CC3 and VISLISI\_25 strains (CC5) was closer to the *cap8* locus of *S. aureus* while other strains were related to the *cap5* locus.

In the genome of *S. lugdunensis*, up to seven *sls* genes (*slsA* to *slsG*) were identified. Comparative analysis of the predicted *S. lugdunensis* surface (Sls) proteins revealed important diversity between the 21 *S. lugdunensis* strains. The size of SlsA, varying from 1634 to 5228 amino acids, correlated with the number of IgG-like domain ranging from 8 to 45. Sequence comparison of SlsA proteins using Blastp showed 51–52% identity with the Bhp protein of *S. epidermidis* RP62a and 63–64% with a cell wall associated biofilm Bhp/SesD protein from *Staphylococcus caprae* JMUB590. Pfam analysis of these two staphylococcal proteins also showed the presence of a similar IgG-like domain, with 18 (Bhp) and 50 (Bhp/SesD) repeats. Interestingly, *slsA* gene was absent from the genomes of all CC3 isolates and from FDAARGOS377 isolates (CC5), and a nonsense mutation was detected in the *slsA* gene of the isolate FDAARGOS222 (CC6). Furthermore, in the *slsD* gene, a nonsense mutation located upstream of the region coding the LPXTG motif was found in 14 of the 21 *S. lugdunensis*

**TABLE 5** | Comparison of virulence factors among 21 *S. lugdunensis* strains according to clonal complexes (CCs).

(Continued)

TABLE 5 | Continued

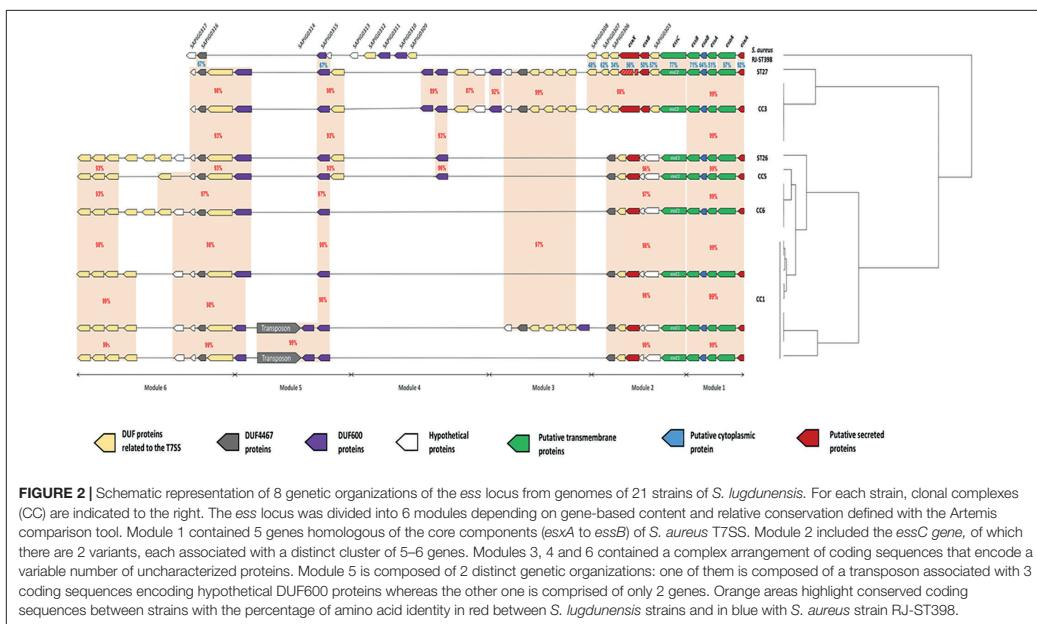
Function	Gene	IDs in N920143	CC1						CC3						CC6						CC7					
			ST1			ST6			ST12			ST3			ST10			ST24			ST26			ST27		
			SL29	SL117	SL122	V37	N920	HKU	SL13	V33	V27	V21	FD141	FD381	FD377	Klug93	SL55	SL118	V22	FD222	FD143	C33	V25			
Iron metabolism	<i>sirA</i> / <i>locus</i>	SLUG_RS00505 to SLUG_RS00515	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>hrsA</i> / <i>locus</i>	SLUG_RS04350 to SLUG_RS04360	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sstA</i> / <i>locus</i>	SLUG_RS10415 to SLUG_RS10445	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sfaA</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>sfaB</i>	SLUG_RS04340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sfaC</i>	SLUG_RS04345	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sfaD</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>isdA</i> / <i>locus</i>	SLUG_RS00440 to SLUG_RS00500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>srdB</i>	SLUG_RS00490	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>hriA</i>	SLUG_RS03295	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>hriB</i>	SLUG_RS03290	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>hsSS</i>	SLUG_RS03285	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>hsRR</i>	SLUG_RS03280	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Host immune evasion	<i>capPS</i>	SLUG_RS01555 to SLUG_RS01630	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5	cap5
	<i>capPG</i>	SLUG_RS02240 to SLUG_RS02230	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>oatA</i>	SLUG_RS02050	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>dtf</i> / <i>locus</i>	SLUG_RS08690 to SLUG_RS09705	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>mpf</i>	SLUG_RS07750	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adherence <i>ica</i> / <i>locus</i>		SLUG_RS00115 to SLUG_RS00130	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(Continued)

TABLE 5 | Continued

Function	Gene	IDs in N920143	CC1			CC3			CC6			CC7			CC5				
			ST1	SL117	SL122	ST6	ST12	V37	ST3	FD141	FD381	FD377	Klug93	SL55	SL118	V22	FD222	FD143	C33
atfL	SLUG_RS09125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
epsS	SLUG_RS07180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fbpA	SLUG_RS08490	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
frA	SLUG_RS02280	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ssaA	SLUG_RS01690	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ssaB	SLUG_RS02320	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ssc	SLUG_RS01870	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sspD	SLUG_RS01695	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
sspE	SLUG_RS12395	FS	FS	FS	FS	FS	FS	FS	FS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sspF	SLUG_RS01465	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sspG	SLUG_RS11265	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MSCRAMMs	ibfI	SLUG_RS08200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	wblI	SLUG_RS11765	+	+	FS	+	+	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lugdunin	lugR	SLUG_RS03939	+	+	FS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	lugA	SLUG_RS03940	+	+	+	+	+	+	+	FS	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	lugB	SLUG_RS03950	+	+	+	+	+	+	FS	FS	FS	+	FS	FS	+	+	0	0	0
	lugC	SLUG_RS03965	+	+	+	+	+	+	FS	FS	FS	+	+	+	+	+	0	0	0
	lugD	SLUG_RS03965	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0

The presence of a putative virulence gene is indicated by "+" while absence is indicated by "0." PS, polysaccharidic; PG, polyglutamic; FS, frameshift; S, non-sens mutation. \* Duplication; NA, not available. Systematic IDs of the genes are those of the *S. lugdunensis* N920143 strain.



**FIGURE 2** | Schematic representation of 8 genetic organizations of the *ess* locus from genomes of 21 strains of *S. lugdunensis*. For each strain, clonal complexes (CC) are indicated to the right. The *ess* locus was divided into 6 modules depending on gene-based content and relative conservation defined with the Artemis comparison tool. Module 1 contained 5 genes homologous of the core components (*esxA* to *esxB*) of *S. aureus* T7SS. Module 2 included the *essC* gene, of which there are 2 variants, each associated with a distinct cluster of 5–6 genes. Modules 3, 4 and 6 contained a complex arrangement of coding sequences that encode a variable number of uncharacterized proteins. Module 5 is composed of 2 distinct genetic organizations: one of them is composed of a transposon associated with 3 coding sequences encoding hypothetical DUF600 proteins whereas the other one is comprised of only 2 genes. Orange areas highlight conserved coding sequences between strains with the percentage of amino acid identity in red between *S. lugdunensis* strains and in blue with *S. aureus* strain RJ-ST398.

strains but was not present in CC3 strains or the VISLISI\_33 strain (CC1). Sequence comparison of SlsD protein sequences using Blastp showed an identity of 40 and 32% with SdrF and SdrG adhesins from *S. epidermidis*, respectively. The size of the SlsE predicted protein sequences varied from 2818 to 4166 amino acids among the 21 *S. lugdunensis* strains. Interestingly, a frameshift was located in the *sleE* gene, upstream of the region encoding the LPXTG motif and was found in all CC1 strains except the strain HKU09-01. The size of the SlsG predicted protein sequences, varying from 1604 to 2286 amino acids, correlated with the Rib repeat number ranging from 7 to 21. A frameshift was located within Rib repeats for VISLISI\_21 and VISLISI\_25 isolates. On the other hand, SlsB, SlsC and SlsF proteins were highly conserved (99–100% of identity) in the 21 *S. lugdunensis* strains.

Of note, notable diversity was observed in *lug* locus encoding a peptide antibiotic (lugdunin). Of the 21 strains, 8 contained a frameshift in one to 2 genes of the *lug* locus while the latter was absent in 2 strains.

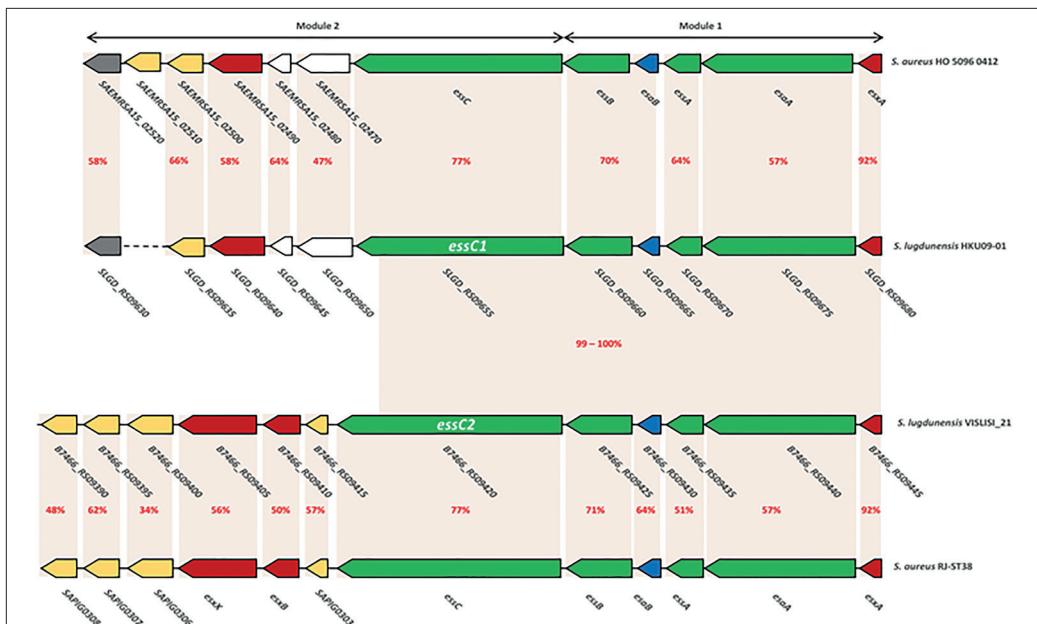
### Description of the CC-Dependent Genetic Diversity of the *S. lugdunensis* *ess* Locus

Comparative genomic analysis showed variations in the size of the *ess* locus of the 21 *S. lugdunensis* isolates. Indeed, *ess* locus size ranged from 22134 bp (HKU09-01) to 38834 bp (SL29 and SL122). This difference was the result of an important polymorphism identified in CC1 strains. For a

better understanding of these variations, we divided the *ess* locus into 6 distinct modules, each based on gene content and relative conservation (Figure 2). Eight genetic organizations were observed.

Module 1 contained five genes present in all sequences analyzed and homologous to genes encoding proteins of T7SS in *S. aureus*: EsxA, EsaA, EsaB, EsaB and EssB. This module was highly conserved among all *S. lugdunensis* strains, with slight modifications in the amino acid sequences of these five proteins (99–100% identity).

Module 2 was variable between *S. lugdunensis* CCs. Indeed, 2 distinct organizations of the *ess* locus were identified: one shared by all CC3 strains and by one CC7 strain (C33), and the other one exhibited by other CC strains (CC1, CC5 and CC6). The first important variation concerned the *essC* gene for which 2 *essC* sequence variants (*essC1* and *essC2*) were observed. The 5' region of the *essC* gene was conserved within all *S. lugdunensis* isolates (3762 bp) whereas the 3' region (around 681 bp) differed according to CCs. The *essC1* variant, identified in 15 strains, encodes a putative protein of 1476 residues whereas the *essC2* variant encodes a putative protein of 1481 amino acids. This latter was only identified in 5 CC3 strains and in one CC7 strain (C33). Of note, *S. lugdunensis* N920143 contained a frameshift in the gene encoding the membrane-associated protein EssC. Otherwise, each *essC* gene variant was associated with its own cluster of genes. *essC1* gene was associated with five genes highly conserved among 15 *S. lugdunensis* isolates while *essC2* gene variant was associated with six genes conserved for six isolates. Conversely, these six



**FIGURE 3 |** Comparison of ess modules 1 and 2 of *S. aureus* HO 5096 0412 and RJ-ST398 strains with HKU09-01 and VISLISI\_21 *S. lugdunensis* strains. Gene-based content and relative conservation defined with the Artemis comparison tool. Orange areas highlight conserved coding sequences between strains with the percentage of amino acid identity in red.

genes shared no identity with the five genes associated with the *essC1* variant (Figure 3).

In modules 3, 4 and 6, a complex arrangement of sequences encoding a variable number of uncharacterized proteins was observed. In particular, an important number of genes which encode proteins containing Domains of Unknown Function (DUFs) were identified. Among them, DUF600 and some others (DUF5079, DUF5080, DUF5020, DUF5084 and DUF505) are suspected to be involved in T7SS on the basis of homology with characterized T7SS systems. The number of genes encoding DUF600 proteins varied from 2 in CC6 strains to 5 in CC3 strains while the number of genes encoding the other DUF proteins ranged from 6 to 11 among all strains (Figure 2).

In module 5, a transposon was found in 4 of the 9 CC1 isolates, associated with genes encoding hypothetical DUF600 proteins (Figure 2).

Here, the comparison focuses on modules 1 and 2 which are the only ones to have a strong homology with those of *S. aureus* (48–92% identity). This was performed on the one hand between the genomes of *S. aureus* HO 5096 0412 and *S. lugdunensis* HKU09-01 strains, and on the other hand between the genomes of *S. aureus* RJ-ST398 and *S. lugdunensis* VISLISI\_21 strains. These 4 strains were chosen to be representative of the diversity of the locus in both species (Figure 3).

Comparative analysis of module 1 showed that *S. lugdunensis* genes *SLGD\_RS09680* (HKU09-01) and *B7466\_RS09445* (VISLISI\_21) which encode a putative secreted protein shared 92% identity with the *ExsA* protein of *S. aureus* strains. This putative protein of 97 amino acids contains a WXG100 domain and a conserved C-terminal hydrophobic pattern for the formation of specific  $\alpha$ -helical surface. Moreover, several putative transmembrane proteins in *S. lugdunensis* HKU09-01 and VISLISI\_21 isolates showed homologies (51–64% identity) with the transmembrane proteins *EsaA*, *EsaA* and *EsaB* of *S. aureus* strains (Tables 6, 7). The *EsaB* cytoplasmic protein of *S. aureus* strains exhibited 64% identity with proteins *SLGD\_RS09065* (HKU09-01) and *B7466\_RS09420* (VISLISI\_21) which contained a *YukD* family domain. Thus, functional analysis of T7SS core components using pfam database allowed the prediction and identification of the same protein domains for *S. aureus* and *S. lugdunensis*.

Then, pairwise comparison of module 2 showed homologous genes and comparable organization (Figure 3 and Tables 6, 7). First, the *essC1* and *essC2* variants of *S. lugdunensis* strains encode proteins sharing 77% identity with the *EssC* proteins of *S. aureus* strains. The putative *EssC* proteins of *S. lugdunensis* contain a N-terminal *FtsK-SpoIIIE* domain for DNA transportation and 2 domains of the *SpoIIIE-FtsK*-like ATPase family, like those of *S. aureus*. Second, in both *S. aureus* and *S. lugdunensis*, variants

**TABLE 6** | Comparison of proteins encoded by ess modules 1 and 2 of *S. aureus* HO 5096 0412 with HKU09-01 *S. lugdunensis* strains.

<i>S. aureus</i> HO 5096 0412 strain			<i>S. lugdunensis</i> HKU09-01 strain			
Proteins	Length (amino acids)	pfam family domain	Proteins	Length (amino acids)	pfam family domain	% identity
EsxA	97	WXG100	SLGD_RS09680	97	WXG100	92%
EsaA	1009	N/A	SLGD_RS09675	1006	N/A	57%
EssA	153	EssA	SLGD_RS09670	144	EssA	64%
EsaB	80	YukD	SLGD_RS09665	80	YukD	70%
EssB	444	YukC	SLGD_RS09660	437	YukC	70%
EssC	1476	FtsK SpollIE N two FtsK SpollIE	SLGD_RS09655	1476	FtsK SpollIE N two FtsK SpollIE	77%
SAEMRSA15_02470	359	N/A	SLGD_RS09650	360	N/A	47%
SAEMRSA15_02480	96	N/A	SLGD_RS09645	96	N/A	64%
SAEMRSA15_02490	420	LXG	SLGD_RS09640	420	LXG	58%
SAEMRSA15_02500	137	DUF5082	SLGD_RS09635	137	DUF5082	66%
SAEMRSA15_02510	157	DUF5083	N/A	N/A	N/A	N/A
SAEMRSA15_02520	124	DUF4467	SLGD_RS09630	127	DUF4467	58%

**TABLE 7** | Comparison of proteins encoded by ess modules 1 and 2 of *S. aureus* RJ-ST398 strains with VISLISI\_21 *S. lugdunensis* strains.

<i>S. aureus</i> RJ-ST398 strain			<i>S. lugdunensis</i> VISLISI_21 strain			
Proteins	Length (amino acids)	pfam family domain	Proteins	Length (amino acids)	pfam family domain	% identity
EsxA	97	WXG100	B7466_RS09445	97	WXG100	92%
EsaA	1009	N/A	B7466_RS09440	1006	N/A	57%
EssA	153	EssA	B7466_RS09435	144	EssA	51%
EsaB	80	YukD	B7466_RS09430	80	YukD	64%
EssB	444	YukC	B7466_RS09425	437	YukC	71%
EssC	1481	FtsK SpollIE N two FtsK SpollIE	B7466_RS09420	1481	FtsK SpollIE N two FtsK SpollIE	77%
SAPIG0303	98	DUF5344	B7466_RS09415	95	DUF5344	57%
EsxB	134	DUF5082	B7466_RS09410	107	DUF5082	50%
EsxX	517	LXG	B7466_RS09405	523	LXG	56%
SAPIG0306	228	DUF5079	B7466_RS09400	223	DUF5079	34%
SAPIG0307	149	DUF5085	B7466_RS09395	150	DUF5085	62%
SAPIG0308	149	DUF5085	B7466_RS09390	151	DUF5085	48%

of the *essC* gene are associated with their own gene cluster. Among putative encoded proteins, there are proteins with a N-terminal LXG domain or a central WXG motif (Tables 6, 7). For example, the putative proteins B7466\_RS09410 and B7466\_RS09405 of *S. lugdunensis* VISLISI 21 have 50% and 56% identity with the EsxB and EsxX proteins of *S. aureus* RJ-ST398, respectively.

(Chassain et al., 2012; Didi et al., 2014) has yet been able to identify invasive clonal complexes as described for *Neisseria meningitidis* (Bratcher et al., 2012) or *Streptococcus pneumoniae* (Dagermann et al., 2008).

The advent of high throughput sequencing technology offers new insights into the identification of determinants associated with bacterial virulence. Before this study, only 15 complete genomes of *S. lugdunensis* were available in GenBank and no comparison between pathogenic and carriage strains had been conducted. In this context, we sequenced the genome of 6 new strains (3 pathogenic and 3 carriage strains) whose virulence was characterized in a *G. mellonella* infection model.

This model has been applied to characterize the virulence and pathogenesis of a wide range of microorganisms (Kavanagh and Reeves, 2004; Ramarao et al., 2012) but has never been implemented for *S. lugdunensis*. Interestingly, our results suggest that this model could be useful for assessing the virulence of *S. lugdunensis* *in vivo* as the SSTI-associated

## DISCUSSION

*Staphylococcus lugdunensis* is associated with a wide range of diseases including skin and soft tissue infections, infective endocarditis and bone and joint infections (Frank et al., 2008). This organism is considered as an opportunistic pathogen which can cause infections with unusual severity compared to other CoNS. This particular virulence is not currently explained by the rare virulence factors described so far, and no typing method

strain (SL55) and the infective endocarditis strain (SL13) were significantly more lethal than the four other isolates. Although insects lack an adaptative immune response, their innate immune response still retains remarkable similarities with the immune response in vertebrates; this allowed to obtain relevant information about the infection process (Kavanagh and Reeves, 2004). In addition, infected larvae can be incubated at 37°C, which favors the study of human pathogenic bacteria (Kavanagh and Reeves, 2004). Of course, these preliminary results must be confirmed in a larger collection of isolates. Although it will not replace mammalian models, the larvae of *G. mellonella* provide a fast and cost-effective alternative to collect initial data.

With the addition of six new *S. lugdunensis* genomes, this study has raised the total number of complete genomes available for comparative purposes from 15 to 21. This result has increased the genetic diversity of the genomic data for this species as these strains were collected from one Swedish and 3 different French cities, whilst 7 of the 15 genomes in GenBank originated from a unique French location (Argemi et al., 2018).

Here, we have characterized the pan-, core- and accessory-genome of the species, particularly according to CCs defined by MLST. Furthermore, we have described the first genomic comparison of carriage and pathogenic strains representative of the major lineages of *S. lugdunensis* to explore whether virulence can be linked to specific genes or genetic variations.

### Presence of MGE Despite a Closed Pan-Genome

Comparative genomic analysis favored a closed pan-genome, as suggested by Heaps' law of extrapolation applied by Argemi et al. (2018). The *S. lugdunensis* pan-genome appeared in fact to be poorly expanding with the inclusion of six new complete genomes reaching a total of only 3077 genes. On the contrary, *S. aureus* and *S. epidermidis* pan-genomes reached more than 3800 genes, with a constant increase when adding new genomes (Argemi et al., 2018). This should be confirmed by the analysis of human *S. lugdunensis* strains from other continents but also of environmental and animal origin.

In this context, it is not surprising that a large number of *S. lugdunensis* strains have barriers to horizontal gene transfer like CRISPR/Cas system or RMS (Argemi et al., 2018). Our study shows that 48% of strains possess a CRISPR/Cas system. These findings confirm the particular status of this species among CoNS. Indeed, Rossi et al. (2017) showed that only 9% (i.e., 3/34) and 3% (i.e., 1/32) of *S. epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains respectively presented characteristic CRISPR/Cas systems. Of note, the CRISPR/Cas system was only found in CC1 strains. This high prevalence may be explained by the fact that most of the sequenced genomes belonged to CC1 strains (9/21, i.e., 43%). This CC is currently over-represented in NCBI in comparison with other CCs (CC3 [5/21, i.e., 24%], CC5 [1/21, i.e., 4%], CC6 [4/21, i.e., 19%] and CC7 [2/21, i.e., 10%]) in

relation to its global distribution (Yeh et al., 2016; Dahyot et al., 2019). It would be interesting to sequence the whole genome of CC2 and CC4 strains, as none are available in the GenBank database.

Despite the presence of CRISPR/Cas immunity systems and several type I and type II RMS, most (15/21, i.e., 71%) of the *S. lugdunensis* strains have acquired MGE probably from other staphylococcal species by horizontal gene transfer. This was particularly observed for CC1 strains. This latter could be explained by a frameshift within the *csm6* gene that might impact the initial role of the CRISPR/Cas system. Indeed, in *S. epidermidis*, the protein Csm6 was found essential for preventing plasmid transformation (Hatoum-Aslan et al., 2014; Jiang et al., 2016). Further investigations in a larger collection of *S. lugdunensis* strains and functional characterization are needed to understand the ability of CRISPR/Cas to prevent MGE acquisition. Another hypothesis would be that MGE may have been present before acquisition of the CRISPR/Cas region. Enriching the database with genomes of ancestral strains would help to resolve this issue.

On the contrary, while CC3 strains do not exhibit CRISPR/Cas systems or RMS, only one plasmid was detected within their genome. This can be related to the great difficulties encountered in genetically manipulating *S. lugdunensis*. The rare mutant strains published were only constructed after the introduction of plasmids by protoplast transformation (Szabados et al., 2011; Marlinghaus et al., 2012) or by electroporation of *Escherichia coli* strains expressing *hsdM/hsdS* RMS genes of *S. lugdunensis*. Interestingly, despite a new electroporation protocol, Heilbronner et al. (2013) highlighted that CC3 and CC4 isolates were harder to transform than CC1, CC2 and CC5 strains. This suggests that other mechanisms may play the role of barrier against the acquisition of MGE in *S. lugdunensis*. Bacteria can display physical barriers such as extracellular polysaccharide substances, including capsules to prevent phage infection (Wilkinson and Holmes, 1979; Labrie et al., 2010). Thus, *cap8* could be involved in the synthesis of capsule in *S. lugdunensis* CC3 strains and act as a protective barrier.

*S. lugdunensis* exhibits a highly conserved antibiotic susceptibility to most anti-staphylococcal antibiotics, which may be related to these different barriers against the integration of foreign DNA (Higaki et al., 1999; McHardy et al., 2017). Indeed, only one plasmid carrying an antibiotic resistance gene (*tetK*) was identified in a newly sequenced genome. Fosfomycin, penicillin and fusidic acid resistance-associated genes were identified with a chromosomal location. Fosfomycin resistance-associated gene was highly conserved among the 21 strains while the distribution of penicillin and fusidic acid resistance genes was variable between isolates. This finding is in accordance with the results of McHardy et al. (2017), who showed that the *blaZ* gene was detected in 39.1% of oxacillin-susceptible *S. lugdunensis* isolates. The presence of the *blaZ* gene was not correlated with CCs.

In this study, no specific virulence determinant was identified in *S. lugdunensis* pathogenic isolates compared to carriage strains. Nevertheless, two genomic islands were only identified in three pathogenic strains. One genomic island of 16 kb carries

fusidic acid resistance *fusB* gene and *vapE* gene which might contribute to bacterial adaptation and virulence (Novick et al., 2010; Chen et al., 2013). A second one of 13 kb, partially homologous to the pathogenicity islands of *S. aureus* (SaPI) (Novick and Subedi, 2007), was found in *S. lugdunensis* strains SL13 (causing infective endocarditis) and VISLISI\_33 (causing liver abscess). In *S. aureus*, SaPIs play an important role in genomic evolution, leading to an increase in its ability to cause severe infections by acquisition of numerous virulence determinants such as pore-forming toxins and superantigens (Malachowa and DeLeo, 2010; Novick and Ram, 2017). In *S. lugdunensis*, no enterotoxin, superantigen or toxic shock syndrome toxin-1 was found in this region. However, an Ear penicillin binding protein and a FhuD ferrichrome ABC transporter were carried by this potential pathogenicity island. *S. aureus* Ear protein may act as a superantigenic exoprotein which could play a role in virulence (Singh et al., 2017). Otherwise, the ferric hydroxamate uptake D (FhuD) protein could be involved in iron acquisition by *S. lugdunensis* as it can promote ferrisiderophore import in *S. aureus* (Beasley et al., 2009) and facilitate heme uptake in blood and serum (Malachowa et al., 2011). Therefore, identification of these genes in the genomes of *S. lugdunensis* suggests that genomic island, other than MGE as bacteriophage or plasmids, could also contribute to the acquisition of antibiotic resistance and virulence genes in this species even if the phenomenon is probably rare (Argemi et al., 2018).

### CC-Dependent Genetic Variations of Putative Virulence-Associated Loci

Based on genomic comparison using VFDB, we identified CC-dependent polymorphisms in several loci (*agr*, *cap*, *sls* and *ess*) putatively associated with *S. lugdunensis* virulence.

Our study shows that all CC3 strains belonged to the *agrSl*-type II whereas all other strains were associated with the allele *agrSl*-type I. However, no link has been shown between *S. lugdunensis* *agr* polymorphisms (*agrSl*-types) and specific clinical infection entities. Many studies have attempted to associate *agr* types with one or more of the biological characteristics of staphylococcal species. Tseng et al. (2015) thus showed that 7 of 11 isolates collected from bacteremia belonging to *agrSl*-type II presented higher hemolytic and protease activities than 4 *agrSl*-type I isolates. In *S. aureus*, *agr* groups have been shown to vary by clonal lineage distribution, antibiotic resistance profile, biofilm formation, expression of virulence factors, and autoinducing peptide structures (Holtfreter et al., 2007; Tan et al., 2018). In addition, Jarraud et al. (2000) have shown that *S. aureus* endocarditis strains were mainly associated with phylogenetic group AF2 (*agr* groups I or II) while phylogenetic group AF1 (*agr* group IV) strains are mainly responsible for generalized exfoliative syndromes and bullous impetigo. Similarly, *agr*-specificity groups in *S. epidermidis* are also associated with specific clinical infections (Hellmark et al., 2013; Harris et al., 2017). The potential impact of this CC-*agrSl*-type association on the regulation of virulence

could be explored by a functional analysis of the *agr* locus in *S. lugdunensis*.

Interestingly, CC3 strains are also distinguished from all other strains by the allele of the *cap* gene (*cap8*). Except for the study of Lambe et al. (1994) that showed that *S. lugdunensis* possessed glycocalyx, no work has yet described the prevalence, composition, diversity and role of the capsule in this species. In *S. aureus*, several studies have shown that serotype 5 or 8 capsular isolates account for approximately 80% of isolates recovered from humans, the remaining isolates being not encapsulated or non-typeable (Arbeit et al., 1984; Roghmann et al., 2005; Cocchiaro et al., 2006). Like *S. aureus*, the genes specifying capsular polysaccharides in *S. lugdunensis* are encoded by a highly conserved *cap* locus including 4 genes, *capHJK*, which may specify chemical diversity among serotypes (O'Riordan and Lee, 2004).

Heilbronner et al. (2011) described 7 genes encoding “*S. lugdunensis* surface proteins” named *SlmA* to *SlSG* within the genome of *S. lugdunensis* N920143 strain. Here, we have shown that several *SlS* proteins were absent or potentially non-functional in some *S. lugdunensis* strains according to CC. These CC-dependent differences could result in variations in the biofilm-forming and adhesion capacities between isolates. Indeed, *SlmA* contains putative protein domains and structural organization homologous to a known cell wall-associated biofilm Bhp protein (Post et al., 2017), which has been shown to promote primary attachment to abiotic surfaces as well as intercellular adhesion during biofilm formation (Cucarella et al., 2001; Bowden et al., 2005). In addition, the *SlmD* protein has putative structural similarity with members of the *Sdr* adhesin family such as *SdrF* and *SdrG*, crucial for the attachment of *S. epidermidis* to surfaces coated with human fibrinogen or type I collagen (Bowden et al., 2005; Arrecubeta et al., 2007). A functional characterization of these *SlS* proteins could be helpful to explore whether they are involved in the ability of *S. lugdunensis* to bind medical devices or biotic surfaces, such as host tissues.

On the other hand, significant genetic variations independent of CCs were detected in the *lug* locus. The impact of this diversity on the production and activity of lugdunine as well as on the structure of the microbiota of ecological niches of *S. lugdunensis* remains to be demonstrated (Zipperer et al., 2016).

### High Genetic Diversity of the *ess*/Type VII Locus, a Potential Key Virulence Determinant

This study provides, to the best of our knowledge, the first description of the CC-dependent genetic organization of the *ess* locus from *S. lugdunensis*. Initially mentioned for one strain of *S. lugdunensis* (Warne et al., 2016), this locus has shown considerable diversity for a clonal species (eight genetic CC-dependent organizations among only 21 strains). Homologous genes of those encoding the six core components of *S. aureus* T7SS were identified among the 21 genomes: the four membrane-associated proteins (*EsaA*, *EssA*, *EssB*, and *EssC*), a soluble cytosolic protein (*EsaB*) and the Early Secreted Antigenic

Target-6 kDa (ESAT-6, also termed EsxA) (Warne et al., 2016; Unnikrishnan et al., 2017). Membrane and cytoplasmic proteins have been demonstrated to be necessary to export effector proteins across the bacterial membrane during host infection (Unnikrishnan et al., 2017), as proteins from the superfamily WXG100 (Burts et al., 2005) or LXG domain-containing proteins (Dai et al., 2017).

Whereas *S. aureus* T7SS can secrete two WXG100 proteins (EsxA, EsxB), only one member of the WXG100 protein superfamily, EsxA, has been identified in *S. lugdunensis*. As for *S. aureus* EsxA, the putative *S. lugdunensis* EsxA protein contains conserved C-terminal hydrophobic patterns HxxxD/ExxhxxxH (where H stands for highly conserved hydrophobic, x for less conserved hydrophobic residues, x for any amino acid and D/E for either aspartic or glutamic acids, respectively). This domain could constitute a key component of T7SS-substrate recognition (Poulsen et al., 2014).

In addition, *S. lugdunensis* possesses a gene encoding a LXG domain-containing protein which is found in a group of polymorphic toxins predicted to use the T7SS pathway (Zhang et al., 2011; Whitney et al., 2017). Thereby, these data highlight the possible extracellular translocation of these proteins. In *S. aureus*, proteins with domain LXG are involved in immune evasion and virulence as the protein EsxX (Dai et al., 2017) or in bacterial competition as the EsaD nuclease (Anderson et al., 2013; Cao et al., 2016). Of note, no gene homologous to the *esaD* gene encoding the anti-bacterial toxin with a C-terminal nuclease domain was identified within the genome of *S. lugdunensis* strains.

A great diversity in the genetic organization of the *ess* locus was described by Warne et al. (2016) in 153 *S. aureus* isolates belonging to different CCs. They showed that the *S. aureus* *essC* gene exhibited 4 sequence variants, each associated with a specific cluster of 4–6 different genes. In *S. aureus*, the *essC4* variant (homologous to the *S. lugdunensis* *essC1* variant) was only found in CC22 isolates whereas the *essC2* variant (homologous to the *S. lugdunensis* *essC2* variant) was identified in CC15 and ST398 strains. In *S. lugdunensis*, a strong association between CCs and *essC* variants was also observed. These results suggest that *S. lugdunensis* strains may have acquired these regions independently and from different sources.

Moreover, genetic diversity was observed downstream of modules 1 and 2, based on (i) a variable number of genes encoding uncharacterized proteins, (ii) the presence of a cluster of 7 genes specific to CC1 and CC3, (iii) the insertion of a transposon in CC1 strains, and (iv) the variable copy number of genes encoding DUP600 proteins. The mechanisms of occurrence of these inter- and intra-CC variations are unclear and need further investigations in a larger collection of *S. lugdunensis* strains, and especially in strains belonging to CC2 and CC4 which could present different organizations of this *locus*.

Thus, we describe here homologs of a large number of genes encoding T7SS in *S. lugdunensis* which shares a high number of clinical features with *S. aureus*, including ability to form

abscesses. *S. lugdunensis* is the sole CoNS to possess all the components required for functional Ess machinery. T7SS could play a key role in abscess development and hence in the currently poorly understood virulence of this bacterial species.

Taken together, these results support the “closed” state of the pan-genome of *S. lugdunensis*, but identification of MGE carrying putative virulence and resistance genes suggests some possible horizontal gene transfers between *S. lugdunensis* and other staphylococcal species. No specific variation or virulence determinant was associated with the pathogenic strains, but the distribution of potential genomic islands constitutes an interesting option to explore in a larger collection of strains. Here, we identified several CC-dependent variations, especially for CC3 strains which showed specific variations in several *loci* potentially associated with virulence. Further phenotypic and functional studies are needed to fully characterize this particular CC and to evaluate the role of T7SS in the virulence of *S. lugdunensis*. Finally, whole genome sequencing of CC2 and CC4 strains is needed for a complete picture of the genetic diversity of *S. lugdunensis*.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be found in the GenBank database, accession: CP041722, CP041723, CP041724, CP041725, CP041726, CP041727.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JL, SDA, PF, and MP-C designed the study. JL, SDA, and AP analyzed the data. J-CG and MA performed the *Galleria mellonella* infection experiments. JL, SDA, and MP-C wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

This study was supported by an educational grant for JL from the Charles Nicolle Foundation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs (Rouen University Hospital) for her help in editing the manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02479/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Anderson, M., Aly, K. A., Chen, Y.-H., and Missiakas, D. (2013). Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*: ESAT-6 secretion in *S. aureus*. *Mol. Microbiol.* 90, 734–743. doi: 10.1111/mmi.12395
- Anguera, I. (2005). *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart* 91:e10. doi: 10.1136/heart.2004.040659
- Arbeit, R. D., Karakawa, W. W., Vann, W. F., and Robbins, J. B. (1984). Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2, 85–91. doi: 10.1016/0732-8893(84)90002-6
- Argemi, X., Dahyot, S., Lebeurre, J., Hansmann, Y., Ronde Oustau, C., and Prevost, G. (2017a). *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. *Méd. Mal. Infect.* 47, 498–501. doi: 10.1016/j.medmal.2017.05.005
- Argemi, X., Martin, V., Loux, V., Dahyot, S., Lebeurre, J., Guffroy, A., et al. (2017b). Whole genome sequencing of 7 strains of *Staphylococcus lugdunensis* allows identification of mobile genetic elements. *Genome Biol. Evol.* 9:77. doi: 10.1093/gbe/evx077
- Argemi, X., Matelska, D., Ginalski, K., Riegel, P., Hansmann, Y., Bloom, J., et al. (2018). Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-genome and multiple barriers to horizontal gene transfer. *BMC Genom.* 19:621. doi: 10.1186/s12864-018-4978-1
- Arias, M., Tena, D., Apellániz, M., Asensio, M. P., Caballero, P., Hernández, C., et al. (2010). Skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus lugdunensis*: report of 20 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* 42, 879–884. doi: 10.3109/00365548.2010.509332
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., et al. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44, W16–W21. doi: 10.1093/nar/gkw387
- Arrecubierta, C., Lee, M.-H., Macey, A., Foster, T. J., and Lowy, F. D. (2007). Sdrf, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *J. Biol. Chem.* 282, 18767–18776. doi: 10.1074/jbc.M610940200
- Beasley, F. C., Vinés, E. D., Grigg, J. C., Zheng, Q., Liu, S., Lajoie, G. A., et al. (2009). Characterization of staphylociferin a biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 72, 947–963. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06698.x
- Bieber, L., and Kahlmeter, G. (2010). *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 385–388. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02813.x
- Bocher, S., Tonning, B., Skov, R. L., and Prag, J. (2009). *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community. *J. Clin. Microbiol.* 47, 946–950. doi: 10.1128/JCM.01024-08
- Bowden, M. G., Chen, W., Singvall, J., Xu, Y., Peacock, S. J., Valtulina, V., et al. (2005). Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 1453–1464. doi: 10.1099/mic.0.27534-0
- Bratcher, H. B., Bennett, J. S., and Maiden, M. C. J. (2012). Evolutionary and genomic insights into meningococcal biology. *Future Microbiol.* 7, 873–885. doi: 10.2217/fmb.12.62
- Burts, M. L., DeDent, A. C., and Missiakas, D. M. (2008). EsA substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 69, 736–746. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06324.x
- Burts, M. L., Williams, W. A., DeBord, K., and Missiakas, D. M. (2005). EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1169–1174. doi: 10.1073/pnas.0405620102
- Cao, Z., Casabona, M. G., Kneuper, H., Chalmers, J. D., and Palmer, T. (2016). The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclelease toxin that targets competitor bacteria. *Nat. Microbiol.* 2:16183. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.183
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B. G., and Parkhill, J. (2005). ACT: the artemis comparison tool. *Bioinform. Oxf. Engl.* 21, 3422–3423. doi: 10.1093/bioinformatics/bti553
- Chassain, B., Lemée, L., Didi, J., Thibierge, J.-M., Brisée, S., Pons, J.-L., et al. (2012). Multilocus sequence typing analysis of *staphylococcus lugdunensis* implies a clonal population structure. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3003–3009. doi: 10.1128/JCM.00988-12
- Chen, H.-J., Chang, Y.-C., Tsai, J.-C., Hung, W.-C., Lin, Y.-T., You, S.-J., et al. (2013). New structure of phage-related islands carrying *fusb* and a virulence gene in fusicid acid-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5737–5739. doi: 10.1128/AAC.01433-13
- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., and Jin, Q. (2016). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res.* 44, D694–D697. doi: 10.1093/nar/gkv1239
- Cocchiaro, J. L., Gomez, M. I., Risley, A., Solinga, R., Sordelli, D. O., and Lee, J. C. (2006). Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 59, 948–960. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04978.x
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183, 2888–2896. doi: 10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001
- Dagerhamn, J., Blomberg, C., Browall, S., Sjöström, K., Morfeldt, E., and Henriques-Normark, B. (2008). Determination of accessory gene patterns predicts the same relatedness among strains of *Streptococcus pneumoniae* as sequencing of housekeeping genes does and represents a novel approach in molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 46, 863–868. doi: 10.1128/JCM.01438-07
- Dahyot, S., Lebeurre, J., Argemi, X., François, P., Lemée, L., Prévost, G., et al. (2018). Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and tandem repeat sequence typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*. *Sci. Rep.* 8:11669. doi: 10.1038/s41598-018-30144-y
- Dahyot, S., Lebeurre, J., Laumay, F., Argemi, X., Dubos, C., Lemée, L., et al. (2019). *fbl*-typing of *Staphylococcus lugdunensis*: a frontline tool for epidemiological studies, but not predictive of fibrinogen binding ability. *Front. Microbiol.* 10:1109. doi: 10.3389/fmicb.2019.01109
- Dai, Y., Wang, Y., Liu, Q., Gao, Q., Lu, H., Meng, H., et al. (2017). A Novel ESAT-6 secretion system-secreted protein esxx of community-associated *Staphylococcus aureus* lineage ST398 contributes to immune evasion and virulence. *Front. Microbiol.* 8:819. doi: 10.3389/fmicb.2017.00819
- Didi, J., Lemée, L., Gilbert, L., Pons, J.-L., and Pestel-Caron, M. (2014). Multi-virulence-locus sequence typing of *Staphylococcus lugdunensis* generates results consistent with a clonal population structure and is reliable for epidemiological typing. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3624–3632. doi: 10.1128/JCM.01370-14
- Douiri, N., Hansmann, Y., Lefebvre, N., Riegel, P., Martin, M., Baldeyrou, M., et al. (2016). *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 747–748. doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.031
- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R. P., Bes, M., et al. (2002). High Genetic Variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* Species. *J. Bacteriol.* 184, 1180–1186. doi: 10.1128/JB.184.4.1180-1186.2002
- Ebright, J. R., Penugonda, N., and Brown, W. (2004). Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48, 17–21. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2003.08.008
- Frank, K. L., del Pozo, J. L., and Patel, R. (2008). From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 111–133. doi: 10.1128/CMR.00036-07
- Gupta, P. K. (2008). Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends Biotechnol.* 26, 602–611. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.07.003
- Harris, L. G., Dudley, E., Rohde, H., Frommelt, L., Siemssen, N., Wilkinson, T. S., et al. (2017). Limitations in the use of PSMY, *agr*, RNAII, and biofilm formation as biomarkers to define invasive *Staphylococcus epidermidis* from chronic biomedical device-associated infections. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 307, 382–387. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.08.003
- Hatoum-Aslan, A., Maniv, I., Samai, P., and Marraffini, L. A. (2014). Genetic characterization of antiplasmid immunity through a type III-A CRISPR-Cas system. *J. Bacteriol.* 196, 310–317. doi: 10.1128/JB.01130-13
- Heilbronner, S., Hanses, F., Monk, I. R., Speziale, P., and Foster, T. J. (2013). Sortase a promotes virulence in experimental *staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Microbiology* 159(Pt 10), 2141–2152. doi: 10.1099/mic.0.070292-0
- Heilbronner, S., Holden, M. T. G., van Tonder, A., Geoghegan, J. A., Foster, T. J., Parkhill, J., et al. (2011). Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 322, 60–67. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x

- Hellmark, B., Söderquist, B., Unemo, M., and Nilsson-Augustinsson, Å. (2013). Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, *agr* type, biofilm production, and epidemiology. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 303, 32–39. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.11.001
- Higaki, S., Kitagawa, T., Morohashi, M., and Yamagishi, T. (1999). Distribution and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci from skin lesions. *J. Int. Med. Res.* 27, 191–195. doi: 10.1177/030060059902700406
- Holden, M. T. G., Hsu, L.-Y., Kurt, K., Weinert, L. A., Mather, A. E., Harris, S. R., et al. (2013). A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Res.* 23, 653–664. doi: 10.1101/gr.147710.112
- Holtfreter, S., Grumann, D., Schmudde, M., Nguyen, H. T. T., Eichler, P., Strommenger, B., et al. (2007). Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2669–2680. doi: 10.1128/JCM.00204-07
- Jarraud, S., Lyon, G. J., Figueiredo, A. M. S., Rard, L. G., Vandenesch, F., Etienne, J., et al. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182:6.
- Jiang, W., Samai, P., and Marras, L. A. (2016). Degradation of phage transcripts by CRISPR-associated ribonucleases enables type III CRISPR-Cas immunity. *Cell* 164, 710–721. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.053
- Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 101–112. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002
- Labrie, S. J., Samson, J. E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327. doi: 10.1038/nrmicro2315
- Lambe, D. W., Jeffery, C., Ferguson, K. P., and Cooper, M. D. (1994). Examination of the glycocalyx of four species of *Staphylococcus* by transmission electron microscopy and image analysis. *Microbios* 78, 133–143.
- Lourtet-Hascoët, J., Bicart-See, A., Félicé, M. P., Giordano, G., and Bonnet, E. (2016). *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Infect. Dis.* 51, 56–61. doi: 10.1016/j.ijid.2016.08.007
- Malachowa, N., and DeLeo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3057–3071. doi: 10.1007/s00018-010-0389-4
- Malachowa, N., Whitney, A. R., Kobayashi, S. D., Sturdevant, D. E., Kennedy, A. D., Braughton, K. R., et al. (2011). Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. *PLoS One* 6:e18617. doi: 10.1371/journal.pone.0018617
- Marlinghaus, L., Becker, K., Korte, M., Neumann, S., Gatermann, S. G., and Szabados, F. (2012). Construction and characterization of three knockout mutants of the *fbl* gene in *Staphylococcus lugdunensis*: characterization of isogenic mutants of *fbl*. *APMIS* 120, 108–116. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02819.x
- McHardy, I. H., Veltman, J., Hindler, J., Bruxvoort, K., Carvalho, M. M., and Humphries, R. M. (2017). Clinical and microbiological aspects of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* 55, 585–595. doi: 10.1128/JCM.02092-16
- Michaux, C., Sanguineti, M., Reffuveille, F., Auffray, Y., Postero, B., Gilmore, M. S., et al. (2011). SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 79, 2638–2645. doi: 10.1128/IAI.01132-10
- Non, L. R., and Santos, C. A. Q. (2017). The occurrence of infective endocarditis with *Staphylococcus lugdunensis* bacteraemia: a retrospective cohort study and systematic review. *J. Infect.* 74, 179–186. doi: 10.1016/j.jinf.2016.10.003
- Novick, R. P., Christie, G. E., and Penadés, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 541–551. doi: 10.1038/nrmicro2393
- Novick, R. P., and Ram, G. (2017). Staphylococcal pathogenicity islands—movers and shakers in the genomic firmament. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 197–204. doi: 10.1016/j.mib.2017.08.001
- Novick, R. P., and Subedi, A. (2007). “The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*,” in *Chemical Immunology and Allergy*, ed. G. Marone, (Basel: KARGER), 42–57. doi: 10.1159/000100857
- O’Riordan, K., and Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 218–234. doi: 10.1128/cmr.17.1.218–234.2004
- Poitevin-Later, F., Vandenesch, F., Dyke, K., Fleurette, J., and Etienne, J. (1992). Cadmium-resistance plasmid in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 78, 59–63. doi: 10.1016/0378-1097(92)90288-y
- Post, V., Harris, L. G., Morgenstern, M., Mageiros, L., Hitchings, M. D., Méric, G., et al. (2017). Comparative genomics study of *Staphylococcus epidermidis* isolates from orthopedic-device-related infections correlated with patient outcome. *J. Clin. Microbiol.* 55, 3089–3103. doi: 10.1128/JCM.00881-17
- Poulsen, C., Panjikar, S., Holton, S. J., Wilmanns, M., and Song, Y.-H. (2014). WXG100 protein superfamily consists of three subfamilies and exhibits an  $\alpha$ -helical C-terminal conserved residue pattern. *PLoS One* 9:12. doi: 10.1371/journal.pone.0089313
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., and Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J. Vis. Exp.* 70:e4392. doi: 10.3791/4392
- Roberts, R. J., Carneiro, M. O., and Schatz, M. C. (2013). The advantages of SMRT sequencing. *Genome Biol.* 14:405. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-405
- Roghmann, M., Taylor, K. L., Gupte, A., Zhan, M., Johnson, J. A., Cross, A., et al. (2005). Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *J. Hosp. Infect.* 59, 27–32. doi: 10.1016/j.jhin.2004.07.014
- Rossi, C. C., Souza-Silva, T., Araújo-Alves, A. V., and Giambiagi-deMarval, M. (2017). CRISPR-cas systems features and the gene-reservoir role of coagulase-negative staphylococci. *Front. Microbiol.* 8:1545. doi: 10.3389/fmicb.2017.01545
- Sabe, M. A., Shrestha, N. K., Gordon, S., and 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. doi: 10.1177/2048872614523350
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Shah, N. B., Osmon, D. R., Fadel, H. R., Patel, R., Kohner, P. C., Steckelberg, J. M., et al. (2010). Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1600–1603. doi: 10.1128/JCM.01769-09
- Singh, V. K., Ring, R. P., Aswani, V., Stempfer, M. E., Kislow, J., Ye, Z., et al. (2017). Phylogenetic distribution and expression of a penicillin-binding protein homologue, ean, and its significance in virulence of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 66, 1811–1821. doi: 10.1099/jmm.0.000630
- Szabados, F., Nowotny, Y., Marlinghaus, L., Korte, M., Neumann, S., Kaase, M., et al. (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. doi: 10.1186/1756-0500-4-113
- Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M., and Li, S. (2018). Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system. *Front. Microbiol.* 9:55. doi: 10.3389/fmicb.2018.00055
- Tseng, S.-P., Lin, Y.-T., Tsai, J.-C., Hung, W.-C., Chen, H.-J., Chen, P.-F., et al. (2015). Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteraemia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 48, 397–405. doi: 10.1016/j.jmii.2013.11.006
- Unnikrishnan, M., Constantinidou, C., Palmer, T., and Pallen, M. J. (2017). The enigmatic ess proteins: looking beyond mycobacteria. *Trends Microbiol.* 25, 192–204. doi: 10.1016/j.tim.2016.11.004
- van der Mee-Marguet, N., Achard, A., Mereghetti, L., Danton, A., Minier, M., and Quentin, R. (2003). *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1404–1409. doi: 10.1128/JCM.41.1404-1409.2003
- Wang, Y., Hu, M., Liu, Q., Qin, J., Dai, Y., He, L., et al. (2016). Role of the ESAT-6 secretion system in virulence of the emerging community-associated *Staphylococcus aureus* lineage ST398. *Sci. Rep.* 6:25163. doi: 10.1038/srep25163
- Warne, B., Harkins, C. P., Harris, S. R., Vatsiou, A., Stanley-Wall, N., Parkhill, J., et al. (2016). The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity. *BMC Genomics* 17:222. doi: 10.1186/s12864-016-2426-7
- Whitney, J. C., Peterson, S. B., Kim, J., Pazos, M., Verster, A. J., Radey, M. C., et al. (2017). A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent

- antagonism between gram-positive bacteria. *eLife* 6:e26938. doi: 10.7554/eLife.26938
- Wilkinson, B. J., and Holmes, K. M. (1979). *Staphylococcus aureus* cell surface capsule as a barrier to bacteriophage adsorption. *Infect Immun.* 23, 549–552.
- Yeh, C.-F., Chang, S.-C., Cheng, C.-W., Lin, J.-F., Liu, T.-P., and Lu, J.-J. (2016). Clinical features, outcomes, and molecular characteristics of community- and health care-associated *Staphylococcus lugdunensis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2051–2057. doi: 10.1128/JCM.00847-16
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261
- Zhang, D., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2011). A novel immunity system for bacterial nucleic acid degrading toxins and its recruitment in various eukaryotic and DNA viral systems. *Nucleic Acids Res.* 39, 4532–4552. doi: 10.1093/nar/gkr036
- Zipperer, A., Konnerth, M. C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., et al. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 535, 511–516. doi: 10.1038/nature18634

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

Copyright © 2019 Lebeurre, Dahyot, Diene, Paulay, Aubourg, Argemi, Giard, Tournier, François and Pestel-Caron. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## 2.3. Étude de la réponse à la limitation en fer chez *S. lugdunensis*

### 2.3.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude

Au cours de l'infection, l'acquisition du fer semble essentielle pour la survie et la propagation des bactéries pathogènes dans l'hôte. *S. lugdunensis* fait partie des rares CoNS qui possèdent un système lsd, codé par l'opéron *isd*, similaire à celui de *S. aureus* impliqué dans l'acquisition du fer à partir de l'hème (Heilbronner *et al.*, 2011). Le système lsd permet de lier et d'extraire l'hème présent dans l'hémoglobine qui est ensuite transporté à l'intérieur du cytoplasme bactérien et dégradé afin de libérer le fer nutritif (Haley *et al.*, 2011). L'expression de l'opéron *isd* est induite dans des conditions de limitation en fer chez *S. aureus* et *S. lugdunensis* (Zapotoczna *et al.*, 2012 ; Heilbronner *et al.*, 2016). Ces conditions, qui peuvent être rencontrées lors de la colonisation de l'hôte par les bactéries, sont palliées par l'expression du système lsd. L'utilisation de l'hème comme source de fer par le système lsd permet à *S. aureus* d'induire un degré élevé de virulence (Reniere et Skaar, 2008), cependant un tel rôle dans la virulence de *S. lugdunensis* n'a pas encore été étudié.

Parmi les technologies dites « Omics », la protéomique occupe une place particulière car elle permet d'identifier et de quantifier les protéines produites dans des conditions environnementales spécifiques. Cette approche a permis de fournir une compréhension globale au niveau de la réponse aux stress, la physiologie cellulaire, les interactions hôte-pathogènes, les réseaux de régulation et la virulence chez les staphylocoques (Bonar *et al.*, 2015 ; Hecker *et al.*, 2018).

L'objectif de ce travail était d'étudier les impacts d'une limitation en fer chez *S. lugdunensis* par des approches phénotypique et protéomique dans le but d'identifier le premier protéome de stress. L'intégralité de cette étude a reposé sur la comparaison de la souche *S. lugdunensis* N920143 cultivée en milieu BHI par rapport à la condition de culture en milieu BHI additionné de 350 µM du chélateur de fer DIP représentant ainsi la limitation en fer (Farrand *et al.*, 2015).



L'analyse phénotypique a porté sur l'étude de la croissance, la formation de biofilm, la résistance au stress oxydatif et la virulence en modèle *G. mellonella*. L'infection des larves de *G. mellonella* avec les cellules de *S. lugdunensis* a été réalisée comme décrit dans le chapitre précédent. Les courbes de croissance de la souche *S. lugdunensis* N920143 en milieu BHI et en condition de limitation en fer étaient très similaires, indiquant que le DIP n'est pas toxique pour la bactérie. Cependant une différence de DO finale a été observée : DO finale de 1,3 pour la culture en limitation en fer contre 1,9 pour la culture en milieu BHI. Une complémentation par l'ajout de 2 mM de  $\text{FeSO}_4$  au milieu BHI additionné du DIP a permis de restaurer une DO finale similaire à la condition de culture en milieu BHI seul. La formation de biofilm a été évaluée en utilisant la méthode de coloration au crystal violet et a confirmé que *S. lugdunensis* cultivé en limitation en fer était capable de former un biofilm significativement plus important que lorsqu'il est incubé en milieu BHI. Afin de corrélérer la carence en fer et la résistance au stress oxydatif, des tests de survie en présence de 1 mM d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ont été effectués. La présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  a eu un effet plus délétère sur les cellules de *S. lugdunensis* incubées avec du DIP qu'en milieu BHI sans DIP. De plus, la complémentation par l'ajout du  $\text{FeSO}_4$  a permis de restaurer la résistance de *S. lugdunensis* à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Enfin, l'impact de la limitation en fer sur la pathogénicité de *S. lugdunensis* a été évalué en utilisant le modèle larvaire de *G. mellonella*. Après 72 heures d'infection, le taux de survie des chenilles infectées par *S. lugdunensis* N920143 cultivé en présence de DIP était significativement plus important que le taux de survie des chenilles infectées par des cellules cultivées en milieu BHI, indiquant que la limitation en fer réduit la virulence de *S. lugdunensis*. À noter que les cellules cultivées en milieu BHI avec du DIP et du  $\text{FeSO}_4$  ont présenté une pathogénicité similaire à celle des cellules incubées en milieu BHI seul.

L'analyse protéomique a été réalisée par spectrométrie de masse et a permis d'identifier le protéome de la limitation en fer chez *S. lugdunensis*. Sur la base de l'analyse des courbes de croissance, les protéines ont été extraites à la fin de la phase exponentielle (DO<sub>600</sub> de 1). Un total de 349 protéines, au sein des 2368 protéines potentiellement codées par *S. lugdunensis*, ont été caractérisées comme étant différentiellement exprimées entre la condition de culture en milieu BHI et la condition de culture en milieu BHI avec du DIP. Parmi elles, 222 étaient significativement plus abondantes et 127 étaient moins abondantes dans la condition de limitation en fer (FC > 2 avec  $p$ -value < 0,05). Ces polypeptides se sont avérés être liés à différents métabolismes (acides nucléiques, acides aminés, énergie, ions et protéines) et être impliqués dans la réponse au stress, l'enveloppe cellulaire, le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et la transcription. Comme attendu, certaines protéines jouant un rôle dans la capture et le métabolisme du fer ont été surproduites, telles que celles du système *Isd* (*IsdJGCE*) et deux transporteurs ABC des sidérophores. La faible concentration en fer constitue un stress qui impacte également le métabolisme de la paroi cellulaire car la production de 32 protéines codant des transporteurs ABC a été affectée.



De plus, la protéine codant la sous-unité LugC de la lugdunine impliquée dans la colonisation de *S. lugdunensis* (Zipperer *et al.*, 2016) a été retrouvée en plus faible abondance. Fait notable, la catalase a été identifiée comme l'une des protéines les plus réprimées en limitation en fer. Par ailleurs, deux enzymes liées au métabolisme des nitrates (nitrate réductase et nitrite réductase), le système de régulation à deux composants (NreBC) ainsi que l'oxyde nitrique synthase ont été détectées comme significativement sous-produits. Les protéines SufB et SufD, membres du système de biosynthèse des clusters fer-soufre ont également été observées en tant que protéines dérégulées négativement lorsque les cellules étaient cultivées en condition de limitation en fer. Afin de corrélérer les résultats protéomiques observés avec une éventuelle dérégulation transcriptionnelle, des expériences de RT-qPCR (Reverse Transcription qPCR) ont été réalisées sur les gènes codant des protéines dont les niveaux d'abondance étaient les plus importants ou les plus faibles. Ainsi, l'expression des gènes *isdJ* et *isdB* était significativement induite tandis que l'expression du gène *katA* a été réprimée en condition de limitation en fer.

Cette étude phénotypique et protéomique globale a permis de caractériser la réponse de *S. lugdunensis* à la limitation en fer. Ce stress favorise la formation de biofilm, facilitant ainsi la colonisation, alors qu'il diminue la résistance au stress oxydatif qui pourrait, au moins en partie, expliquer la virulence réduite de *S. lugdunensis* observée dans des conditions de faible teneur en fer. La concentration en fer semble être un élément important pour faire face au stress oxydatif et pour la pathogénicité de *S. lugdunensis*.

Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique présenté dans les pages suivantes.



2.3.2. Publication n°3

**Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*.**

Marion Aubourg, Anne Dhalluin, François Gravey, Marine Pottier, Nicolas Thomy, Benoit Bernay, Didier Goux, Matthieu Martineau, Jean-Christophe Giard. BMC Microbiol. 2020;20(1):328.



## RESEARCH ARTICLE

## Open Access

# Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*



Marion Aubourg<sup>1</sup>, Anne Dhalluin<sup>1</sup>, François Gravey<sup>2</sup>, Marine Pottier<sup>1,2</sup>, Nicolas Thomy<sup>1</sup>, Benoit Bernay<sup>3</sup>, Didier Goux<sup>4</sup>, Matthieu Martineau<sup>1</sup> and Jean-Christophe Giard<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative *Staphylococcus* part of the commensal skin flora but emerge as an important opportunistic pathogen. Because iron limitation is a crucial stress during infectious process, we performed phenotypic study and compared proteomic profiles of this species incubated in absence and in presence of the iron chelator 2,2'-dipyridyl (DIP).

**Results:** No modification of cell morphology nor cell wall thickness were observed in presence of DIP. However iron-limitation condition promoted biofilm formation and reduced the ability to cope with oxidative stress (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In addition, *S. lugdunensis* N920143 cultured with DIP was significantly less virulent in the larvae of *Galleria mellonella* model of infection than that grown under standard conditions. We verified that these phenotypes were due to an iron limitation by complementation experiments with FeSO<sub>4</sub>. By mass spectrometry after trypsin digestion, we characterized the first iron-limitation stress proteome in *S. lugdunensis*. Among 1426 proteins identified, 349 polypeptides were differentially expressed. 222 were more and 127 less abundant in *S. lugdunensis* incubated in iron-limitation condition, and by RT-qPCR, some of the corresponding genes have been shown to be transcriptionally regulated. Our data revealed that proteins involved in iron metabolism and carriers were over-expressed, as well as several ABC transporters and polypeptides linked to cell wall metabolism. Conversely, enzymes playing a role in the oxidative stress response (especially catalase) were repressed.

**Conclusions:** This phenotypic and global proteomic study allowed characterization of the response of *S. lugdunensis* to iron-limitation. We showed that iron-limitation promoted biofilm formation, but decrease the oxidative stress resistance that may, at least in part, explained the reduced virulence of *S. lugdunensis* observed under low iron condition.

**Keywords:** *Staphylococcus lugdunensis*, Iron limitation, Proteomic, Virulence, Oxydative stress

\* Correspondence: [jean-christophe.giard@unicaen.fr](mailto:jean-christophe.giard@unicaen.fr)

<sup>1</sup>Université de Caen Normandie, EA4655 U2RM (équipe «Antibio-résistance»), CHU de Caen, Caen, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

Described for the first time in 1988, *Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) that is part of the normal human skin flora but can cause serious infections similar to those generated by *Staphylococcus aureus* [1, 2]. Recognized as an emerging opportunistic pathogen, *S. lugdunensis* is responsible of acute endocarditis, skin and soft tissue infections, brain abscesses and osteoarticular infections [3]. Some virulence and opportunistic determinants have been identified mainly based on whole-genome analyses and by comparison with other Staphylococci but few of them have been experimentally characterized [4]. Unlike other CoNS such as *Staphylococcus epidermidis*, this bacterium is less frequently retrieved among clinical samples but has a high level of virulence that makes it more similar to *S. aureus* [3]. Notably, *S. lugdunensis* is the only CoNS that has an iron-regulated surface determinant (Isd) system for iron capture and metabolism close to that of *S. aureus* [5]. This Isd system allows binding of hemoglobin with subsequent removal of heme that is transported into the bacterial cytoplasm. Heme is then degraded and nutrient iron is released [2]. In these two Staphylococci species, the *isd* operon is expressed under iron deficiency conditions allowing bacteria to overcome this deficiency encountered during colonization of the host and invasive diseases [6, 7]. During infection, iron acquisition appears essential for survival and spread of pathogens. In *S. aureus*, the use of heme as an iron source through its Isd system contributes to its full virulence but this has not been studied in *S. lugdunensis* yet [8].

However, the ability to adapt and to cope with stresses are important for the virulence of opportunistic pathogens. In response to environmental stimuli, regulatory cascades leads to a fine-tuning of metabolic and virulence genes expression [9, 10]. Among Omics technologies, proteomics occupies a strategic place because it deals with enzymes which are the true effectors of the cellular physiology. Compared to genomic sequences that provide the gene content, proteomic is dedicated to the identification of and quantification of polypeptides occurring under specific environmental conditions. For Staphylococci, this tool has been used to address physiological and pathophysiological questions and allowed to bring comprehensive understanding of stress response, cell physiology, host-pathogen interactions, regulatory networks and virulence [11–13].

In this study, we performed phenotypic and comparative proteomic analysis to identify the iron-limitation proteome in *S. lugdunensis*. These data reflected the better ability to form biofilm and the increased susceptibility to  $H_2O_2$  when cell were iron limited. Moreover, we showed that iron deprivation had a negative impact on the pathogenicity using the larvae of *Galleria mellonella*

model of infection. Under this condition, transporters and enzymes involved in iron metabolism were over expressed whereas proteins linked to the oxidative stress response were less abundant.

## Results

### Impact of iron limitation on growth of *S. lugdunensis* N920143

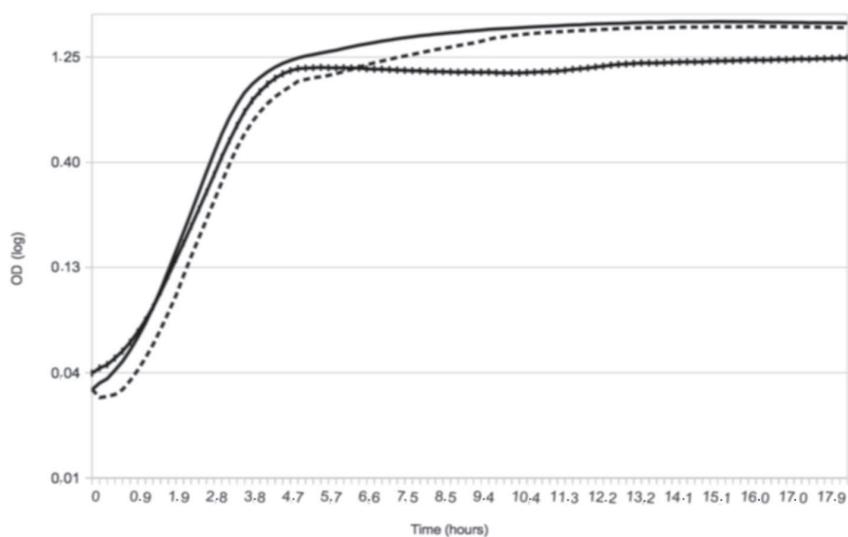
With the aim to perform comparative proteomic analyses with cells harvested at the same point of the growth curve, we first evaluated bacterial growth under different conditions. Growth of *S. lugdunensis* N920143 was studied over 18 h. As shown in Fig. 1, optimal growth rate was very slightly reduced by iron limitation showing that 350  $\mu$ M of iron chelator 2,2'-dipyridyl (DIP) was not toxic for this bacteria. However, in presence of DIP, a slightly reduced cell density in stationary phase was observed. *S. lugdunensis* cells cultivated under iron-limited condition reached a final OD of 1.3 versus 1.9 for cells cultivated in absence of iron chelator ( $p = 1 \times 10^{-4}$ ) (Fig. 1). In order to confirm that the observed phenotype was caused by iron limitation we performed complementation experiments in presence of 2 mM  $FeSO_4$ . As expected, when cells were incubated in BHI with DIP and  $FeSO_4$ , the final OD was similar as bacteria cultivated in BHI (Fig. 1).

### Phenotypical impacts of iron limitation

We first investigated the cell morphology of *S. lugdunensis* N920143 strain, at the onset of stationary phase (OD of 1) and after 24 h in BHI without or with 350  $\mu$ M DIP. High-resolution TEM observations showed similar morphology as well as cell wall thickness (Fig. S1).

We then verified that our experimental condition of iron limitation was correlated to a greater ability to produce biofilm. As shown in Fig. 2, *S. lugdunensis* grown in BHI supplemented with 350  $\mu$ M DIP made significantly more biofilm than when incubated in BHI ( $p = 0.02$ ). After 24 h of culture, the OD were of 0.75 and 0.28 for bacteria cultured in presence and in absence of DIP in BHI, respectively (Fig. 2).

In the attempt to correlate iron-limitation with the ability to cope with oxidative stress, we analyzed the survival of *S. lugdunensis* in presence of lethal dose of  $H_2O_2$ . As shown in Fig. 3, the oxidative stress triggered by the addition of 1 mM  $H_2O_2$  had more significant effect towards cells incubated with iron chelator than bacteria incubated in BHI. After 2 h, 3.5 and 0.4% of cells were viable when incubated without and with DIP, respectively ( $p = 0.033$ ). Moreover, addition of  $FeSO_4$  canceled the effect of the iron chelator (Fig. 3). We also showed that addition of sub-lethal concentration of  $H_2O_2$  (0.4 mM) had much more impact on growth rate

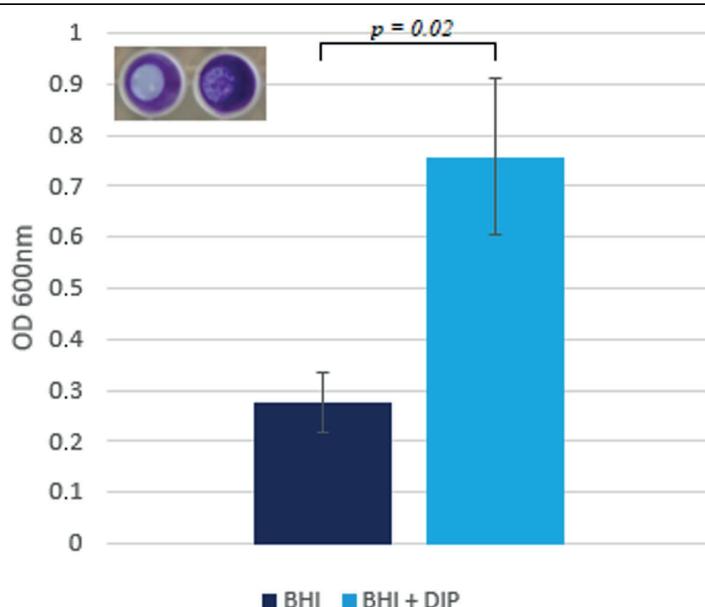


**Fig. 1** Representative growth curves of *S. lugdunensis* N920143 in BHI (continuous line), in BHI with 350  $\mu$ M DIP (dashed line) and in BHI with 350  $\mu$ M DIP and 2 mM FeSO<sub>4</sub> (spaced dashed line)

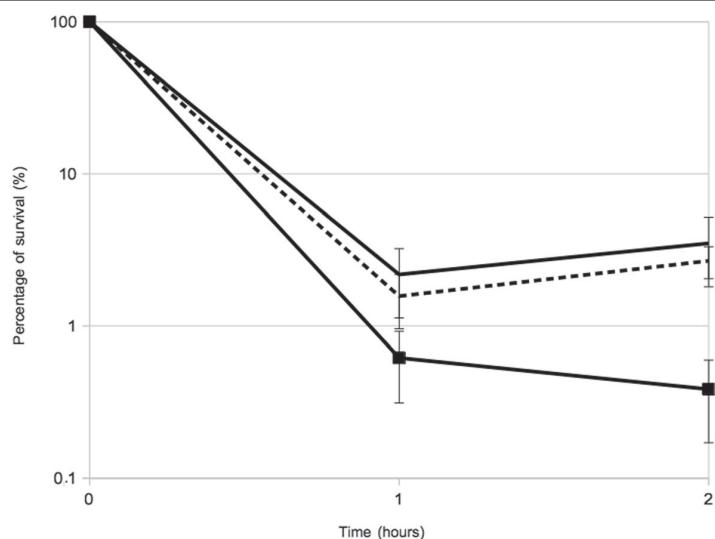
(two fold reduced) for cells grown in presence of DIP (Fig. S2).

It was suspected that iron-limitation condition may affect the pathogenicity of *S. lugdunensis*. Thus, we evaluated the impact of pre-incubation with iron chelator on the virulence of *S. lugdunensis* N920143 using the *G. mellonella* model of infection. Infection caused by *S.*

*lugdunensis* previously cultivated in presence of DIP was significantly less severe than that caused by cells cultivated in BHI (Fig. 4). Indeed, after 72 h post-infection, 14 and 56% of the larvae survived when infected with bacterial cells grown in BHI or in iron-limitation condition, respectively ( $p = 3.4 \times 10^{-6}$ ) (Fig. 4). Note that *S. lugdunensis* grown in BHI with DIP and FeSO<sub>4</sub>



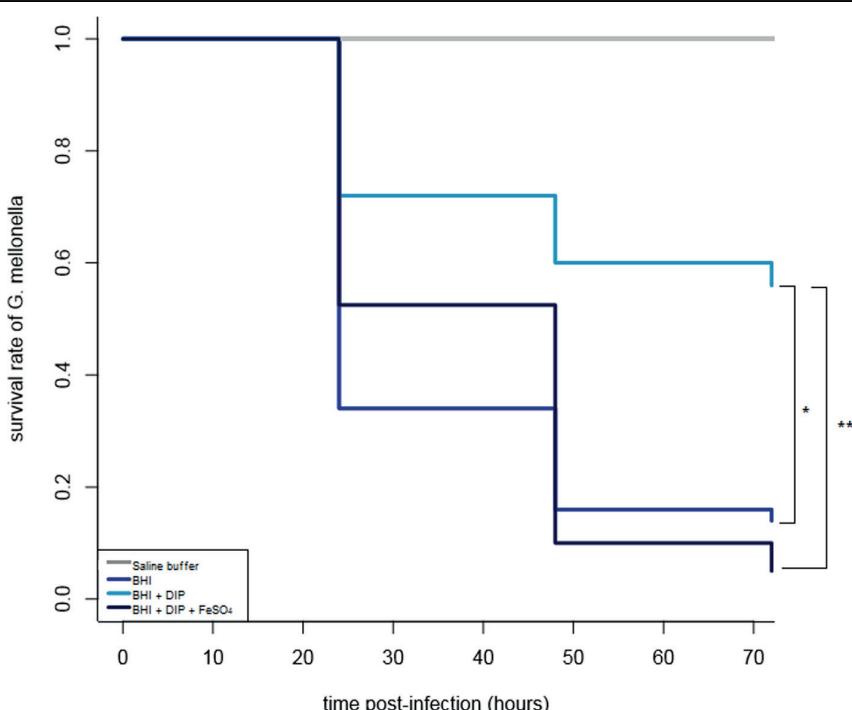
**Fig. 2** Biofilm formation by *S. lugdunensis* after 24 h of growth in BHI without (dark blue bar) or with 350  $\mu$ M DIP (light blue bar). Error bars represent the standard deviations of three independent experiments. Inlay, crystal violet-stained wells (left, cells grown in BHI, right, cells grown in BHI with DIP). A slightly reduced optimal growth rate and cell density in stationary phase were observed for *S. lugdunensis* cells cultivated under iron-limited condition



**Fig. 3** Representative survival curves at 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  of *S. lugdunensis* N920143 in BHI (continuous line), in BHI with 350  $\mu\text{M}$  DIP (hatched continuous line) and in BHI with 350  $\mu\text{M}$  DIP and 2 mM  $\text{FeSO}_4$  (spaced dashed line)

displayed the same pathogenicity as cells incubated in BHI, arguing for a role of iron in these phenotypes (Fig. 4). In addition, to verify that our observations were not due to a reduced fitness of stressed cells, we

inoculated iron-rich medium and iron-limited medium with bacteria previously grown in BHI or BHI with DIP. In all cases, the growth curves were similar (data not shown).



**Fig. 4** Kaplan-Meier survival curves of larvae of *G. mellonella* after infection with around  $1 \times 10^7$  CFU of *S. lugdunensis* previously cultivated in BHI (dark blue line), in BHI supplemented with 350  $\mu\text{M}$  DIP (light blue line), in BHI with 350  $\mu\text{M}$  DIP and 2 mM  $\text{FeSO}_4$  (black), and sterile saline buffer without cells (grey line). \*:  $p = 1 \times 10^{-5}$ . \*\*:  $p = 3.9 \times 10^{-6}$ . In this animal model, virulence of *S. lugdunensis* previously cultivated in presence of DIP was significantly reduced.

### The iron-limitation proteome

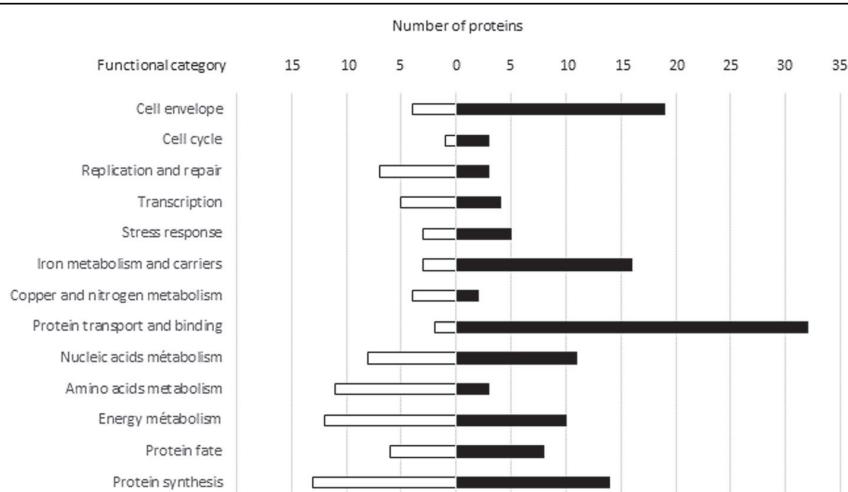
The iron limitation proteome of *S. lugdunensis* N920143 was analyzed by mass-spectrometry after trypsin digestion. Based on growth curve analysis, proteins were extracted from cells grown with or without DIP harvested at the end of the exponential phase (OD of 1). About 1426 of the 2368 proteins potentially coded by the genome have been identified and quantified using protein extracts from three biological replicates. 349 polypeptides appeared differentially expressed by *S. lugdunensis* grown in presence of DIP and were categorized according to their cellular functions (Fig. 5). Among those, 222 were significantly more and 127 less abundant in cells incubated in iron limitation condition (fold changes greater or smaller than 2 with a *p*-value less than 0.05) (Fig. 5, Table S1). 209 polypeptides could be assigned to a specific cellular pathway, and it was possible to detect proteins related to several metabolisms (nucleic acids, amino acids, energy, ions, and proteins), stress response, cell envelope, cell cycle, DNA replication and transcription (Fig. 5).

Not surprisingly, several proteins (*n* = 16) involved in the iron metabolism and carriers were over-produced. Thus, IsdJ, IsdG, IsdC and IsdE (members of Isd system) were 8.7, 8.1, 4.8 and 5.7 fold more abundant, respectively, and two siderophore ABC transporters were more than 7 fold over-expressed (Table S1). Notably, 32 transporter proteins of which a majority were of ABC type, were obviously present in higher amount in cells incubated with DIP (Fig. 5). Despite the lack of alteration in cell morphology or cell wall thickness (Fig. S1), the iron limitation stress condition appeared also effecting cell wall metabolism because nineteen polypeptides involved

in these pathways were more abundant and four less (Fig. 5).

We detected one protein related to virulence (the LugC subunit of the lugdunin) that were 0.7 fold under-produced when iron lacked, suggesting a possible impact on the pathogenicity of *S. lugdunensis*. Moreover, catalase, the major enzyme involved in the oxidative stress response in Staphylococci and known as virulence factor, was one of the most repressed protein identified (3.8 fold), likely reflecting a decrease of resistance to oxidant (Fig. 5). Interestingly, the two enzymes linked to nitrate metabolism (nitrate reductase and nitrite reductase), the cognate two-component regulatory system (NreBC) as well as the nitric oxide synthase were all detected as significantly repressed (between 0.9 to 4.6 fold less abundant). SufB and SufD, two members of the iron-sulfur cluster biosynthetic system were also observed as under-represented proteins (0.5 and 0.8 fold, respectively) when cells were in iron-limitation condition (Fig. 5).

With the aim of knowing whether some of proteins differentially synthesized due to the presence of DIP were under transcriptional regulation, we performed qPCRs for genes coding for proteins showing the highest and lowest levels of abundance excluding enzyme involved in translation that are usually present in high amount into cells. Thus, expressions of genes from the *isd* locus were tested and revealed that transcription of *isdJ* and *isdB* were 183 and 240 fold induced under iron limitation condition, respectively (Table 1). In addition, expression of *katA* (encoding catalase) was more than 6.35 fold reduced corroborating proteomic data. Expression of other genes coding for proteins among the most over and under-expressed also revealed significant



**Fig. 5** Functional classification of proteins significantly upregulated (black bars) and downregulated (white bars) of growing cell (OD of 1) of *S. lugdunensis* N920143 incubated in BHI with 350  $\mu$ M DIP compared to *S. lugdunensis* N920143 in BHI

transcriptional induction and repression, respectively (Table 1). Of note, no transcriptional modification of genes coding for uptake regulatory elements (*fur*, *zur* and *perR*) were observed when cells were incubated with DIP (data not shown).

## Discussion

*S. lugdunensis* most often behaves more like the coagulase-positive *S. aureus* than other CoNS by its apparently high virulence [3]. It can cause various types of infections, ranging from localized to systemic diseases [3]. Although *S. lugdunensis* is recognized as an important pathogen, few studies have been conducted to determine mechanism of its pathogenicity and to identify virulence factors. Iron acquisition has been described as important for the full virulence of *S. aureus* and *S. lugdunensis* is the only CoNS that owns an Isd system responsible for the acquisition of iron from hemoglobin and heme in vivo [5, 7]. In order to analyze the global cellular response triggered by iron limitation, we characterized proteomes of *S. lugdunensis* cells grown in BHI with and without DIP. First, we showed that growth rate and cell morphology were not affected by addition of an iron chelator (DIP) but we observed a reduced cell density in stationary phase. Comparative proteomic study showed that 349 proteins were differentially expressed in presence of DIP out of 1400 polypeptides identified. Several metabolisms were impacted by this condition and enzymes involved in transcriptional regulation (3 more abundant and 5 less) were identified suggesting a complex regulatory network. Our transcriptomic results performed on genes coding for some proteins among those mostly over and under-expressed under iron-limitation condition, suggested that this deregulation mainly occurred at the transcriptional level.

As expected, several proteins involved in iron metabolism and capture were in greater amount when cells were incubated with DIP. Among them, we found members

of the *isd* system, siderophores, as well as membrane associated proteins and ABC transporters. We confirmed that the better ability of *S. lugdunensis* to form biofilm under iron-restricted condition was associated with the induction of *isd* proteins, correlated to a spectacular increase of transcription of *isd* genes. Missineo and collaborators showed an iron-concentration dependence of *IsdC* production and biofilm formation in *S. lugdunensis* with a critical concentrations of 1 to 50  $\mu$ M of  $\text{FeCl}_3$  [14]. *IsdB* captures heme from hemoglobin and transfers it to *IsdC* located into the peptidoglycan. Heme is then transferred to the membrane located transporter *IsdEF* and then broken by oxygenases *IsdG* and *IsdI* leading to releasing free iron in the cytoplasm [6]. As already published, an *isdC* mutant of *S. lugdunensis* was defective in biofilm production due to its role in cells attachment and cell-cell interactions [14]. Nevertheless, the over-production of several transporters likely played also in favor of the increase in biofilm formation by rising the production of extra-cellular compounds [15].

Interestingly, our proteomic analysis showed that the iron limitation condition was also linked to the oxidative stress response in *S. lugdunensis*. Repression of catalase (KatA) (at proteomic and transcriptomic levels) was observed when cells were incubated with DIP and these results were phenotypically validated by a higher susceptibility to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In presence of free iron,  $\text{H}_2\text{O}_2$  can undergo Fenton's reaction leading to the formation of very deleterious hydroxyl radicals [16]. Under iron limitation condition, it appeared that hydrogen peroxide molecules were able of damaging bacterial cells. In bacteria, peroxidase activities are important to escape the host oxidative defenses during the immune response against infectious processes [17]. In *S. aureus*, KatA was correlated with virulence in clinical isolates and appeared required for nasal colonization and may be then qualified as a virulent factor [18, 19]. We also showed repression of *SufB* and *SufD* enzymes from the

**Table 1** Analysis of transcriptional level of selected genes coding for proteins up and down-regulated in *S. lugdunensis* cultivated in BHI with DIP versus grown in BHI

Protein	Gene	Proteomic fold-change <sup>a</sup>	Transcriptomic fold-change	Transcriptomic p-value
Iron-regulated Surface Determinant J	<i>isdJ</i>	8.74	183.64	7.50e-04
Iron-regulated Surface Determinant B	<i>isdB</i>	8.18	240.73	3.19e-05
Iron-siderophore ABC transporter	<i>sirA</i>	7.31	21.24	3.40e-03
Transferin-binding protein	<i>SLUG_14730</i>	7.08	45.84	1.78e-05
Siderophore ABC transporter	<i>sstD</i>	7.06	95.74	4.02e-05
Catalase	<i>katA</i>	-3.83	-6.35	6e-04
Nitrate reductase subunit alpha	<i>narG</i>	-4.65	-1.96	3.81e-02
Formate dehydrogenase subunit alpha	<i>SLUG_07190</i>	-5.04	-2.23	7.24e-03
NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase	<i>nasD</i>	-6.04	-2.21	1.12e-02

<sup>a</sup>from Table S1

SufCDSUB system involved in synthesize of inorganic iron-sulfur (Fe-S) cluster prosthetic groups. In *S. aureus*, Roberts and co-workers revealed that decreased Suf function resulted in global metabolic defects, sensitivity to reactive oxygen species, and in decreased survival in human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) [20]. Among the significantly repressed proteins observed we also found the nitrate reductase, nitrite reductase and the cognate two-component regulatory system (NreBC). These enzymes are involved in degradation of reactive nitrogen species (RNS) allowing bacterial cells to cope with nitrosative stress encountered into phagocytic cells [17]. Moreover, the nitric oxide synthase, under-expressed under iron limitation condition in *S. lugdunensis*, has been shown to protect *S. aureus* against killing by neutrophils, as well as being involved in abscess generation in a mouse subcutaneous infection model [21, 22]. Of note, the decrease of enzymes involved in nitrate/nitrite degradation under low-iron condition may also plays in favor of biofilm formation in *S. lugdunensis* since nitrite (either as product of respiratory nitrate reduction or experimental addition) inhibited *S. aureus* biofilm formation [23]. LugC that is part of the enzymatic complex for the non-ribosomally synthesis of the virulent factor lugdunin in *S. lugdunensis* [24], was less abundant under iron limitation condition. This is in agreement with the observation that *S. lugdunensis* IVK28 was unable to produce this antibacterial substance under iron-limiting conditions in liquid culture [24]. Taken altogether, the reduced expression of these polypeptides may, at least in part, explain the decreased virulence of *S. lugdunensis* incubated with DIP observed in *G. mellonella* model of infection. This animal model is a pertinent tool to study the virulence and pathogenesis of a wide range of microorganisms including *S. lugdunensis* [25, 26]. The larvae of *G. mellonella* have an innate immune system which makes possible to obtain relevant information on the infection process, the breeding is easy and inexpensive and the injected doses of bacterial can be defined. In addition, the larvae can withstand at 37 °C which favors the study of pathogenic bacteria growing at this temperature [26]. Our results revealed that the presence of iron was important for its pathogenicity because infection with bacterial cells pre-incubated in BHI supplemented with DIP significantly increased the worms' survival. Because the iron limitation response led to a reduced ability to cope with oxidative stress, bacteria would become more susceptible to phagocytosis in the hemolymph of caterpillar so less virulent.

## Conclusions

We identified 222 proteins more and 127 less abundant in *S. lugdunensis* incubated under iron-limited condition leading to characterization of the first stress proteome in

this species. Based on these data, further phenotypical studies revealed that iron played a dual role for *S. lugdunensis*: a low iron content promoted biofilm formation, which may be in favor of colonization, whereas these ions were required for virulence and to cope with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this context, our global analysis strongly suggests that enzymes involved in the oxidative stress response could play a key role in the ability to persist in the host.

## Methods

### Bacterial cell and growth conditions

The sequenced *S. lugdunensis* N920143 strain was used in this study (GenBank FR870271) [4]. Overnight cultures of *S. lugdunensis* were diluted 2:100 in Brain Heart Infusion (BHI) without or with 350 μM 2,2'-dipyridyl (DIP) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA) as previously described [2, 27]. For complementation experiments, 2 mM FeSO<sub>4</sub> were added. To test the oxidative stress response, 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. These bacterial suspensions were used to fill the wells of a 96-wells flat-bottom sterile polystyrene microplates. Growth measurements (OD at 600 nm, every 10 min) were performed using the microtiter plate reader Tecan infinite 200 pro (Tecan, Männedorf, Switzerland) and *p*-values were determined using a variance Student *t*-test.

### Transmission electron microscopy

10 ml of bacterial cell cultures at the onset of stationary phase (OD of 1) and after 24 h in BHI without or with 350 μM DIP were centrifuged (5000 × g) for 10 min at 4 °C. Cell pellets were washed twice with saline buffer and then 800 μl of glutaraldehyde solution 1% were added for fixing. Bacteria were visualized on 200-mesh nickel EM grids (mesh diameter of 74 μm) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), coated with 2% Formvar (a polyvinyl formal resin) (Monsanto Chemical Company, St. Louis, MI, USA). All observations were performed at CMABio, the Center for Microscopy Applied to Biology (Caen, France) of Normandy University. Observations were performed on JEO1 1011 transmission electron microscopes operating at 80 kV. Images were acquired with a Gatan Orius 200 camera, and processed with Gatan Digital Micrograph software (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

### Biofilm formation

Overnight cultures of *S. lugdunensis* were diluted to obtain OD of 0.1 in BHI alone or with 350 μM DIP. Sterile polystyrene microplates were loaded with 100 μL of bacterial suspensions and incubated for 24 h at 37 °C. Biofilm formation was detected using the method described by Christensen et al. [28]. Adherent cells were stained with 0.1% crystal violet for 15 min and, after three washings, wells were air dried. For quantitative estimation of the biofilm density, bound crystal violet was solubilized

with 70% ethanol and the absorbance of the solubilized dye was read at 600 nm. Three independent experiments (each in duplicate) were performed and *p*-values were determined using a two-tailed, two-sample unequal variance Student t-test using GraphPad.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> killing assays

Resistance of *S. lugdunensis* N920143 to oxidative killing by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was tested as described by Verneuil et al. with slight modifications [29]. Bacteria were grown 24 h in BHI broth and sub-cultured in 10 ml BHI, BHI with 350 µM DIP or BHI with DIP and 2 mM FeSO<sub>4</sub> broth at a starting density of OD600 at 0.1. Cultures were grown to mid-exponential phase (OD600 = 0.5), final concentration of 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added, placed into a 37 °C water bath. Samples were taken immediately, 1 h and 2 h following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge, and rapidly diluted in 0.9% NaCl. Viability was determined by spreading of appropriate serial dilutions on BHI agar and colony forming units (CFU) were determined after 24 h incubation at 37 °C.

#### Infection experiments

Infection of *G. mellonella* larvae with *S. lugdunensis* was performed as previously described by Lebeurre et al. [26]. Larvae were infected subcutaneously with 10 µl of cells suspensions of *S. lugdunensis* (around 1 × 10<sup>7</sup> CFU) from an overnight culture in BHI, BHI with 350 µM DIP or BHI with DIP and 2 mM FeSO<sub>4</sub>. Prior the injection, bacteria were washed and adjusted at the same concentration in saline buffer to avoid presence of DIP into the host and CFU were counted on agar plates after serial dilutions. For each test, ten insects were infected and the experiments were repeated at least four times. As control, sterile saline buffer were injected to larvae. Larval mortalities were then monitored at one, two and 3 days post-infection. Results were analyzed using a one-way analysis of variance with a Bonferroni correction following "R" packages. For all comparisons, a *p*-value less than 0.05 was considered as significant.

#### Mass-spectrometry analysis, peptide sequencing and protein precursor identification

In order to extract total proteins, 200 ml of bacterial cell culture were centrifuged (6000 × g) for 15 min at 4 °C. Cell pellets were washed twice with recovery buffer (Tris HCl 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, glycerol 15%) and incubated for 12 h at -80 °C. Cell pellets were transferred into screw top tubes containing 500 µl of glass beads. Cells were disrupted using the Fast Prep instrument (MP Biomedical LLC, Santa Ana, CA, USA) for 3 min at 6.5 m/s. The lysate was centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4 °C to remove the cell debris and the supernatant was transferred into a new tube. Proteins were prepared

from three independent biological replicates. The protein dosage was realised using the "Pierce BCA protein assay kit" (Thermofisher, Waltham, MA, USA).

Five µg of each protein extract were first prepared using a modified GASP protocol [30]. Samples were digested with trypsin/Lys-C overnight at 37 °C.

For nano-LC fragmentation, protein or peptide samples were first desalting and concentrated onto a µC18 Omix (Agilent) before analysis. The chromatography step was performed on a NanoElute (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) ultra-high pressure nano flow chromatography system.

MS experiments were carried out on a TIMS-TOF pro mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a modified nano electrospray ion source (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). A 1400 spray voltage with a capillary temperature of 180 °C was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive mode in the mass range from 100 to 1700 m/z. In the experiments described here, the mass spectrometer was operated in PASEF mode with exclusion of single charged peptides. A number of 10 PASEF MS/MS scans was performed during 1.25 s from charge range 2–5.

Mass spectrometry raw files were processed with MaxQuant version 1.6.7.0. MS/MS spectra were searched by the Andromeda search engine against the Uniprot *S. lugdunensis* database. A maximum of two missing cleavages were allowed, the required minimum peptide sequence length was 7 amino acids, and the peptide mass was limited to a maximum of 4600 Da.

Decoy database hits, proteins identified as potential contaminants, and proteins identified exclusively by one site modification were excluded from further analysis. Label-free protein quantification was performed with the MaxLFQ algorithm that allows accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction requiring a minimum ratio count of 1 [31]. All other MaxQuant parameters were kept at their default values. Bioinformatic analysis and visualization was performed in Perseus. Two sample tests were performed using Student's T test with a Permutation-based FDR of 0.05.

#### RNA extraction and RT-qPCR

RNAs were extracted from cells harvested at late-exponential phase and at the same OD of 1. Cells pellets were incubated for 12 h at -80 °C. RNAs were extracted using the "Direct-zol RNA miniprep kit" (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Genomic contaminations were removed by treatment with Turbo DNase according to the manufacturer recommendations (ThermoFisher). For cDNA synthesis, 1 µg of RNAs was reverse transcribed with the "BIORAD iScript Select cDNA synthesis Kit" kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For each condition,

RT-qPCR experiments have been carried out using three independent RNA samples. Primers (5' to 3') are listed in Table S2. For gene expressions, transcript levels were determined by the DeltaDelta Ct method using the *adk* gene as a housekeeping control gene. The Student t-test was used to determine the statistical significance between the samples. For all comparisons, fold changes (FC) > 2 or < -2 with a *p*-value less than 0.05 were considered as significant.

## Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02016-x>.

**Additional file 1: Table S1.** List of proteins significantly upregulated and downregulated of growing cell (OD of 1) of *S. lugdunensis* N920143 incubated in BHI with 350 µM DIP compared to grown in BHI.

**Additional file 2: Table S2.** List of oligonucleotides used in this study.

**Additional file 3: Figure S1.** Electron microscopy photographs of *S. lugdunensis* cells. A-C : Bacteria cultivated in BHI until OD of 1 (A) and during 24h (C). B-D : Bacteria cultivated in BHI with 350 µM DIP until OD of 1 (B) and during 24h (D). No significant difference in morphology and cell wall thickness was observed.

**Additional file 4: Figure S2.** Representative growth curves of *S. lugdunensis* N920143 in BHI (continuous line), in BHI with 350 µM DIP (hatched continuous line), in BHI with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (spaced dashed line) and in BHI with 350 µM DIP and 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tight dashed line).

## Abbreviations

DIP: 2,2'-dipyridyl; CoNS: Coagulase-negative *Staphylococcus*; Isd: Iron-regulated surface determinant; PMNs: Polymorphonuclear neutrophils; RNS: Reactive nitrogen species; BHI: Brain Heart Infusion

## Acknowledgements

The authors warmly thank Michel Auzou, Sébastien Galopin, Sophie Castagnet and Mamadou Godet for technical assistance.

## Authors' contributions

MA conducted the experiments and drafted the manuscript. BB, NT and MM participated to the proteomic and transcriptomic analysis. FG helped for statistical analysis. DG participated to the TEM study. AD and MP contributed in interpreting results data and editing manuscript. JCG supervised all parts of the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

MA and FG works are supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Region Normandy, respectively.

## Availability of data and materials

The LC-MS/MS proteomics data have been deposited to the ProteomeX-change Consortium via the PRIDE [32] partner repository with the dataset identifier PXD021832 (<https://www.ebi.ac.uk/pride>).

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup>Université de Caen Normandie, EA4655 U2RM (équipe «Antibio-résistance»), CHU de Caen, Caen, France. <sup>2</sup>Université de Caen Normandie, GRAM 2.0, CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, France. <sup>3</sup>Plateforme Proteogen SFR ICORE 4206, Université de Caen Normandie, Caen, France. <sup>4</sup>Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, Université de Caen Normandie IFR ICORE, Caen, France.

Received: 17 June 2020 Accepted: 18 October 2020

Published online: 28 October 2020

## References

1. Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int J Syst Micr.* 1988;38(2):168-72.
2. Haley KP, Janson EM, Heilbronner S, Foster TJ, Skaar EP. *Staphylococcus lugdunensis* IsdG liberates iron from host heme. *J Bacteriol.* 2011;193(18):4749-57.
3. 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(1):111-33.
4. Argemi X, Hansmann Y, Prola K, Prévost G. Coagulase-negative *Staphylococci* pathogenomics. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1215.
5. Heilbronner S, Holden MT, 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. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;322(1):60-7.
6. Zapotoczna M, Heilbronner S, Speziale P, Foster TJ. Iron-regulated surface determinant (isd) proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Bacteriol.* 2012;194(23):6453-67.
7. Heilbronner S, Monk IR, Brozyna JR, Heinrichs DE, Skaar EP, Peschel A, 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(8):e1006246.
8. Reniere ML, Skaar EP. *Staphylococcus aureus* heme oxygenases are differentially regulated by iron and heme. *Mol Microbiol.* 2008;69(5):1304-15.
9. Dahyot S, Oxaran V, Niepceron M, Dupart E, Legris S, Destruel L, et al. Role of the lytSR two-component regulatory system in *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation and pathogenesis. *Front Microbiol.* 2020;11:39.
10. Haag AF, Bagnoli F. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;409:145-98.
11. Hecker M, Mäder U, Völker U. From the genome sequence via the proteome to cell physiology - pathoproteomics and pathophysiology of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2018;308(6):545-57.
12. Bonar E, Wójcik I, Władyka B. Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):367-81.
13. Silva KCS, Silva LOS, Silva GAA, Borges CL, Novaes E, Paccez JD, et al. *Staphylococcus saprophyticus* proteomic analyses elucidate differences in the protein repertoires among clinical strains related to virulence and persistence. *Pathogens.* 2020;9(1):69.
14. Missineo A, Di Poto A, Geoghegan JA, Rindi S, Heilbronner S, Gianotti V, et al. IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* induces biofilm formation under low-iron growth conditions. *Infect Immun.* 2014;82(6):2448-59.
15. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:7.
16. Imlay JA, Linn S. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol.* 1986;166(2):519-27.
17. Staerck C, Gastebois A, Vandepitte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, et al. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog.* 2017;110:56-65.
18. Kanafani H, Martin SE. Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 1985;21(4):607-10.
19. Cosgrove K, Coutts G, Jonsson I-M, Tarkowski A, Kokai-Kun JF, Mond JJ, et al. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for

- survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2007;189(3):1025–35.
20. Roberts CA, Al-Tameemi HM, Mashruwala AA, Rosario-Cruz Z, Chauhan U, Sause WE, et al. The suf iron-sulfur cluster biosynthetic system is essential in *Staphylococcus aureus*, and decreased suf function results in global metabolic defects and reduced survival in human neutrophils. *Infect Immun*. 2017;85(6):e00100–17.
21. Green J, Rolfe MD, Smith LJ. Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. *Virulence*. 2014;5(8):794–809.
22. van Sorge NM, Beasley FC, Gusarov I, Gonzalez DJ, von Köckritz-Blickwede M, Anik S, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. *J Biol Chem*. 2013;288(9):6417–26.
23. Schlag S, Nerz C, Birkenstock TA, Altenberend F, Götz F. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J Bacteriol*. 2007;189(21):7911–9.
24. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, et al. Corrigendum: human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*. 2016;539(7628):314.
25. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*. 2012;70:e4392.
26. Lebeurre J, Dahyot S, Diene S, Paulay A, Aubourg M, Argemi X, et al. Comparative genome analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows clonal complex-dependent diversity of the putative virulence factor, ess/type VII locus. *Front Microbiol*. 2019;10:2479.
27. Farrand AJ, Haley KP, Lareau NM, Heilbronner S, McLean JA, Foster T, et al. An iron-regulated autolysin remodels the cell wall to facilitate heme acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. *Infect Immun*. 2015;83(9):3578–89.
28. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985;22(6):996–1006.
29. Verneuil N, Mazé A, Sanguinetti M, Laplace J-M, Benachour A, Auffray Y, et al. Implication of (Mn) superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. *Microbiology*. 2006;152(Pt 9):2579–89.
30. Fischer R, Kessler BM. Gel-aided sample preparation (GASP) - a simplified method for gel-assisted proteomic sample generation from protein extracts and intact cells. *Proteomics*. 2015;15(7):1224–9.
31. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(9):2513–26.
32. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, Inuganti A, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D442–D50.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](http://biomedcentral.com/submissions)



## 2.4. Étude du stimulon de la limitation en fer chez *S. lugdunensis*

### 2.4.1. Objectifs et principaux résultats de l'étude

L'hôte est capable d'appauvrir ses fluides corporels et ses tissus en fer afin de limiter la prolifération bactérienne (Hood et Skaar, 2012). Ainsi, les bactéries pathogènes ont développé des systèmes d'acquisition du fer pour satisfaire leurs besoins nutritionnels en fer. Trois espèces de CoNS, *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae*, possèdent un système Isd similaire à celui retrouvé chez *S. aureus* en termes d'organisation et de séquence (Sun *et al.*, 2020). De plus, un transporteur ABC de type ECF nommé LhaSTA, impliqué dans l'acquisition du fer spécifique de l'hème a uniquement été identifié chez *S. lugdunensis* (Jochim *et al.*, 2020).

L'étude précédente sur le protéome de stress de limitation en fer chez *S. lugdunensis* a permis de mieux comprendre l'impact de la restriction en fer sur la formation de biofilm, la virulence ainsi que la résistance au stress oxydatif chez *S. lugdunensis* (Aubourg *et al.*, 2020). Elle a révélé que le fer pouvait jouer un double rôle chez *S. lugdunensis* : une faible teneur en fer favorise la formation de biofilm, alors que sa présence est nécessaire pour la virulence et pour faire face à la présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Aubourg *et al.*, 2020).

Pour confirmer ce travail, nous avons identifié le stimulon du stress de la limitation en fer chez *S. lugdunensis* par une analyse transcriptomique globale dans le but de mieux comprendre le comportement de ce pathogène opportuniste lorsqu'il est retrouvé dans un environnement carencé en fer.

La technique de RNA-seq a été réalisée pour la souche de *S. lugdunensis* N920143 cultivée dans du milieu BHI, en absence ou en présence de 350  $\mu\text{M}$  de DIP, utilisé comme chélateur de fer (Farrand *et al.*, 2015). L'extraction des ARN a été réalisée à partir de cellules récoltées en fin de phase exponentielle de croissance ( $\text{DO}_{600}$  de 1) et quatre échantillons indépendants pour chaque condition ont été utilisés.



Dans l'ensemble, la limitation en fer chez *S. lugdunensis* N920143 a affecté de manière significative l'expression de 175 gènes, parmi eux 127 étaient régulés positivement et 48 étaient régulés négativement. De plus, 59 produits de ces gènes ont été exprimés de manière différentielle et avec la même évolution dans l'étude protéomique globale réalisée dans les mêmes conditions de stress. Par ailleurs, les gènes impliqués dans les mécanismes de transport correspondent à un tiers des gènes dérégulés. Cette observation a également été mise en évidence dans l'approche protéomique globale (Aubourg *et al.*, 2020). La majorité des gènes régulés positivement était impliquée dans le métabolisme et le transport du fer, les systèmes de transport, la régulation transcriptionnelle et dans la réponse au stress oxydatif, tandis que la plupart des gènes dérégulés négativement était impliquée dans la réponse au stress oxydatif, la virulence, la détoxicification de l'hémine et la régulation transcriptionnelle. Comme observé dans les profils transcriptomiques en condition de restriction en fer chez *S. aureus*, les opérons *isd*, *sir*, *fhu* et *sst* font partie des gènes les plus induits chez *S. lugdunensis*. De plus, des expériences de RT-qPCR en condition de complémentation (par l'ajout de 2 mM de FeSO<sub>4</sub> au milieu BHI additionné du DIP) ont révélé une restauration du niveau de transcription équivalent à celui observé en condition standard de croissance.

Chez *S. lugdunensis*, le système Isd et le système LhaST sont les deux mécanismes connus pour être impliqués dans l'acquisition du fer et sont régulés par le répresseur transcriptionnel Fur (Haley *et al.*, 2011 ; Jochim *et al.*, 2020). Ce dernier joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du fer et exerce sa régulation en se fixant sur des régions d'ADN qui possèdent un motif nommé Fur-box (Price et Boyd, 2020). Dans le but d'identifier les potentiels gènes contrôlés directement par le régulateur Fur, le motif Fur-box (TGATAATNATTATCA, avec trois mésappariements autorisés) (Price et Boyd, 2020) a été recherché parmi l'ensemble des régions promotrices des gènes induits en condition de limitation en fer. Ce motif a été retrouvé en amont de 36 gènes, comprenant les gènes *isdJ*, *isdC*, *isdB* et *lhaS*.



La majorité des gènes surexprimés en condition de limitation en fer était naturellement des gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Plusieurs clusters de gènes ont été identifiés, parmi eux, un groupe de 16 gènes composé des opérons *isd*, *lha* et *sir*, tous les trois déjà décrits comme jouant un rôle dans l'importation du fer (Heilbronner *et al.*, 2011 ; Brozyna *et al.*, 2014 ; Jochim *et al.*, 2020). Il est intéressant de noter qu'un autre transporteur ABC de type ECF a été identifié. Ce système est fortement surexprimé en condition de limitation en fer et semble être codé par trois gènes situés dans un opéron de 13 gènes dont un motif Fur-box palindromique parfait a été retrouvé dans la région promotrice. A noter que 8 produits de ces gènes ont été observés en quantité significativement plus élevée dans l'analyse protéomique globale. Une homologie de séquence (allant de 48,2 % à 52,8 %) a été retrouvée entre les trois gènes de ce nouveau système et les trois gènes de l'opéron *lha* suggérant un rôle de ce nouveau groupe de gènes dans l'acquisition du fer chez *S. lugdunensis*. D'autres clusters de gènes ont été mis en évidence comme étant impliqués dans la réponse à la limitation en fer chez *S. lugdunensis* : l'opéron *efe*, le locus *sst* et un gène codant une synthase de la staphyloferrine A.

Parmi les gènes dérégulés, une recherche a été effectuée afin d'identifier ceux potentiellement impliqués dans la résistance au stress oxydatif, la virulence et la formation de biofilm, dans le but de corrélérer la régulation génétique et les phénotypes observés dans l'étude phénotypique précédemment réalisée. Le gène *katA* et l'opéron *qoxABC*, jouant un rôle dans la résistance au stress oxydatif (Allard *et al.*, 2006 ; Kinkel *et al.*, 2013), ont été réprimés, tandis que le gène *msrA*, impliqué dans le mécanisme de réparation des dommages protéiques (Singh *et al.*, 2018), était surexprimé en limitation en fer chez *S. lugdunensis*. Par ailleurs, le gène *slushA* est le seul gène de virulence identifié dont l'expression était réprimée. Seulement quatre gènes codant des régulateurs transcriptionnels ont été dérégulés en présence du chélateur de fer et sont associés au métabolisme cellulaire qui semble être redirigé par les bactéries pour leur permettre de faire face aux stress. Enfin, les deux gènes les plus réprimés dans cette analyse transcriptomique globale étaient les gènes *hrtA* et *hrtB* qui sont impliqués dans un système d'exportation d'hème permettant de détoxifier les cellules bactériennes lorsqu'elles sont en présence de fer en excès contenu dans la métalloporphyrine (Wakeman *et al.*, 2014).

**Tableau 13 :** Résumé de la présence ou de l'absence de l'opéron *Iha*, du nouvel opéron ECF et de l'opéron *isd* chez *S. lugdunensis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. caprae* et *S. epidermidis*.

Toutes ces données permettent de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle induite par *S. lugdunensis* en réponse à la condition de limitation en fer correspondant à un stress rencontré lors du processus infectieux. *S. lugdunensis* est capable de déclencher plusieurs voies d'acquisition du fer ce qui peut expliquer le caractère opportuniste de ce pathogène. Il apparaît que cette espèce est particulièrement bien équipée en termes de mécanismes liés à l'homéostasie du fer. Le **Tableau 13** illustre cette richesse génétique, comparée à *S. aureus* et aux autres CoNS.

Les résultats de ce travail ont été valorisés par la présentation d'un poster scientifique à l'ECC-MID en juillet 2021 ([Annexe 3](#)).

Ce travail a permis la publication d'un article scientifique présenté dans les pages suivantes.



2.4.2. Publication n°4

**Identification of the iron-limitation stimulon in *Staphylococcus lugdunensis*.**

Marion Aubourg, François Gravey, Anne Dhalluin, Jean-Christophe Giard. 2021. Arch Microbiol 203, 3687–3694.



Archives of Microbiology  
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02342-2>

SHORT COMMUNICATION



## Identification of the iron-limitation stimulon in *Staphylococcus lugdunensis*

Marion Aubourg<sup>1</sup> · François Gravey<sup>2</sup> · Anne Dhalluin<sup>1</sup> · Jean-Christophe Giard<sup>1</sup>

Received: 11 February 2021 / Revised: 16 April 2021 / Accepted: 20 April 2021  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

### Abstract

During the infectious process, pathogens such as *Staphylococcus lugdunensis* have to cope with the condition of host-induced iron-limitation. Using the RNAseq approach, we performed the first global transcriptomic analysis of *S. lugdunensis* cells incubated in the absence and presence of iron chelator. One hundred and seventy-five genes were identified as members of the iron-limitation stimulon (127 up- and 48 downregulated). Six gene clusters known or likely required for the acquisition of iron have been identified. Among them, a novel Energy-Coupling Factor type transporter (ECF), homologous to the *lhaSTA* operon, has been found into a 13-gene putative operon and strongly overexpressed under iron-limitation condition. Moreover, the transcription of genes involved in resistance to oxidative stress (including catalase), virulence, transcriptional regulation, and hemin detoxification were also modified. These data provide some answers on the cellular response to the iron-limitation stress that is important for the opportunistic behavior of this pathogen.

**Keywords** *Staphylococcus lugdunensis* · Iron limitation · Stimulon · RNAseq · Transcriptomic

### Introduction

Iron acquisition is essential for the survival and spread of pathogenic bacteria. In the human body, the most abundant source of iron is sequestered by heme. To release iron, pathogens such as Staphylococci have developed complex ion acquisition systems (Haley et al. 2011; Farrand et al. 2015; Hammer and Skaar 2011; Heilbronner and Foster 2020). Studies have shown that heme is the preferred source of iron

for virulent bacteria upon entering host tissues. In *Staphylococcus aureus*, this acquisition is important for its virulence and enabled by the use of the Iron-regulated surface determinant (Isd) system which captures host hemoglobin with subsequent removal of heme that is then transported into the bacterial cytoplasm (Hammer and Skaar 2011; Sheldon and Heinrichs 2015). It was shown that the coagulase-negative staphylococci (CoNS), *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus capitis*, and *Staphylococcus caprae* encoded the Isd system for iron capture and metabolism close to that of *S. aureus* in terms of organization and sequence (Mazmanian et al. 2002, 2003; Sun et al. 2020). Moreover, a recent study identified an iron-regulated Energy-Coupling Factor (ECF) type transporter in *S. lugdunensis*, *Lha* which is specific for heme, and which functions independently of the canonical heme acquisition Isd system (Jochim et al. 2020). *S. lugdunensis* is also distinguished from other CoNS species due to its virulence. As *S. aureus*, *S. lugdunensis* can lead to many infections such as skin and soft-tissue infections, osteomyelitis, prosthetic joint infections, pneumonia, and meningitis, and is associated with an aggressive form of infective endocarditis with 70% of the patients requiring surgery (Liu et al. 2010; Parthasarathy et al. 2020). Only a few virulent determinants were identified mainly on the basis of whole-genome analyses and comparisons with other Staphylococci

Communicated by Erko Stackebrandt.

✉ Jean-Christophe Giard  
 jean-christophe.giard@unicaen.fr  
 Marion Aubourg  
 marion.aubourg@unicaen.fr  
 François Gravey  
 francois.gravey@unicaen.fr  
 Anne Dhalluin  
 anne.dhalluin@unicaen.fr

<sup>1</sup> EA4655 U2RM (équipe “Antibio-résistance”), CHU de Caen, Université de Caen Normandie, Caen, France

<sup>2</sup> Groupe de Recherche sur l’Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie Univ, Unicaen, Unirouen, GRAM 2.0, 14000 Caen, France

Published online: 13 May 2021

Springer

(Heilbronner et al. 2011; Lebeurre et al. 2019). We recently characterized the iron-limitation stress proteome in *S. lugdunensis*, which provided some keys to explain how a low iron content promotes biofilm formation, virulence, as well as the ability to cope with oxidative stress (Aubourg et al. 2020). To further identify the iron-limitation stress stimulon, a global transcriptomic study by RNAseq was performed. We identified deregulated genes in *S. lugdunensis* incubated with an iron chelator to a better understanding how this opportunistic pathogen deals with this stress condition encountered during the infectious process.

## Materials and methods

### Bacterial cells and growth conditions

The reference strain N920143 of *S. lugdunensis* was used in this study (GenBank FR870271) (Heilbronner et al. 2011). Overnight cultures of *S. lugdunensis* were diluted 2:100 in Brain Heart Infusion (BHI) without or with 350  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl (DIP) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA) and incubated at 37 °C with shaking (120 rpm), as described previously (Farrand et al. 2015; Aubourg et al. 2020). For the complementation experiments, 2 mM FeSO<sub>4</sub> were added.

### RNA extraction

RNAs were extracted from cells of *S. lugdunensis* cultured in BHI, in BHI with 350  $\mu$ M DIP and in BHI with 350  $\mu$ M DIP and 2 mM FeSO<sub>4</sub> harvested in the late-exponential phase (OD<sub>600</sub> of 1) as previously described (Aubourg et al. 2020). Four independent samples for each condition were used. Cells pellets were then incubated for 12 h at –80 °C. RNAs were extracted using the “Direct-zol RNA miniprep kit” (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and residual DNA was removed by treatment with Turbo DNase (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer’s instructions. RNAs integrities and quantifications were performed by electrophoresis using the Agilent TapeStation system (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### RNA-Seq and reads mapping

cDNAs from extracted RNAs were sequenced with the Illumina HiSeq 4000 platform generating reads of 50 pb (iGE3 Genomics Platform, University of Geneva, Swiss). For each condition, RNA-Seq analyses have been carried out using the four independent RNA samples. Quality assessments were performed using fastqc software. Reads were mapped to the *S. lugdunensis* reference genome: N920143 (assembly: ASM27046v1 accession number: NC\_017353.1) using STAR (version 2.7.5b) algorithm. Then table of counts

was created with the htseq-count function from the package HTSeq (version 0.13.5). Data normalization and differential expression analyses (growth in BHI with DIP versus BHI without DIP) were carried out using the R package edgeR (version 3.26.8). Correction of the *p* value was performed by the Benjamini–Hochberg method. Genes with log<sub>2</sub> fold change (Log<sub>2</sub>FC) less than –1 or higher than 1 with a corrected *p* value less than 0.05 were considered to be significantly deregulated. RNAseq data are available in the GEO database with accession number GSE166487 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>).

### RT-qPCR experiments

One  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using the “BIO-RAD iScript Select cDNA synthesis Kit” kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the cDNA was amplified using iSC SYBR green supermix in the iCycler iQ instrument (Bio-Rad) according to the manufacturer’s recommendations. These experiments were performed in triplicate from three independent RNA extractions. Primers used for *sirA*, *sstD*, and *katA* genes were from Aubourg et al. (2020) and *slushF* (5'TTGACGCAATTTCAGGCTTATTG3') and *slushR* (5'TCCGTCCATGATATGTTCGCT3') for the *slushABC* operon.

## Results and discussion

### Global transcriptomic analysis

To identify the genes with altered expression under iron-limitation condition in *S. lugdunensis*, global transcriptomic study of cells incubated in BHI without or with 350  $\mu$ M DIP was undertaken. We analyzed sequences of four samples from both conditions. Using *S. lugdunensis* N920143 as a reference genome, 97.15–98.72% of the high-quality sequenced reads (Phred score > 30) were uniquely mapped (Table 1). Overall, the iron-limitation significantly affected the expression of 175 genes; among them, 127 were upregulated and 48 were downregulated (Table S1; Fig. S1). Interestingly, 59 gene products resulting from this analysis have been previously found to be differentially expressed (with the same evolution) in the global proteomic study carried out under the same stress condition (Aubourg et al. 2020) (Table S1). Most upregulated genes included those involved in iron metabolism and transport (*n* = 49), transport systems (*n* = 51), transcriptional regulation (*n* = 3), and in the oxidative stress response (*n* = 1) (Fig. S2; Table S1). Moreover, some downregulated genes were associated with oxidative stress response (*n* = 5), virulence (*n* = 1), hemin detoxification (*n* = 2), and transcriptional regulation (*n* = 1) (Fig. S2; Table S1). Finally, a large number of genes for which their

**Table 1** Summary of RNAseq results of the samples of *S. lugdunensis* N920143 incubated in BHI with 350  $\mu$ M DIP (iron-limitation condition) and in BHI

	<i>S. lugdunensis</i> N920143 cultivated in BHI				<i>S. lugdunensis</i> N920143 cultivated in BHI with 350 $\mu$ M DIP			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Overall results</b>								
Number of input reads	29,827,506	33,177,543	34,470,980	31,888,778	29,843,654	35,083,271	32,204,576	33,095,801
Average input read length	50	50	50	50	50	50	50	50
Mean quality (%) > Q30	39.8 (98.46)	39.81 (98.5)	39.83 (98.52)	39.8 (98.48)	39.84 (98.57)	39.8 (98.46)	39.82 (98.5)	39.81 (98.48)
<b>Unique reads</b>								
Uniquely mapped reads number (%)	28,976,728 (97.15%)	32,320,911 (97.42%)	33,762,650 (97.95%)	31,205,204 (97.86%)	29,254,990 (98.03%)	34,309,580 (97.79%)	31,792,773 (98.72%)	32,583,373 (98.45%)
Average mapped length	49.94	49.94	49.94	49.94	49.94	49.94	49.94	49.94
<b>Multi-mapping reads</b>								
Number of reads mapped to multiple loci (%)	594,203 (1.99%)	492,013 (1.48%)	410,947 (1.19%)	518,997 (1.63%)	395,424 (1.32%)	661,639 (1.89%)	343,408 (1.07%)	408,044 (1.23%)
Number of reads mapped to too many loci	31	22	12	14	10	20	22	19
<b>Unmapped reads</b>								
Number of reads unmapped: too many mismatches	0	0	0	0	0	0	0	0
Number of reads unmapped: too short (%)	256,245 (0.86%)	364,066 (1.10%)	297,024 (0.86%)	164,342 (0.52%)	192,826 (0.65%)	111,837 (0.32%)	68,206 (0.21%)	104,189 (0.31%)
Number of reads unmapped: other	299	531	347	221	404	195	167	176

transcription was deregulated by the addition of iron chelator encoded for transporter proteins ( $n=61$ ) corresponding to one-third of the total of deregulated genes (Fig. S2). The same observation has been also pointed out by a proteomic approach and may be correlated with the better ability of iron-limited cells to form biofilm (Aubourg et al. 2020). In *S. aureus*, the transcriptional profiles (based on the analysis of microarrays containing 460 genes) from a strain grown in iron-restricted condition (Mueller–Hinton broth with 600  $\mu$ M DIP) and in vivo (tissue cage implanted in mice)

revealed 61 upregulated genes and 70 downregulated genes (Allard et al. 2006). In this study, *isd*, *sir*, *fhu*, and *sst* operons were among the highest expressed genes as observed in *S. lugdunensis* (see below).

Complementation experiments have shown that the addition of FeSO<sub>4</sub> abrogated the phenotypes triggered by the iron-limitation (oxidative stress response, biofilm formation, and virulence) (Aubourg et al. 2020). We then verified that the expression of four genes of the iron stimulon (two upregulated and two downregulated) was also restored by the

addition of  $\text{FeSO}_4$ . RT-qPCR results indeed revealed that the transcriptional levels of *sirA*, *sstD*, *katA*, and *slush* in BHI containing DIP and  $\text{FeSO}_4$  were not significantly different to those under standard condition (BHI) (Table S2).

Because the Fur repressor (ferric uptake regulator) is known to have an important role in the regulation of iron homeostasis, we looked for Fur-box motifs (TGATAA TNATTATCA) (with three mismatches allowed) among promoters of upregulated genes under iron-limitation condition (Baichoo and Helmann 2002; Price and Boyd 2020; Fuangthong and Helmann 2003). We found 36 genes/operons that can be transcriptionally controlled by Fur including *isdJ*, *isdC*, *isdB*, and *lhaS* (SLUG\_00900) (Heilbronner and Foster 2020), and 12 perfect palindromic motifs have been observed into promoter regions of genes induced by iron-limitation (Table S1).

### Identification of gene clusters involved in iron acquisition

The majority of the overexpressed genes were involved in iron acquisition (Table S1). As expected, a cluster of 16 genes has been identified which included the *isd* operon ( $\log_2\text{FC}$  from 6.71 to 7.89), the *lha* operon ( $\log_2\text{FC}$  from 5.27 to 5.67), and the *sir* operon ( $\log_2\text{FC}$  from 5.05 to 5.33) (Table 2). Note that most of gene products were also observed by proteomic analysis (Table 2). It has already been demonstrated that *isdC*, *isdG*, and *isdP*, belonging to the heme absorption *Isd* system, were overexpressed under iron-limitation condition (Farrand et al. 2015; Zapotoczna et al. 2012). Likewise, *sirABC*, involved in iron-siderophore import, was also regulated by iron concentration (Brozyna et al. 2014). Recently, Jochim and collaborators identified iron-regulated Energy-Coupling Factor transporter (ECF) *Lha* in *S. lugdunensis* which was required for heme acquisition independently of the *Isd* system (Jochim et al. 2020). *lhaSTA* genes were located into the *isd*-genes cluster and our data showed that their levels of transcriptional-induction under iron-limitation condition were among the highest ( $\log_2\text{FC} > 5$ ). Loci encoding another ECF-type transporter (SLUG\_19150, SLUG\_19160, SLUG\_19170) and also highly overexpressed in the presence of DIP ( $\log_2\text{FC}$  from 4.06 to 4.22), were identified (Fig. 1; Table 2; Table S1). These three genes were located within a putative 13-gene operon (spaced by less than 10 bp) with fold-changes of expression between  $\log_2\text{FC}$  of 3.79 and 5.62 and with a perfect palindromic Fur-box motif in the putative promoter region (Fig. 1). Note that among them, eight gene products were also observed in significant higher amount under iron-limitation condition using global proteomic approach (Aubourg et al. 2020) (Tables 2, S1). Moreover, sequence comparisons revealed that SLUG\_19150, SLUG\_19160, and SLUG\_19170 were 52.8%, 48.2%, and 52.4% identical

to *lhaA*, *lhaT*, and *lhaS*, respectively (Fig. 1). Because the deletion of *lhaSTA* in combination of *isdEFL* did not fully abolish acquisition of heme, it was suspected that additional transporter(s) might exist (Jochim et al. 2020). Based on our data, it is tempting to speculate that the new SLUG\_19120-19240 cluster of genes could participate in the iron-limitation stress response.

Four other clusters, likely in operonic structures, and probably involved in iron acquisition were members of the iron-limitation stimulon (Table 2). As for *isd*, *lha* and ECF operons, perfect Fur-box motifs were found in the promoter regions of these clusters. The first one referred to the *efe* operon, similar to *efeUOB* of *Escherichia coli* and *fePABC* of *S. aureus* implicated in the extracytoplasmic heme–iron extraction via a deferochelation reaction (Turlin et al. 2013). In addition, we identified a cluster of five genes (SLUG\_08960 to SLUG\_09000); of these, three were annotated as part of ferric citrate transport system similar to the *fec* operon identified in *E. coli* (Braun and Herrmann 2007). Interestingly, the first gene of this putative operon (SLUG\_08960) coded for a putative synthase of the siderophore staphyloferrin A. The third cluster of 7 genes (SLUG\_20650 to SLUG\_20710) overexpressed in the iron-limitation condition included the *sstABCD* loci. In *S. aureus*, *Sst* was identified as a siderophores transporter (Beasley et al. 2011). The last induced cluster, comprising three genes (SLUG\_21460 to SLUG\_21480), was homologous to the *S. aureus* *fhu* operon (ferric hydroxamate uptake) involved in the acquisition of iron from hydroxamate siderophores (Sebulsky et al. 2000). Further phenotypic characterizations are needed to show whether these clusters play a role in coping with the “nutritional immunity” in *S. lugdunensis*, a strategy setting up by the host to restrict access to essential ions and to prevent infection by pathogenic organism.

### Other gene members of iron-limitation stimulon

With the aim to correlate phenotypes triggered by the iron-limitation condition in *S. lugdunensis*, we looked for deregulated genes involved in resistance to oxidative stress, virulence, transcriptional regulation, and hemin detoxification (Table 2).

As observed in the proteomic study, the expression of the *katA* gene (coding for the catalase) was repressed (Aubourg et al. 2020). Of note, *S. aureus* *katA* was also strongly downregulated under both in vivo and in vitro iron-restricted conditions (Allard et al. 2006). Moreover, the *qoxABCD* operon, required for the nitric oxide resistance in *S. aureus*, was downregulated (Kinkel et al. 2013) (Table 2). These results could explain the reduced resistance to oxidative stress and the virulence of *S. lugdunensis* under iron-limitation condition (Aubourg et al. 2020). At the same time, overexpression of *msrA* ( $\log_2\text{FC}$  of 5.11)

**Table 2** List of differentially expressed genes under iron-limitation condition involved in iron acquisition, oxidative stress response, virulence, transcriptional regulation, and hemin detoxification

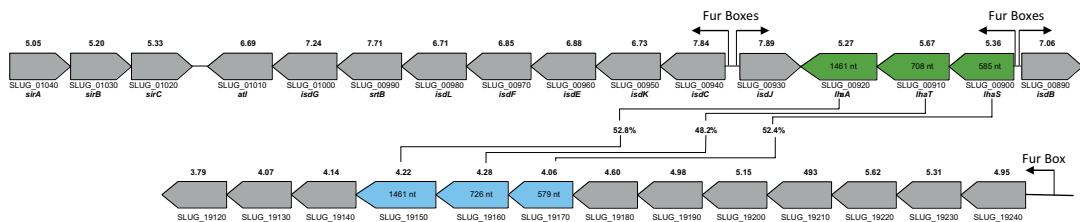
Genes involved in	Names	Log <sub>2</sub> FC transcriptomic	Proteomic*	FC proteomic*
Iron acquisition				
SLUG_00890 to SLUG_01040 (16 genes)		5.05 to 7.89	A0A4V2KVQ9_STALU (IsdB) A0A4Q9WB44_STALU (Atl)	8.18 3.68
SLUG_00930 to SLUG_01000	<i>isd</i> operon	6.71 to 7.89	A0A4Q9WB32_STALU (IsdJ) A0A292DHC8_STALU (IsdC) A0A4Q9WBZ2_STALU (IsdK) A0A4Q9WB50_STALU (IsdE) A0A133QBY3_STALU (IsdL) A0A133QBY0_STALU (IsdG)	8.75 4.83 6.12 5.72 2.15 6.5
SLUG_01020 to SLUG_01040	<i>sir</i> operon	5.05 to 5.33	A0A133QC67_STALU (SirA)	7.32
SLUG_00900 to SLUG_00920	<i>lha</i> operon	5.27 to 5.67	A0A4Q9WCU1_STALU (LhaA)	3.15
SLUG_19120 to SLUG_19240 (13 genes)		3.79 to 5.62	A0A4Q9WCC1_STALU (SLUG_19130) A0A4Q9WF46_STALU (SLUG_19140)	2.42 4.61
SLUG_19150 to SLUG_19170	ECF operon	4.06 to 4.22	A0A4Q9WD38_STALU (SLUG_19150) A0A4Q9WCC6_STALU (SLUG_19180) A0A4Q9WCC3_STALU (SLUG_19200) A0A4Q9WCL2_STALU (SLUG_19210) A0A4Q9WD81_STALU (SLUG_19220) A0A133Q8I6_STALU (SLUG_19240)	2.08 3.29 4.3 6.92 5.68 2.73
SLUG_06620 to SLUG_06660 (5 genes)		1.43 to 3.77		
SLUG_06620 to SLUG_06640	<i>efe</i> operon	3.38 to 3.77	A0A4Q9WD93_STALU (EfeB) A0A4V2KYY7_STALU (SLUG_06640)	3.43 4.85
SLUG_08960 to SLUG_09000 (5 genes)		2.54 to 4.99	A0A4Q9WD53_STALU (SLUG_08960) A0A4Q9WCV4_STALU (SLUG_08970)	2.04 2.56
SLUG_08980 to SLUG_09000	<i>fec</i> operon	2.54 to 3.45	A0A4Q9WELO_STALU (SLUG_08980)	3.48
SLUG_20650 to SLUG_20710 (7 genes)	<i>sst</i> operon	2.73 to 7.15	A0A4Q9WFJ2_STALU (SstD)	7.06
SLUG_21460 to SLUG_21480 (3 genes)	<i>fhu</i> operon	1.78 to 2.61	A0A4Q9W9Q7_STALU (FhuC)	4.35
Oxidative stress				
SLUG_15650	<i>katA</i>	−1.73	A0A292DEV5_STALU (KatA)	−3.83
SLUG_18100 to SLUG_18130 (4 genes)	<i>qox</i> operon	−1.21 to −1.30		
SLUG_01550	<i>msrA3</i>	5.11	A0A292DID0_STALU (MsrA3)	3.63
Virulence				
SLUG_04380	<i>slushA</i>	−1.06		
Regulators				
SLUG_05040	<i>gntR</i>	−1.16		
SLUG_07120	<i>murR/rpiR</i>	1.52	A0A4Q9WD67_STALU (MurR/RpiR)	1.58
SLUG_20280	<i>gapR</i>	1.14		
SLUG_06050	<i>marR</i>	2.91		
Hemin detoxification				
SLUG_06770 to SLUG_06780 (2 genes)	<i>hrt</i> operon	−4.09 to −4.41		

\*From reference (Aubourg et al. 2020)

(encoding methionine sulfoxide reductase) indicated that cells implemented mechanisms to repair protein damages such as oxidation of methionine (Singh et al. 2018).

We showed that the virulence of *S. lugdunensis* was reduced for cells cultured with iron chelator in the *Galleria*

*mellonella* model of infection (Aubourg et al. 2020). Our global transcriptomic results revealed that only expression of the known *slushA* virulence factor gene was slightly repressed (Table 2) and it may be suggested that the lower production of the corresponding small peptide with



**Fig. 1** Schematic diagram of the *lha* operon (in green) and of the putative second ECF transporter operon (SLUG\_19150 to SLUG\_19270 in blue) of *S. lugdunensis* N920143. Log<sub>2</sub>FC were

mentioned above the arrows. Sizes and percentages of homology of genes coding the ECF-type transporters and Fur-boxes were indicated

hemolytic activity participates to the reduced pathogenicity (Donvito et al. 1997) (Table 2). Slush is composed of three synergistic hemolytic peptides (Slush ABC) belonging to the phenol-soluble modulins (PSMs) (Cheung et al. 2014). Our RNAseq data showed that *slushB* and *slushC* were also downregulated but with a fold change just below our threshold of log<sub>2</sub>FC of 1 (0.9 and 0.6, respectively). Then, we verified by RT-qPCR that the entire *slushABC* operon was repressed under iron-limitation condition (log<sub>2</sub>FC of 1).

As shown in Table 2, only four transcriptional regulators were deregulated following the addition of DIP. They were associated with cellular metabolism which remained crucial for bacteria to cope with stresses. Under iron-limitation condition, *S. aureus* coordinates a redirection of metabolic pathways leading to an increase of acidic end-products. This local alteration of the cellular environment facilitates the release of iron from the host's iron-binding proteins (Friedman et al. 2006). SLUG\_05040, significantly repressed, coded for a GntR family of regulators, one of the largest family of transcriptional regulator in prokaryotes, involved in various metabolic pathways (Jain 2015). SLUG\_07120 encoded a putative regulator homologous to one of the pentose phosphate pathway (PPP) responsive regulators RpiR in *S. aureus* (57% identical to RpiRC). Iron-limitation was shown being a tricarboxylic acid (TCA) cycle stress affecting carbon flow through PPP in *S. epidermidis* (Sadykov et al. 2010). Moreover, in *S. aureus*, deletion of *rpiRC* delayed biofilm development (Zhu et al. 2011). This is well correlated with transcriptomic and proteomic data which suggests that under iron-limitation, the RpiR-like regulator is overproduced, leading to a better ability to form biofilm (Aubourg et al. 2020; Zhu et al. 2011). In *S. aureus*, the glycolysis regulator GapR, homologous to SLUG\_20280, acted as a repressor of *gapA* and *gapB* (coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases) which are important in virulence (Purves et al. 2010) and can directly sense oxidative stress such as menadione (Deng et al. 2014). Based on these data, this transcriptional regulator could have a role in the regulatory cascade resulting in the reduced virulence and resistance to oxidative stress when *S. lugdunensis* faced

iron-limitation. Likewise, SLUG\_06050 was highly induced and its product was 64% identical to SarZ of *S. epidermidis* already known as a key regulator required for biofilm formation and virulence in this CoNS (Wang et al. 2008). In addition, as for SarZ protein of *S. aureus*, the Cys residue (C13) required to sense oxidative stress, was found in the SLUG\_06050 sequence (Chen et al. 2009).

In this study, the two most repressed-genes under iron-limitation condition identified in our RNAseq were *hrtA* and *hrtB* (Tables S1, 2). They coded for heme export pump required to detoxify bacterial cells from of iron-containing metalloporphyrin which is toxic to most organisms at high concentration (Wakeman et al. 2014). It is therefore not surprising that *S. lugdunensis* attempted to reduce the potential efflux of such of molecule to maintain sufficient intracellular concentration when iron is lacking.

Taken altogether, these data provided a comprehensive overview of the transcriptomic regulation that took place in response to iron-limitation corresponding to a stress encountered during infectious process. The ability of *S. lugdunensis* to trigger several pathways to acquire iron may largely explain the opportunistic trait of this pathogen.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02342-2>.

**Acknowledgements** The authors warmly thank Michel Auzou, Sébastien Galopin, Nicolas Thomy, and Mamadou Godet for technical assistance.

**Author contributions** All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by MA and FG. The first draft of the manuscript was written by J-CG, MA, and AD, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** Marion Aubourg and François Gravey works are supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Region Normandy, respectively.

**Data availability** RNAseq data are available in the GEO database with the accession number GSE166487 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>).

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no conflict of interest to declare that are relevant to the content of this article. All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript. The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

## References

- Allard M, Moisan H, Brouillet E, Gervais AL, Jacques M, Lacasse P, Diarra MS, Malouin F (2006) Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo. *Microbes Infect* 8:1679–1690. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.01.022>
- Aubourg M, Dhalluin A, Gravé F, Pottier M, Thomy N, Bernay B, Goux D, Martineau M, Giard J-C (2020) Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*. *BMC Microbiol* 20:328. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02016-x>
- Baicho N, Helmann JD (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184:5826–5832. <https://doi.org/10.1128/JB.184.21.5826-5832.2002>
- Beasley FC, Marolda CL, Cheung J, Buac S, Heinrichs DE (2011) *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by staphyloferrin A, staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. *Infect Immun* 79:2345–2355. <https://doi.org/10.1128/IAI.00117-11>
- Braun V, Herrmann C (2007) Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189:6913–6918. <https://doi.org/10.1128/JB.00884-07>
- Brozyna JR, Sheldon JR, Heinrichs DE (2014) Growth promotion of the opportunistic human pathogen, *Staphylococcus lugdunensis*, by heme, hemoglobin, and coculture with *Staphylococcus aureus*. *Microbiolgy* 3:182–195. <https://doi.org/10.1002/mbo3.162>
- Chen PR, Nishida S, Poor CB, Cheng A, Bae T, Kuechenmeister L, Dunman PM, Missiakas D, He C (2009) A new oxidative sensing and regulation pathway mediated by the MgrA homologue SarZ in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 71:198–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06518.x>
- Cheung GYC, Joo H-S, Chatterjee SS, Otto M (2014) Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol Rev* 38:698–719. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12057>
- Deng X, Liang H, Ulanovskaya OA et al (2014) Steady-state hydrogen peroxide induces glycolysis in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 196:2499–2513. <https://doi.org/10.1128/JB.01538-14>
- Donvito B, Etienne J, Denoroy L, Greenland T, Benito Y, Vandenesch F (1997) Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-*agr* genetic locus. *Infect Immun* 65:95–100. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.1.95-100.1997>
- Farrand AJ, Haley KP, Lareau NM, Heilbronner S, McLean JA, Foster T, Skaar EP (2015) An iron-regulated autolysin remodels the cell wall to facilitate heme acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. *Infect Immun* 83:3578–3589. <https://doi.org/10.1128/IAI.00397-15>
- Friedman DB, Stauff DL, Pishchany G, Whitwell CW, Torres VJ, Skaar EP (2006) *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS Pathog* 2:e87. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020087>
- Fuangthong M, Helmann JD (2003) Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185:6348–6357. <https://doi.org/10.1128/JB.185.21.6348-6357.2003>
- Haley KP, Janson EM, Heilbronner S, Foster TJ, Skaar EP (2011) *Staphylococcus lugdunensis* IsdG liberates iron from host heme. *J Bacteriol* 193:4749–4757. <https://doi.org/10.1128/JB.00436-11>
- Hammer ND, Skaar EP (2011) Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu Rev Microbiol* 65:129–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102851>
- Heilbronner S, Foster TJ (2020) *Staphylococcus lugdunensis*: a skin commensal with invasive pathogenic potential. *Clin Microbiol Rev* 34(2):e00205-e220. <https://doi.org/10.1128/CMR.00205-20>
- Heilbronner S, Holden MT, van Tonder A, Geoghegan JA, Foster TJ, Parkhill J, Bentley SD (2011) Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS Microbiol Lett* 322:60–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02339.x>
- Jain D (2015) Allosteric control of transcription in GntR family of transcription regulators: a structural overview. *IUBMB Life* 67:556–563. <https://doi.org/10.1002/iub.1401>
- Jochim A, Adolf L, Belikova D et al (2020) An ECF-type transporter scavenges heme to overcome iron-limitation in *Staphylococcus lugdunensis*. *Elife* 9:e57322. <https://doi.org/10.7554/elife.57322>
- Kinkel TL, Roux CM, Dunman PM, Fang FC (2013) The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *MBio* 4:e00696-e713. <https://doi.org/10.1128/mBio.00696-13>
- Lebeurre J, Dahyot S, Diene S, Paulay A, Aubourg M, Argemi X, Giard J-C, Tournier I, François P, Pestel-Caron M (2019) Comparative genome analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows clonal complex-dependent diversity of the putative virulence factor, ess/type VII locus. *Front Microbiol* 10:2479. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02479>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1684-1182\(10\)60074-6](https://doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60074-6)
- Mazmanian SK, Ton-That H, Su K, Schneewind O (2002) An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2293–2298. <https://doi.org/10.1073/pnas.032523999>
- Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, Jelenksa J, Joachimiak A, Missiakas DM, Schneewind O (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299:906–909. <https://doi.org/10.1126/science.1081147>
- Parthasarathy S, Shah S, Raja Sager A, Rangan A, Durugu S (2020) *Staphylococcus lugdunensis*: review of epidemiology, complications, and treatment. *Cureus* 12(6):e8801. <https://doi.org/10.7759/cureus.8801>
- Price EE, Boyd JM (2020) Genetic regulation of metal ion homeostasis in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 28:821–831. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.004>
- Purves J, Cockayne A, Moody PCE, Morrissey JA (2010) Comparison of the regulation, metabolic functions, and roles in virulence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologues *gapA*

- and *gapB* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 78:5223–5232. <https://doi.org/10.1128/IAI.00762-10>
- Sadykov MR, Zhang B, Halouska S, Nelson JL, Kreimer LW, Zhu Y, Powers R, Somerville GA (2010) Using NMR metabolomics to investigate tricarboxylic acid cycle-dependent signal transduction in *Staphylococcus epidermidis*. *J Biol Chem* 285:36616–36624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152843>
- Sebulsky MT, Hohnstein D, Hunter MD, Heinrichs DE (2000) Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182:4394–4400. <https://doi.org/10.1128/jb.182.16.4394-4400.2000>
- Sheldon JR, Heinrichs DE (2015) Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 39:592–630. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv009>
- Singh VK, Singh K, Baum K (2018) The role of methionine sulfoxide reductases in oxidative stress tolerance and virulence of *Staphylococcus aureus* and other bacteria. *Antioxidants* 7:128. <https://doi.org/10.3390/antiox7100128>
- Sun Z, Zhou D, Zhang X et al (2020) Determining the genetic characteristics of resistance and virulence of the “Epidermidis Cluster Group” through pan-genome analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 10:274. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00274>
- Turlin E, Débarbouillé M, Augustyniak K, Gilles A-M, Wandersman C (2013) *Staphylococcus aureus* FepA and FepB proteins drive heme iron utilization in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 8:e56529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056529>
- Wakeman CA, Stauff DL, Zhang Y, Skaar EP (2014) Differential activation of *Staphylococcus aureus* heme detoxification machinery by heme analogues. *J Bacteriol* 196:1335–1342. <https://doi.org/10.1128/JB.01067-13>
- Wang L, Li M, Dong D, Bach T-HL, Sturdevant DE, Vuong C, Otto M, Gao Q (2008) SarZ is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 197:1254–1262. <https://doi.org/10.1086/586714>
- Zapotoczna M, Heilbronner S, Speziale P, Foster TJ (2012) Iron-regulated surface determinant (Isd) proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Bacteriol* 194:6453–6467. <https://doi.org/10.1128/JB.01195-12>
- Zhu Y, Nandakumar R, Sadykov MR, Madayiputhiya N, Luong TT, Gaupp R, Lee CY, Somerville GA (2011) RpiR homologues may link *Staphylococcus aureus* RNAIII synthesis and pentose phosphate pathway regulation. *J Bacteriol* 193:6187–6196. <https://doi.org/10.1128/JB.05930-11>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.





# CONCLUSION

---



La peau humaine est composée d'une abondance de plis, d'invaginations et de niches qui abritent un écosystème microbien unique en fonction de sa région anatomique (Grice et Segre, 2011). Elle peut être assimilée à une barrière physique permettant de protéger le corps humain contre les agressions par des organismes étrangers ou des substances toxiques et représente une interface avec l'environnement extérieur (Grice et Segre, 2011). Appartenant au microbiote cutané de l'Homme, *S. lugdunensis* est une bactérie considérée principalement comme un commensal (Bieber et Kahilmeter, 2010) qui peut établir des relations symbiotiques avec son hôte (Grice et Segre, 2011). Il est notamment retrouvé au niveau des zones cutanées humides et colonise en particulier les régions inguinales, perinéales, mammaires et plantaires (Vandenesh *et al.*, 1995 ; van der Mee-Marquet *et al.*, 2003 ; Bieber et Kahilmeter, 2010).

Les commensaux cutanés sont pour la plupart inoffensifs voire bénéfiques pour leur hôte puisqu'ils peuvent empêcher la colonisation par des pathogènes *via* différents mécanismes : ils privent les pathogènes d'accéder aux nutriments et produisent des molécules qui inhibent la croissance des pathogènes (Bier et Schittek, 2021). Un mécanisme similaire a été identifié chez *S. lugdunensis*. Il est en effet capable de produire une substance antimicrobienne nommée lugdunine qui peut inhiber la croissance de *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016). L'analyse du spectre d'activité de la lugdunine a mis en évidence une activité bactéricide contre d'autres agents pathogènes, et notamment des bactéries à Gram positif (Zipperer *et al.*, 2016). La découverte de cette nouvelle molécule antimicrobienne produite uniquement par *S. lugdunensis* apporte une preuve du rôle crucial de cette bactérie dans la colonisation (Zipperer *et al.*, 2016). Ainsi, *S. lugdunensis* a développé une stratégie pour survivre lorsqu'il est amené à être en compétition avec d'autres espèces bactériennes dans une même niche et cette stratégie peut être considérée comme un mécanisme bénéfique pour son hôte.

Cependant, ce commensal cutané émerge en tant que bactérie pathogène opportuniste puisque *S. lugdunensis* est impliqué dans de nombreuses maladies humaines (Frank *et al.*, 2008 ; Parthasarathy *et al.*, 2020). *S. lugdunensis* provoque majoritairement des infections de la peau et des tissus mous, toutefois il est également responsable d'infections ostéoarticulaires et d'une forme grave d'EI (Frank *et al.*, 2008 ; Parthasarathy *et al.*, 2020). Le recours à des procédures chirurgicales ou de drainage, en plus d'une antibiothérapie, est souvent nécessaire pour traiter les infections à *S. lugdunensis* (Anguera *et al.*, 2005). Parmi les CoNS, *S. lugdunensis* présente une pathogénicité qui ressemble plus à celle de *S. aureus* qu'à celle des autres espèces de CoNS. Il possède un degré élevé de virulence qui lui permet de causer des infections caractérisées comme agressives et graves rappelant celles provoquées par *S. aureus* (Frank *et al.*, 2008). Au sein des CoNS, *S. lugdunensis* est souvent considéré comme l'espèce la plus agressive (Heilbronner and Foster, 2021).



Ainsi, le contexte de mon projet de thèse était de comprendre et de déterminer les facteurs qui permettent à une bactérie commensale du microbiote cutané telle que *S. lugdunensis* de devenir un pathogène responsable d'infections humaines. La transition d'une bactérie commensale à un pathogène est probablement déterminée par sa capacité à survivre face aux stress environnementaux qui est corrélée à une modulation de l'expression génétique.

Dans le but d'identifier des potentiels déterminants génétiques spécifiques de souches pathogènes et de portage ou spécifiques de souches responsables d'un contexte clinique sévère, une étude basée sur la comparaison génomique a été réalisée sur 21 souches de *S. lugdunensis* (Lebeurre *et al.*, 2019). Des gènes de résistance et de virulence ont été recherchés afin d'expliquer la pathogénicité particulière de cette espèce. Cette analyse n'a pas permis d'identifier des gènes spécifiques au sein des souches pathogènes, des souches de portage ou par rapport à un contexte clinique donné (Lebeurre *et al.*, 2019). Néanmoins, il a été montré que des loci étaient spécifiques de certains CC, comme la présence des gènes codant un système CRISPR/Cas chez les souches appartenant seulement au CC1 et la présence des gènes codant un système de R-M de type II chez les souches appartenant au CC6 (Lebeurre *et al.*, 2019). Parallèlement à cette analyse génomique, le pouvoir pathogène de six souches de *S. lugdunensis*, comprenant trois souches issues d'infections et trois souches de portage, a été évalué en modèle d'infection de la larve de *G. mellonella* (Lebeurre *et al.*, 2019). Cette partie de l'étude a été réalisée lors de ma thèse et m'a permis de développer ce modèle infectieux chez *S. lugdunensis*. Les résultats n'ont pas montré de véritable lien entre le pouvoir de virulence et les origines des souches dans ce modèle.

Au CHU de Caen, une étude de génomique comparative est menée, par l'équipe du GRAM 2.0, à partir de 71 souches de *S. lugdunensis* issues de différents sites infectieux dont 21 souches isolées d'une infection du sang, 29 souches isolées d'une infection de la peau et des tissus mous, 19 souches isolées d'une infection ostéo-articulaire et 2 souches provenant d'une infection urinaire. Les séquences de ces 71 souches ont été obtenues et la présence de gènes de virulence spécifiques en fonction du type infectieux a été recherchée. Aucune caractéristique génétique majeure spécifique de la virulence n'a pu être identifiée chez ces souches. Ce résultat, similaire à la précédente étude exposée, suggère que les modulations génétiques des commensaux cutanés, comme *S. lugdunensis*, entreprises dans le but de devenir des bactéries pathogènes, vont dépendre des réponses aux facteurs environnementaux qu'ils vont rencontrer.



L'induction de la pathogenèse chez les staphylocoques serait due à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Dans l'environnement, les bactéries peuvent rencontrer une variété de conditions de stress telles que la restriction en nutriments, le stress oxydatif, le stress osmotique et la présence de métaux. Au cours du processus infectieux chez l'Homme, les bactéries pathogènes sont amenées à rencontrer une condition de limitation en fer. En effet, l'hôte a développé une stratégie d'« immunité nutritionnelle » lui permettant d'appauvrir ses fluides corporels et ses tissus en fer dont l'effet est de limiter la colonisation et la prolifération bactérienne (Hood et Skaar, 2012). Pour faire face à ce stress, les staphylocoques ont mis en place des systèmes d'acquisition du fer (Contreras *et al.*, 2014). *S. lugdunensis* possède le système *lsd* impliqué dans la capture et le métabolisme du fer dépendant de l'hème et qui est proche de celui retrouvé chez *S. aureus* (Heilbronner *et al.*, 2011) et qui contribue à sa pleine virulence (Reniere et Skaar, 2008). L'ensemble de ces données indique que la capacité d'adaptation et de survie aux stress environnementaux apparaît importante pour ces agents pathogènes opportunistes et qu'elle semble être médiée par des réseaux de régulation complexes.

En réponse aux stimuli environnementaux, les bactéries vont réguler de manière spécifique l'expression de leurs gènes liés au métabolisme et leurs facteurs de virulence. En effet, lors d'une infection, les staphylocoques vont coordonner l'expression des gènes de virulence dans le but d'assurer la colonisation, l'échappement aux défenses de l'hôte, l'adhésion aux cellules, la propagation, la dégradation des cellules de l'hôte et la survie bactérienne (Novick, 2003 ; Cheung *et al.*, 2004). Parmi l'ensemble des dispositifs de régulation, l'un des mécanismes les plus importants chez *S. aureus* est le système à deux composants, et en particulier le système *Agr* (Singh et Ray, 2014). Ce dernier a été décrit comme le système majeur de régulation chez *S. aureus* et joue un rôle central dans la physiologie et dans la pathogenèse de cette espèce (Yarwood *et al.*, 2003 ; Le *et al.*, 2015). A noter que des régions homologues au système *Agr* de *S. aureus* ont été identifiées dans un grand nombre d'espèces de staphylocoques, y compris *S. lugdunensis* (Vandenesch *et al.*, 1993 ; Dufour *et al.*, 2002). Cependant, aucune étude expérimentale n'avait été encore menée pour identifier le rôle des systèmes *lsd* et *Agr* dans la virulence et la pathogénicité de *S. lugdunensis*.

Afin de comprendre les mécanismes mis en place par *S. lugdunensis* lui permettant de passer d'un caractère commensal à celui de pathogène, l'étude des facteurs d'opportunisme chez *S. lugdunensis* a été initiée par le biais de mon projet de thèse. Le but de ce travail était de répondre à deux questions principales : quelle est la régulation mise en œuvre par *S. lugdunensis* qui rend possible son passage de commensal à pathogène ? La condition environnementale d'une présence ou non de fer impacte-t-elle la virulence de *S. lugdunensis* ?



# 1. ÉTUDE DU RÉGULATEUR AgrA DE *S. LUGDUNENSIS*

Compte tenu du rôle important que joue le système Agr dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme, des facteurs de virulence et dans la pathogénicité de *S. aureus*, nous avons choisi d'étudier la régulation de ce système chez *S. lugdunensis* et sa possible implication dans la pathogénicité de ce staphylocoque. De plus, le locus *agr* de *S. lugdunensis* possède 63 % d'homologie de séquence avec celui de *S. aureus* et ces deux systèmes présentent une organisation génomique similaire (Vandenesh *et al.*, 1993). Le système Agr chez *S. aureus* est composé de deux régulateurs : AgrA qui est décrit comme un régulateur de réponse impliqué dans la régulation positive des gènes codant les PSM et négative des gènes du métabolisme, et l'ARNIII qui est caractérisé comme l'effecteur majeur de ce système impliqué dans l'induction des facteurs de virulence et la répression des gènes codant les protéines de surface (Queck *et al.*, 2008 ; Thoendel *et al.*, 2011). Certaines régions du locus *agr* comme notamment les promoteurs P2 et P3 ainsi que la région intergénique située entre ces deux promoteurs sont hautement conservées chez ces deux espèces staphylocoques. Cependant, le gène *hld* codant la δ-hémolysine de *S. aureus* n'est pas présent dans l'ARNIII de *S. lugdunensis*. Cette observation révèle une différence notable entre ces deux systèmes mais qui ne semble pas jouer un rôle dans la fonction régulatrice de l'ARNIII de *S. lugdunensis* (Benito *et al.*, 1998).

Le premier objectif de ce projet de thèse a donc été d'étudier le rôle du régulateur transcriptionnel AgrA de *S. lugdunensis*. La stratégie mise en place a été de construire un mutant déléte pour le gène *agrA* chez la souche *S. lugdunensis* N920143, puis de le caractériser phénotypiquement par des approches physiologiques en comparaison avec la souche sauvage et d'identifier le transcriptome et le protéome de ce régulateur chez *S. lugdunensis*.

Les outils permettant des manipulations génétiques chez *S. lugdunensis* sont très limités ce qui explique le faible nombre d'études expérimentales entreprises chez cette espèce. L'incorporation d'un plasmide dans une bactérie est une étape importante pour la construction d'un mutant et est une condition préalable à la manipulation génétique. La transformation de bactéries à Gram positif peut être difficile en raison de la présence d'une paroi cellulaire épaisse agissant comme une barrière physique ainsi que des systèmes de R-M (Heilbronner *et al.*, 2013a). Au cours de ce projet de thèse, plusieurs difficultés techniques ont été rencontrées et ont concerné notamment l'étape de transformation chez *S. lugdunensis*. En effet, cette espèce présente une faible efficacité de transformation qui a été constatée



dans plusieurs études (Marlinghaus *et al.*, 2012 ; Heilbronner *et al.*, 2013a). Aucune transformation plasmidique chez *S. lugdunensis* n'avait été décrite avant le développement du premier protocole de manipulation génétique chez *S. lugdunensis* en 2012 (Marlinghaus *et al.*, 2012). Celui-ci, basé sur la transformation de protoplastes, a été adapté à partir de celui utilisé chez *S. saprophyticus* et a permis le transfert de trois plasmides (pBT2, pRB473, et pT181) chez *S. lugdunensis* ainsi que l'obtention du premier mutant par remplacement allélique (mutant délété pour le gène *fb*) (Marlinghaus 2012). Un second protocole de transformation, impliquant une étape d'électroporation et des vecteurs spécifiques pour effectuer l'échange allélique, a été développé (Heilbronner *et al.*, 2013a). Les auteurs ont montré que *S. lugdunensis* n'était pas capable de reconnaître l'ADN méthylé par la cytosine et qu'il possédait un système de R-M fonctionnel de type I codé par les gènes *hsdMS* (une endonucléase de restriction et une méthyltransférase). L'inactivation de ces gènes a entraîné une transformation améliorée, ce qui suggère que ce système est la barrière majeure chez *S. lugdunensis* (Heilbronner *et al.*, 2013a). La souche d'*Escherichia coli* SL01B exprimant les gènes *hsdMS* a donc été construite et a été utilisée comme souche réceptrice avant transformation d'ADN plasmidique chez *S. lugdunensis* (Heilbronner *et al.*, 2013a). L'utilisation de cette souche permet de méthyler l'ADN recombinant ce qui entraîne ensuite une augmentation de la fréquence de transformation chez *S. lugdunensis* (Heilbronner *et al.*, 2013a). Ce nouveau protocole de transformation a rendu possible la construction du mutant délété pour le gène codant la SrtA chez *S. lugdunensis* (Heilbronner *et al.*, 2013a).

Les barrières aux transferts de gènes horizontaux telles que la paroi, la capsule, les systèmes de R-M, CRISPR/Cas et T/AT représentent des obstacles à l'intégration d'ADN étranger. Une analyse génomique comparative chez *S. lugdunensis* a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs opérons codant pour des systèmes de R-M, CRISPR/Cas et T/AT (Argemi *et al.*, 2018). L'identification de tels dispositifs chez une espèce de CoNS est exceptionnellement rare car une seule étude a montré la présence d'un système de R-M chez *S. epidermidis* (Monk *et al.*, 2012). La présence de l'ensemble de ces systèmes chez *S. lugdunensis* explique en grande partie la difficulté de transformation chez cette espèce (Argemi *et al.*, 2018).

De plus, il existe peu d'outils qui permettent un échange allélique efficace chez *S. lugdunensis* dans le but de construire des mutants. Une transformation chez *S. lugdunensis* avec le plasmide pIMAY, utilisé chez *S. aureus* pour la technique de mutagénèse, a été réalisée (Heilbronner *et al.*, 2013a). Les auteurs ont choisi d'utiliser ce vecteur car son intégration est permise à une température de 37°C plutôt que 44°C requise pour d'autres plasmides à réplication thermosensible tels que le pMAD (Heilbronner *et al.*, 2013a). Dans le pIMAY, la présence de l'ARN antisens *secY* permet de sélectionner les cellules ayant



perdues le plasmide par leur capacité à croître en présence d'anhydrotétracycline. Toutefois, l'induction du gène *secY* ne permet pas une sélection fiable de la perte de plasmide chez *S. lugdunensis* après la seconde recombinaison (Heilbronner *et al.*, 2013a). Par conséquent, toutes les colonies doivent être ciblées pour la perte de résistance (Heilbronner *et al.*, 2013a). L'analyse du génome de *S. lugdunensis* a permis d'identifier un prophage φSL01 dont le gène codant l'intégrase phagique a été cloné dans le pIMAY pour construire le plasmide intégratif pIPI03 et ses dérivés (pIPI03ery et pIPI03kan). Ces outils permettant d'assurer un échange allélique optimal chez *S. lugdunensis* ont permis la construction du mutant  $\Delta recA$  chez la souche *S. lugdunensis* HKU09-01 (Heilbronner *et al.*, 2013b).

Dans notre étude, le mutant  $\Delta agrA$  a été construit par recombinaison homologue en utilisant le plasmide pMAD disponible au laboratoire et largement utilisé chez *S. aureus*. Plusieurs tentatives de transformation de ce plasmide ont été effectuées. Les premiers essais, en utilisant la souche d'*E. coli* DH5a comme étape intermédiaire avant la transformation dans *S. lugdunensis*, n'ont pas eu de succès. Ensuite, des essais avec le protocole de transformation par protoplastes ont été entrepris. Pour ce faire, nous avons sollicité l'aide des membres de l'équipe du laboratoire du GRAM 2.0 qui avaient utilisé cette méthode pour la construction des mutants  $\Delta atlL$  et  $\Delta lytSR$  chez *S. lugdunensis* (Gibert *et al.*, 2014 ; Dahyot *et al.*, 2020). La maîtrise de cette technique leur a été acquise grâce à une collaboration avec l'équipe allemande dirigée par le Pr S. Gatermann (Département de Microbiologie médicale, Université de la Ruhr, Bochum, Allemagne). Toutefois, après de nombreuses tentatives, les transformations de protoplastes dans le but de construire le mutant  $\Delta agrA$  sont restées infructueuses. Ces échecs peuvent être en partie expliqués par la taille importante du plasmide pMAD (environ 10 kb). La stratégie a été ensuite d'utiliser la souche d'*E. coli* SL01B qui a permis une transformation réussie du plasmide dans *S. lugdunensis*. Malgré les instructions détaillées du protocole de transformation avec l'étape d'électroporation élaboré par Heilbronner *et al.* (Heilbronner *et al.*, 2013a), de nombreuses tentatives ont été nécessaires. La paroi épaisse présente chez *S. lugdunensis* empêche souvent l'incorporation d'ADN exogène, c'est pourquoi nous avons modifié le protocole de transformation en y incluant une étape de congélation des cellules électrocompétentes de *S. lugdunensis* à -80°C pendant 24h permettant de fragiliser la structure pariétale des cellules bactériennes. Cette étape a permis de résoudre les problèmes de transformation, ainsi l'incorporation du plasmide dans *S. lugdunensis* a été rendue possible. Le séquençage complet de la souche de *S. lugdunensis* N920143 mutée pour le gène *agrA* a confirmé la réussite de la construction de ce mutant.

Après l'obtention de la souche de *S. lugdunensis* délétée pour le gène *agrA*, des travaux de complémentation ont été menés dans le but de restaurer le phénotype sauvage chez le mutant  $\Delta agrA$ .



Des essais avec plusieurs plasmides tels que le pCU1, le pRB374 et le pRB473 ont été tentés. La transformation du plasmide pCU1 possédant l'insert *agrA* a été réalisée chez *E. coli* SL01B mais l'incorporation de ce plasmide n'a pas été obtenue dans le mutant  $\Delta agrA$  de *S. lugdunensis*, malgré la réussite de la transformation du plasmide vide. La transformation des plasmides pRB374 et pRB473 possédant tous les deux l'insert *agrA* dans *E. coli* SL01B puis dans *S. lugdunensis* N920143 a été réussie. Cependant, l'étude de la croissance des souches complémentées a révélé un « effet plasmide » important entraînant une croissance anormale des souches hébergeant les plasmides sans insert. Les expériences phénotypiques réalisées avec le mutant  $\Delta agrA$  complémenté n'ont pas pu être effectuées. A noter que dans la littérature, la complémentation n'apparaît que très rarement dans les études impliquant la construction d'un mutant chez *S. lugdunensis*, suggérant que cette étape est particulièrement difficile à réaliser chez cette espèce.

Des approches de transcriptomique et de protéomique globales ont été effectuées dans notre étude afin d'identifier le transcriptome et le protéome du régulateur AgrA de *S. lugdunensis*. Des problèmes de rendement en ARN et de contamination en ADN génomique ont été rencontrés lors de l'extraction des ARN totaux. Afin d'améliorer le rendement, nous avons mis en place un nouveau protocole en ajoutant une étape de congélation des cellules à -80°C pendant 24h ainsi qu'une étape de lyse mécanique avec des micro-billes pour détruire davantage la membrane cellulaire. La TURBO DNase a été utilisée en complément de la DNasel ce qui a permis de résoudre les problèmes liés à la contamination en ADN génomique présent dans nos échantillons. L'analyse des données de ces deux approches globales a été effectué en collaboration avec François Gravey, doctorant en Bio-Informatique, et Benoit Bernay, Ingénieur de recherche. L'aide apportée par ces deux chercheurs a facilité l'exploitation des résultats.

En parallèle de la construction du mutant  $\Delta agrA$  chez *S. lugdunensis*, nous avons également construit le mutant  $\Delta ARNIII$  en utilisant la même stratégie de clonage. L'implication de l'*ARNIII* dans la régulation chez *S. aureus* a suscité notre intérêt d'étudier son potentiel rôle chez *S. lugdunensis*. La caractérisation phénotypique, réalisée par de nombreuses approches physiologiques en comparaison avec la souche sauvage, a également été entreprise chez le mutant  $\Delta ARNIII$ .

Mon projet de thèse a permis d'apporter des données majeures sur le mécanisme de régulation par le système Agr de *S. lugdunensis*. Nos résultats, présentés dans la partie concernant les travaux expérimentaux, ont révélé que la délétion pour le gène *agrA* avait un impact sur la réponse aux stress, en particulier au stress oxydatif et osmotique, la formation de biofilm et la pigmentation des colonies. L'inactivation du gène *agrA* a également eu un effet sur la pathogénicité de *S. lugdunensis*, révélé par le test



de survie en macrophages de souris. De plus, les résultats apportés par l'étude du transcriptome et du protéome du régulateur *AgrA* de *S. lugdunensis* corrèlent correctement avec l'ensemble des phénotypes observés.

Toutefois, l'observation de la diminution de la formation de biofilm chez le mutant  $\Delta agrA$  pouvait sembler surprenante compte tenu des études relatives au rôle de *AgrA* dans la formation de biofilm chez *S. aureus*. En effet, les mutants  $\Delta agr$  chez *S. aureus* ont montré une augmentation de la formation de biofilm (Vuong *et al.*, 2000). Ainsi, l'influence du système *Agr* chez *S. lugdunensis* se distingue de ce qui a été observé chez *S. aureus* mais se rapproche de ce qui a été observé chez des espèces à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* où les systèmes de QS semblent favoriser l'expression des facteurs impliqués dans la formation du biofilm (Davies *et al.*, 1998 ; von Bodman *et al.*, 1998). Cependant, il existe de grandes diversités dans la capacité des souches de *S. aureus* à exprimer des biofilms. Aucune réponse claire n'a encore été apportée à la question de savoir pourquoi certaines souches forment une grande quantité de biofilm et d'autres pas. Les hypothèses seraient l'implication de la  $\delta$ -toxine dont l'expression peut être différente en fonction des souches de *S. aureus* (Vuong *et al.*, 2000) et par les différences de propriétés adhésives des biomatériaux utilisés dans les études de biofilm (Vacheethasanee *et al.*, 2000). De plus, la fréquence élevée des mutants  $\Delta agr$  observée soutient l'idée selon laquelle les mutants  $\Delta agr$  peuvent s'adapter à une niche écologique dans laquelle les propriétés adhésives sont importantes (Vuong *et al.*, 2000). Dans notre étude, nous émettons l'hypothèse que la dérégulation des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, observée dans notre analyse transcriptomique, serait responsable de la diminution de la formation de biofilm chez le mutant  $\Delta agrA$  de *S. lugdunensis*. En effet, notre travail réalisé sur l'étude de la condition de limitation en fer (discuté dans les pages suivantes) a confirmé l'implication des gènes d'acquisition du fer (en particulier l'induction du système *Isd*) dans la formation de biofilm par *S. lugdunensis*.

Comme nous l'attendions, notre analyse transcriptomique réalisée chez le mutant  $\Delta agrA$  a révélé une dérégulation de l'ARNIII. À la vue de ce résultat, il était donc possible d'émettre l'hypothèse que les phénotypes observés chez le mutant  $\Delta agrA$  pouvaient résulter de la dérégulation de l'ARNIII. La caractérisation du mutant  $\Delta ARNIII$  en comparaison avec la souche sauvage et l'identification du protéome de l'ARNIII ont été réalisées. De manière très surprenante, aucun phénotype ainsi qu'aucune dérégulation de protéines n'ont été observés chez le mutant  $\Delta ARNIII$ . On sait que la plupart des facteurs de virulence tels que les entérotoxines, leucocidines et l'a-toxine, qui sont directement ou indirectement sous le contrôle de l'ARNIII chez *S. aureus* (Singh et Ray, 2014), ne sont pas présents chez *S. lugdunensis* (Heilbronner *et al.*, 2011). Il est donc tentant de spéculer que l'ARNIII de *S. lugdunensis* pourrait être un résidu évolutif conservé chez *S. lugdunensis* probablement parce qu'il ne présente pas de coût énergétique supplémentaire.

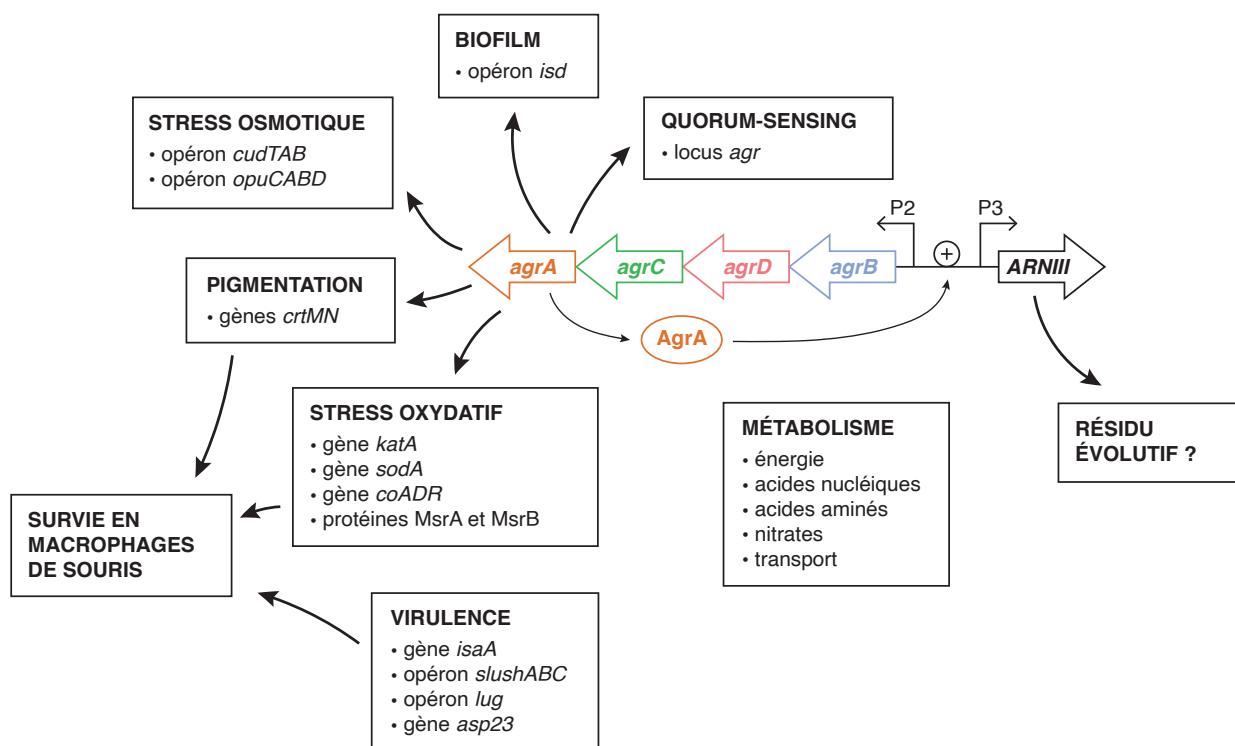


Figure 68 : Schéma général représentant les fonctions de AgrA chez *S. lugdunensis*.

Malgré l'absence de phénotypes pour le mutant  $\Delta ARNIII$  de *S. lugdunensis*, il serait intéressant d'étudier le rôle de ce régulateur chez les autres espèces de CoNS, en particulier chez *S. saprophyticus*. En effet, comme *S. lugdunensis*, cette espèce ne possède pas le gène *hld* dans l' $ARNIII$  (Sakinc *et al.*, 2004). Cette perspective d'étude permettrait de montrer que l' $ARNIII$  dépourvu du gène *hld* ne serait qu'un transcrit non fonctionnel et de confirmer le rôle majeur que nous avons attribué à *AgrA* dans la régulation chez *S. lugdunensis*.

En conclusion de ce travail, *AgrA* semble être le régulateur majeur du système *Agr* chez *S. lugdunensis*, impliqué dans la régulation des facteurs de virulence, des gènes de résistance aux stress (notamment les stress oxydatif et osmotique), des gènes impliqués dans la formation de biofilm, et des gènes de synthèse des pigments caroténoïdes, comme l'illustre la **Figure 68**. Ces données divergent du modèle de *S. aureus* où l' $ARNIII$  a été décrit comme l'effecteur majeur du système *Agr*, notamment impliqué dans la régulation positive des facteurs de virulence. Nos analyses phénotypiques et globales ont prouvé que *AgrA* agit comme un régulateur pléiotrope et ont permis d'identifier les cibles directes et indirectes régulées par *AgrA*. Notre travail a apporté des informations sur les mécanismes pouvant en partie expliquer le fait que des bactéries commensales cutanées peuvent devenir des pathogènes responsables de maladies invasives. Des études permettant d'évaluer la virulence du mutant  $\Delta agrA$  dans des modèles d'infection utilisant des mammifères, comme la souris, sont à envisager.

L'absence de nouveaux antibiotiques conduit à envisager de nouvelles thérapies ciblant les régulateurs de virulence bactériens, notamment ceux qui sont impliqués dans le QS tels que le système *Agr* pour les staphylocoques (Khan *et al.*, 2015). Chez *S. aureus*, *AgrA* et *AgrD* ont été identifiées comme étant les cibles les plus prometteuses pour le développement de molécules dirigées contre le système *Agr* (Khan *et al.*, 2015). À ce jour, plusieurs composés ciblant le régulateur *AgrA* ont été développés et ont permis d'atténuer la virulence liée au système *Agr* de *S. aureus* (Khan *et al.*, 2015). Cependant, on peut penser que *AgrA* ne représente pas la meilleure cible pour contrer la virulence de *S. aureus* étant donné que l'inactivation de ce régulateur entraîne une augmentation de la formation du biofilm qui joue un rôle essentiel dans l'étape initiale des infections sur dispositifs médicaux. Chez ce pathogène, il est donc préférable de cibler *AgrD* (codant l'AIP du système *Agr*) puisque cette molécule influence directement le QS de manière extracellulaire (Khan *et al.*, 2015). De plus, cette stratégie permet d'éviter les potentielles complications d'absorption et de dégradation cellulaires qui peuvent être rencontrées dans les inhibiteurs intracellulaires tels que ceux ciblant *AgrA* (Khan *et al.*, 2015). A l'inverse de *S. aureus*, nos données indiquent que l'utilisation d'*AgrA* comme cible thérapeutique pouvant interférer à la fois dans la pathogénicité de *S. lugdunensis* et dans la formation de biofilm semble intéressante et appropriée pour cette espèce.



À partir de nos résultats obtenus par l'analyse transcriptomique, réalisée dans le but d'identifier le régulon AgrA de *S. lugdunensis*, la recherche du motif de fixation de ce régulateur nous a permis de déterminer 48 cibles potentielles pouvant être directement régulées par AgrA. La suite de ce travail sera de caractériser expérimentalement cette activité directe. Dans ce but, le gène *agrA* a été cloné dans le vecteur d'expression pQE30 et transformé dans la souche d'*E. coli* M15pRep4 afin de surexprimer la protéine AgrA. Les perspectives sont donc maintenant de purifier la protéine AgrA en utilisant une colonne Nickel-NTA, induire une phosphorylation *in vitro* de AgrA, et de réaliser des expériences d'interactions entre les régions promotrices des 48 cibles potentielles et AgrA par des expériences de retards sur gel ou par MicroScale Thermophoresis (MST).

## 2. ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA CONCENTRATION EN FER CHEZ *S. LUGDUNENSIS*

Au cours de l'infection, l'acquisition du fer est essentielle pour la propagation et la survie des bactéries pathogènes (Contreras *et al.*, 2014). Cependant, le fer n'est pas disponible pour les bactéries dans le système circulatoire de l'Homme puisqu'il est majoritairement séquestré par des molécules telles que des hémoprotéines (hémoglobine, lactoferrine, transferrine, ferritine) (Hammer et Skaar, 2011). L'hème contenu dans l'hémoglobine a été identifié comme étant la principale source de fer chez l'Homme (Brozyna *et al.*, 2014). Ainsi, les agents pathogènes ont développé des mécanismes pour récupérer du fer, afin de satisfaire leurs besoins nutritionnels (Contreras *et al.*, 2014). Un des principaux dispositifs qui permet aux bactéries de capturer le fer contenu dans l'hème est le système Isd. Ce système, codé par le locus *isd*, a été découvert chez *S. aureus* et fut caractérisé comme voie principale d'absorption du fer hémique (Mazmanian *et al.*, 2002). De plus, l'analyse du génome de *S. lugdunensis* a permis d'identifier la présence du locus *isd* (Heilbronner *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données nous a orientés vers l'étude de la limitation en fer comme facteur environnemental rencontré par les bactéries pathogènes dans l'hôte. Au début de ce projet de thèse, *S. lugdunensis* était considéré comme la seule espèce de CoNS à posséder le locus *isd*, le distinguant des autres CoNS (Heilbronner *et al.*, 2011). Cependant, en 2020, ce locus a été découvert chez deux autres espèces de CoNS, *S. caprae* et *S. capititis* (Sun *et al.*, 2020). Toutefois, l'analyse du locus *isd* chez *S. caprae* et *S. capititis* a révélé que le mécanisme de fonctionnement de ces systèmes était différent de celui de *S. lugdunensis* et *S. aureus*. Aucun domaine NEAT qui pourrait lier l'hémoglobine n'a été trouvé chez *S. caprae* et une substitution d'acides aminés dans IsdL pouvant conférer la perte de fonction de la liaison à l'hémoglobine a été identifiée chez *S. capititis*.



(Sun *et al.*, 2020), ce qui suggère que *S. lugdunensis* est toujours la seule espèce de CoNS se rapprochant le plus de *S. aureus*.

Le deuxième objectif de ce projet de thèse a donc été d'étudier les impacts de la condition de limitation en fer chez *S. lugdunensis*. Des approches phénotypiques ont été réalisées ainsi que des approches de transcriptomique et de protéomique globales qui nous ont permis d'identifier le premier stimulus et le premier protéome de stress chez *S. lugdunensis*. La stratégie mise en place pour étudier cette condition de limitation en fer a été d'utiliser un chélateur de fer (DIP) (Farrand *et al.*, 2015) et de comparer la condition de culture de *S. lugdunensis* en absence de DIP. Nous avons également complémenté cette condition de carence en fer par l'ajout de  $\text{FeSO}_4$  dans le milieu de culture.

Afin de mimer la condition de limitation en fer au laboratoire, plusieurs chélateurs de fer ont été testés, tels que l'EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique), la déféroxamine (Desférax) et le DIP. L'EDTA est connu pour son important pouvoir chélatant des ions bivalents tels que le  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Notre but premier était d'étudier uniquement la limitation en fer, c'est pourquoi nous avons recherché un autre composé. Notre recherche s'est portée vers l'utilisation de la déféroxamine, décrit comme un bon chélateur de fer (Ruivard, 2013). C'est un agent chélateur des cations trivalents, comme l'ion ferrique et l'ion aluminium (Ruivard, 2013). Plusieurs essais ont été menés en utilisant la déféroxamine, cependant les résultats obtenus au niveau des courbes de croissance n'étaient pas satisfaisants. Compte tenu des études publiées dans la littérature concernant la limitation en fer chez *S. lugdunensis*, nous avons choisi d'utiliser le DIP à une concentration de 350  $\mu\text{M}$  (Farrand *et al.*, 2015).

Dans le but de comparer la virulence des cellules de *S. lugdunensis* cultivées en condition normale (milieu BHI) et cultivées en condition de limitation en fer (BHI avec DIP), le modèle d'infection larvaire de *G. mellonella* a été utilisé. A l'initiation de mon projet de thèse, aucune étude n'avait étudié la virulence de *S. lugdunensis* par ce modèle. Il a donc été nécessaire d'élaborer un protocole adapté pour cette espèce bactérienne. Dans le cadre d'une collaboration menée avec le laboratoire GRAM 2.0, nous avons mis au point la méthode d'évaluation de la pathogénicité de *S. lugdunensis* en modèle *G. mellonella*. Nos résultats ont révélé que la limitation en fer avait un impact significatif sur la virulence de *S. lugdunensis* dans ce modèle animal.

L'effet de la limitation en fer sur la plus grande capacité à former du biofilm chez *S. lugdunensis* a également été étudié. Ces données confirment les résultats observés dans l'étude publiée par Missineo *et al.* (Missineo *et al.*, 2014). De plus, la limitation en fer a impacté la résistance au stress oxydatif rendant plus sensibles les cellules de *S. lugdunensis* à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Mon projet de thèse a permis la publication du stimulon de limitation en fer chez *S. lugdunensis* et du premier protéome de stress réalisé chez *S. lugdunensis*. Ces résultats ont fourni un aperçu de la régulation transcriptionnelle et traductionnelle qui a eu lieu en réponse à la condition de limitation en fer. Ainsi, *S. lugdunensis* se montre capable d'induire un arsenal particulièrement important de mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer. Le système *lsd*, des transporteurs de sidérophores (opéron *sir*, opéron *sst*, opéron *thu*, gène codant la synthase de la staphyloferrine A) et des transporteurs ECF (opéron *lha* et opéron *SLUG\_19150-SLUG\_19170*) sont fortement exprimés lors d'une restriction en fer chez *S. lugdunensis*.

À ce jour, *S. lugdunensis* est la seule espèce parmi les staphylocoques qui bénéficie d'un transporteur ECF (LhaSTA), en plus du système *lsd*, impliqué dans la capture du fer contenu dans l'hème (Jochim *et al.*, 2020). Fait intéressant, ce transporteur est capable de capturer le fer à partir de l'hème mais également à partir d'autres hémoprotéines, le distinguant du système *lsd* (Jochim *et al.*, 2020). Dans notre étude, nous rapportons l'identification d'un nouveau transporteur ECF putatif (*SLUG\_19150-SLUG\_19170*) similaire à LhaSTA. Ces deux opérons présentent de nombreuses similarités : ils sont fortement induits dans des conditions de limitation en fer, ils sont localisés dans un cluster de plusieurs gènes, ils possèdent un motif Fur-box dans la région promotrice, et l'homologie de séquence des 3 gènes des systèmes ECF est comprise entre 48,2 % et 52,8 %. Toutes ces données nous permettent de suggérer l'hypothèse que ce nouvel opéron est impliqué dans l'acquisition du fer chez *S. lugdunensis*.

La coexistence de ces trois systèmes d'acquisition du fer chez *S. lugdunensis* peut être responsable du caractère pathogène opportuniste de cette espèce et est nécessaire pour déclencher une maladie invasive. L'identification de ce nouveau transporteur ECF soutient que *S. lugdunensis* possède un arsenal particulièrement important de systèmes d'acquisition du fer, ce qui lui apporte un avantage supplémentaire lors de l'infection. En perspectives de ce travail, il serait intéressant de connaître les hémoprotéines que ce nouveau transporteur est capable de lier. Cela permettrait d'élargir ainsi la gamme d'hémoprotéines accessibles à *S. lugdunensis*. La caractérisation phénotypique de ce nouveau transporteur ECF associée à celle de LhaSTA sont à envisager afin de mieux comprendre le rôle de ces dispositifs dans l'acquisition du fer et de déterminer leur possible implication dans la pathogénicité de cette espèce. Enfin, il serait intéressant de déterminer si des transporteurs ECF sont également actifs chez d'autres staphylocoques et d'autres agents pathogènes bactériens.

Pour surmonter la restriction nutritionnelle en fer mise en place par l'hôte, *S. aureus* est capable de produire des sidérophores (les staphyloferrines A et B) importants pour l'acquisition du fer pendant l'infection (Hammer et Skaar, 2011). Contrairement à *S. aureus*, *S. lugdunensis* est incapable de produire



des sidérophores, néanmoins il possède les gènes codant le transport des staphyloferrines A et B (opérons *htsABC* et *sirABC*), il est donc probable que ce type de transport représente pour lui un mécanisme de piégeage de ces sidérophores qui sont produites par d'autres espèces staphylococciques telles que *S. aureus* (Brozyna *et al.*, 2014). En coculture avec *S. aureus* dans un milieu limité en fer, il apparaît que la croissance de *S. lugdunensis* est améliorée, suggérant que *S. lugdunensis* a la capacité d'exploiter les staphyloferrines produites par *S. aureus* (Brozyna *et al.*, 2014). Cela représente un avantage pour *S. lugdunensis* dans sa stratégie « opportuniste » (Brozyna *et al.*, 2014). Même si *S. lugdunensis* colonise principalement la peau de l'Homme et *S. aureus* est présent majoritairement dans les muqueuses nasales (Bieber et Kahlmeter, 2010), ces deux staphylocoques sont amenés à être en compétition sur toute la surface externe du corps. *S. lugdunensis*, producteur de lugdunine, peut éradiquer *S. aureus* et réduire fortement le taux de colonisation nasale par *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016). En plus de son activité antimicrobienne, la lugdunine est impliquée dans l'augmentation de la production des peptides de défense antibactériens en stimulant les cellules de la peau humaine (Bitschar *et al.*, 2019). Ces peptides agissent en synergie avec la lugdunine elle-même et permettent l'élimination des micro-organismes sensibles (Bitschar *et al.*, 2019). Aussi, *S. lugdunensis* se retrouve fréquemment en concurrence avec d'autres espèces bactériennes que *S. aureus* puisqu'il est retrouvé dans 60 % des infections associé à d'autres bactéries (Herchline et Ayers, 1991).

La présence des gènes de transport des sidérophores ainsi que des trois systèmes d'acquisition du fer (Isd, LhaSTA et le nouveau transporteur ECF) indiquent que *S. lugdunensis* est équipé d'un arsenal important de mécanismes d'homéostasie du fer qui peuvent jouer un rôle dans sa persistance lorsqu'il se retrouve en présence d'un consortium bactérien. Dans ces situations de « compétition », *S. lugdunensis* pourrait être une espèce bien adaptée pour provoquer des infections opportunistes chez l'Homme. L'utilisation de la lugdunine comme nouveau médicament potentiel pour la décolonisation et le traitement des infections à *S. aureus* apparaît prometteuse, d'autant plus qu'aucune résistance spontanée à cette molécule n'a été observée chez *S. aureus* (Zipperer *et al.*, 2016 ; Krauss *et al.*, 2020). En perspective, des analyses de métagénomique du microbiote cutané sont à envisager dans le but d'identifier les bactéries qui peuvent rentrer en compétition avec *S. lugdunensis* chez l'Homme et d'étudier l'effet de la lugdunine sur ces dernières.



# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## A

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C. & Tarkowski, A. 1993. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* **61**, 3879–3885.
- Akiyama, H., Kanzaki, H., Tada, J. & Arata, J. 1998. Coagulase-negative staphylococci isolated from various skin lesions. *J Dermatol* **25**, 563–568.
- Allard, M. *et al.* 2006. Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth *in vitro* and in a tissue cage model *in vivo*. *Microb Infect* **8**, 1679–1690.
- Anderson, M., Chen, Y.-H., Butler, E. K. & Missiakas, D. M. 2011. EsaD, a secretion factor for the Ess pathway in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **193**, 1583–1589.
- Anderson, M. *et al.* 2016. EssE promotes *Staphylococcus aureus* Ess-dependent protein secretion to modify host immune responses during infection. *J Bacteriol* **199**, e00527-16.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quiñones, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215–237.
- Anguera, I. *et al.* 2005. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart* **91**, e10.
- Arciola, C. R. *et al.* 2006. Prevalence and antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing orthopedic implants. *Int J Artif Organs* **29**, 395–401.
- 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., Hansmann, Y., Riegel, P. & Prévost, G. 2017. Is *Staphylococcus lugdunensis* significant in clinical samples? *J Clin Microbiol* **55**, 3167–3174.
- Argemi, X. *et al.* 2017. Whole-genome sequencing of seven strains of *Staphylococcus lugdunensis* allows identification of mobile genetic elements. *Genome Biol Evol* **9**.
- Argemi, X. *et al.* 2017. VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metallo-protease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Infect* **23**, 334.e1-334.e8.
- Argemi, X. *et al.* 2017. Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* **88**, 298–304.
- Argemi, X. *et al.* 2018. Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-genome and multiple barriers to horizontal gene transfer. *BMC Genomics* **19**, 621.
- Aubourg, M. *et al.* 2020. Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*. *BMC Microbiol* **20**, 328.
- Aubourg, M., Gravey, F., Dhalluin, A. & Giard, J.-C. 2021. Identification of the iron-limitation stimulon in *Staphylococcus lugdunensis*. *Arch Microbiol* **203**, 3687–3694.
- Azimi, T. *et al.* 2020. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) meningitis: a narrative review of the literature from 2000 to 2020. *New Microbes New Infect* **37**, 100755.

## B

- Bannerman, T. L. & Peacock, S. J. 2006. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. *Manual of clinical microbiology: Volume 1* 390–411.
- Bannerman, T. L., Rhoden, D. L., McAllister, S. K., Miller, J. M. & Wilson, L. A. 1997. The source of coagulase-negative staphylococci in the endophthalmitis vitrectomy study. A comparison of eyelid and intraocular isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Arch Ophthalmol* **115**, 357–361.
- Barrett, J. F. & Hoch, J. A. 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infec-

- tive therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1529–1536.
- Bayles, K. W. 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **5**, 721–726.
- Beasley, F. C. *et al.* 2009. Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **72**, 947–963.
- Beavers, W. N. & Skaar, E. P. 2016. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis* **74**, ftw060.
- Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **27**, 870–926.
- Bellamy, R. & Barkham, T. 2002. *Staphylococcus lugdunensis* infection sites: predominance of abscesses in the pelvic girdle region. *Clin Infect Dis* **35**, E32-34.
- Benito, Y. *et al.* 2000. Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA* **6**, 668–679.
- Benito, Y., Lina, G., Greenland, T., Etienne, J. & Vandenesch, F. 1998. *trans*-Complementation of a *Staphylococcus aureus* agr mutant by *Staphylococcus lugdunensis* agr RNAIII. *J Bacteriol* **180**, 5780–5783.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S. & Götz, F. 2006. The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various Staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect Immun* **74**, 4598–4604.
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W. & Götz, F. 2005. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **55**, 778–787.
- Berbari, E. F. *et al.* 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of native vertebral osteomyelitis in adults. *Clin Infect Dis* **61**, e26-46.
- Beulin, D. S. & Ponnuraj, K. 2017. Steered molecular dynamics study reveals insights into the function of the repetitive B region of collagen- and fibrinogen-binding MSCRAMMs. *J Biomol Struct Dyn* **35**, 535–550.
- Bieber, L. & Kahlmeter, G. 2010. *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. *Clin Microbiol Infect* **16**, 385–388.
- Bier, K. & Schittek, B. 2021. Beneficial effects of coagulase-negative Staphylococci on *Staphylococcus aureus* skin colonization. *Experimental Dermatology* **30**, 1442–1452.
- Bierowiec, K. 2020. Cross-sectional study of *Staphylococcus lugdunensis* prevalence in cats. *Sci Rep* **10**, 15417.
- Biswas, L. *et al.* 2009. Role of the twin-arginine translocation pathway in *Staphylococcus*. *J Bacteriol* **191**, 5921–5929.
- Bitschar, K. *et al.* 2019. Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. *Nat Commun* **10**, 2730.
- Blake, C. C. *et al.* 1967. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **167**, 378–388.
- Böcher, S., Tønning, B., Skov, R. L. & Prag, J. 2009. *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of Skin and soft tissue infections in the community. *J Clin Microbiol* **47**, 946–950.
- Boisset, S. *et al.* 2007. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* **21**, 1353–1366.
- Bonar, E., Wójcik, I. & Wladyka, B. 2015. Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. *Acta Biochim Pol* **62**, 367–381.
- Bor, D. H., Woolhandler, S., Nardin, R., Brusch, J. & Himmelstein, D. U. 2013. Infective endocarditis in the U.S., 1998–2009: a nationwide study. *PLoS One* **8**, e60033.
- Bose, J. L., Lehman, M. K., Fey, P. D. & Bayles, K. W. 2012. Contribution of the *Staphylococcus aureus*

- Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *PLoS One* **7**, e42244.
- Bourgeois, I. *et al.* 2009. Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase activities. *FEMS Microbiol Lett* **290**, 105–113.
- Bourgeois, I., Pestel-Caron, M., Lemeland, J.-F., Pons, J.-L. & Caron, F. 2007. Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 740–743.
- Bowden, M. G. *et al.* 2005. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **151**, 1453–1464.
- Brozyna, J. R., Sheldon, J. R. & Heinrichs, D. E. 2014. Growth promotion of the opportunistic human pathogen, *Staphylococcus lugdunensis*, by heme, hemoglobin, and coculture with *Staphylococcus aureus*. *Microbiologyopen* **3**, 182–195.
- Brunskill, E. W. & Bayles, K. W. 1996. Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178**, 5810–5812.
- Bubeck Wardenburg, J., Patel, R. J. & Schneewind, O. 2007. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* **75**, 1040–1044.
- Buchan, K. D., Foster, S. J. & Renshaw, S. A. Y. 2019. *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system. *Microbiology* **165**, 367–385.
- Burts, M. L., DeDent, A. C. & Missiakas, D. M. 2008. EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **69**, 736–746.
- Burts, M. L., Williams, W. A., DeBord, K. & Missiakas, D. M. 2005. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1169–1174.
- C**
- Cao, Z., Casabona, M. G., Kneuper, H., Chalmers, J. D. & Palmer, T. 2016. The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. *Nat Microbiol* **2**, 16183.
- Cassat, J. E. *et al.* 2013. A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe* **13**, 759–772.
- Castro, J. G. & Dowdy, L. 1999. Septic shock caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Infect Dis* **28**, 681–682.
- Chaouni, L. B., Etienne, J., Greenland, T. & Vandenesch, F. 1996. Nucleic acid sequence and affiliation of pLUG10, a novel cadmium resistance plasmid from *Staphylococcus lugdunensis*. *Plasmid* **36**, 1–8.
- Chassain, B. *et al.* 2012. Multilocus sequence typing analysis of *Staphylococcus lugdunensis* implies a clonal population structure. *J Clin Microbiol* **50**, 3003–3009.
- Chatzigeorgiou, K., Siafakas, N., Petinaki, E. & Zerva, L. 2010. *fbl* gene as a species-specific target for *Staphylococcus lugdunensis* identification. *J Clin Lab Anal* **24**, 119–122.
- Cheung, A. L. *et al.* 1994. Diminished virulence of a *sar/agr*- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* **94**, 1815–1822.
- Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H. & Xiong, Y.-Q. 2004. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**, 1–9.
- Cheung, A. L. & Zhang, G. 2002. Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front Biosci* **7**, d1825-1842.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. & Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **12**, 547–569.
- Cheung, G. Y. C., Joo, H.-S., Chatterjee, S. S. & Otto, M. 2014. Phenol-soluble modulins – critical deter-

- minants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 698–719.
- Chokr, A. *et al.* 2006. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int J Med Microbiol* **296**, 381–388.
- Choudhary, K. S. *et al.* 2018. The *Staphylococcus aureus* two-component system AgrAC displays four distinct genomic arrangements that delineate genomic virulence factor signatures. *Front Microbiol* **9**, 1082.
- Christner, M. *et al.* 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol* **75**, 187–207.
- Clarke, S. R. *et al.* 2007. The *Staphylococcus aureus* surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin. *Cell Host Microbe* **1**, 199–212.
- Coimbra-E-Souza, V. *et al.* 2019. Short communication: Diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from goat milk. *J Dairy Sci* **102**, 5518–5524.
- Contreras, H., Chim, N., Credali, A. & Goulding, C. W. 2014. Heme uptake in bacterial pathogens. *Curr Opin Chem Biol* **0**, 34–41.
- Cosgrove, K. *et al.* 2007. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 1025–1035.
- Cucarella, C. *et al.* 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**, 2888–2896.

## D

- Dahyot, S. *et al.* 2018. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*. *Sci Rep* **8**, 11669.
- Dahyot, S. *et al.* 2020. Role of the LytSR two-component regulatory system in *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation and pathogenesis. *Front Microbiol* **11**, 39.
- Dai, Y. *et al.* 2017. A novel ESAT-6 secretion system-secreted protein EsxX of community-associated *Staphylococcus aureus* lineage ST398 contributes to immune evasion and virulence. *Front Microbiol* **8**, 819.
- Davies, D. G. *et al.* 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295–298.
- de Vor, L., Rooijakers, S. H. M. & van Strijp, J. A. G. 2020. Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Lett* **594**, 2556–2569.
- Delaunay, F., Pegot, A., Coquerel-Beghin, D., Aktouf, A. & Auquit-Auckbur, I. 2014. *Staphylococcus lugdunensis* necrotizing fasciitis after abdominal dermoliposcopy: report of two cases and review of the literature. *Ann Chir Plast Esthet* **59**, 136–139.
- Diekema, D. J. *et al.* 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 2**, S114–132.
- Donvito, B. *et al.* 1997. Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infect Immun* **65**, 95–100.
- Donvito, B. *et al.* 1997. Distribution of the synergistic haemolysin genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in human staphylococci. *FEMS Microbiol Lett* **151**, 139–144.
- Douiri, N. *et al.* 2016. *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections. *Clin Microbiol Infect* **22**, 747–748.
- Dufour, P. *et al.* 2002. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol* **184**, 1180–1186.

## F

- Farrand, A. J. *et al.* 2015. An iron-regulated autolysin remodels the cell wall to facilitate heme acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. *Infect Immun* **83**, 3578–3589.
- Fechter, P., Caldelari, I., Liolliou, E. & Romby, P. 2014. Novel aspects of RNA regulation in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters* **588**, 2523–2529.
- Ferguson, K. P., Lambe, D. W., Keplinger, J. L. & Kalbfleisch, J. H. 1991. Comparison of the pathogenicity of three species of coagulase-negative *Staphylococcus* in a mouse model with and without a foreign body. *Can J Microbiol* **37**, 722–724.
- Ferreira, A. M., Martins, K. B., Silva, V. R. da, Mondelli, A. L. & Cunha, M. de L. R. de S. da. 2016. Correlation of phenotypic tests with the presence of the *blaZ* gene for detection of beta-lactamase. *Braz J Microbiol* **48**, 159–166.
- Flannagan, R. S., Heit, B. & Heinrichs, D. E. 2015. Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* **4**, 826–868.
- Flannagan, R. S., Watson, D. W., Surewaard, B. G. J., Kubes, P. & Heinrichs, D. E. 2018. The surreptitious survival of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis* within macrophages as an immune evasion strategy. *Cell Microbiol* **20**, e12869.
- Fleurette, J. *et al.* 1989. Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents. *Res Microbiol* **140**, 107–118.
- Fluit, A. C., Verhoef, J., Schmitz, F. J., & European SENTRY Participants. 2001. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997–1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**, 617–625.
- Fowler, V. G. *et al.* 2004. Persistent bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level *in vitro* resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis* **190**, 1140–1149.
- Frank, K. L., Del Pozo, J. L. & Patel, R. 2008. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Rev* **21**, 111–133.
- Frank, K. L. & Patel, R. 2007. Poly-N-Acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun* **75**, 4728–4742.
- Frank, K. L., Reichert, E. J., Piper, K. E. & Patel, R. 2007. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 888–895.
- Freney, J. *et al.* 1988. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **38**, 168–172.

## G

- Geisinger, E., Adhikari, R. P., Jin, R., Ross, H. F. & Novick, R. P. 2006. Inhibition of *rot* translation by RNAlII, a key feature of *agr* function. *Mol Microbiol* **61**, 1038–1048.
- Geissmann, T. *et al.* 2009. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res* **37**, 7239–7257.
- Geoghegan, J. A. *et al.* 2010. Molecular characterization of the interaction of Staphylococcal Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with Fibrinogen. *J Biol Chem* **285**, 6208–6216.
- Gianella, S., Ulrich, S., Huttner, B. & Speich, R. 2006. Conservative management of a brain abscess in a patient with *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**, 476–478.
- Gibert, L. *et al.* 2014. The major autolysin of *Staphylococcus lugdunensis*, AtlL, is involved in cell separation, stress-induced autolysis and contributes to bacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **352**,

78–86.

- Gilbert, I. 1931. Dissociation in an encapsulated *Staphylococcus*. *J Bacteriol* **21**, 157–160.
- Gillaspy, A. F. *et al.* 1995. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun* **63**, 3373–3380.
- Gillet, Y. *et al.* 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* **359**, 753–759.
- Giormezis, N. *et al.* 2015. Virulence factors among *Staphylococcus lugdunensis* are associated with infection sites and clonal spread. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **34**, 773–778.
- Goldstein, E. J. C. *et al.* 2006. *In Vitro* activity of ceftobiprole against aerobic and anaerobic strains isolated from diabetic foot infections. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3959–3962.
- Grice, E. A. & Segre, J. A. 2011. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* **9**, 244–253.
- Grigg, J. C., Ukpabi, G., Gaudin, C. F. M. & Murphy, M. E. P. 2010. Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* *Isd* system. *J Inorg Biochem* **104**, 341–348.
- Guet-Revillet, H. *et al.* 2014. Bacterial pathogens associated with hidradenitis suppurativa, France. *Emerg Infect Dis* **20**, 1990–1998.

## H

- Haile, D. T. *et al.* 2002. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive urine cultures and relationship to urinary tract infection. *J Clin Microbiol* **40**, 654–656.
- Haley, K. P., Janson, E. M., Heilbronner, S., Foster, T. J. & Skaar, E. P. 2011. *Staphylococcus lugdunensis* *IsdG* liberates iron from host heme. *J Bacteriol* **193**, 4749–4757.
- Hammer, N. D. & Skaar, E. P. 2011. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu Rev Microbiol* **65**, 10.1146/annurev-micro-090110-102851.
- Hartford, O., Francois, P., Vaudaux, P. & Foster, T. J. 1997. The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Mol Microbiol* **25**, 1065–1076.
- Hébert, G. A. 1990. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Clin Microbiol* **28**, 2425–2431.
- Hecker, M., Mäder, U. & Völker, U. 2018. From the genome sequence via the proteome to cell physiology - Pathoproteomics and pathophysiology of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **308**, 545–557.
- Heilbronner, S. & Foster, T. J. 2021. *Staphylococcus lugdunensis*: a skin commensal with invasive pathogenic potential. *Clin Microbiol Rev* **34**, e00205-20.
- Heilbronner, S., Hanses, F., Monk, I. R., Speziale, P. & Foster, T. J. 2013. Sortase A promotes virulence in experimental *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Microbiology* **159**, 2141–2152.
- Heilbronner, S., Monk, I. R. & Foster, T. J. 2013. The phage integrase vector pIPI03 allows RecA-independent, site-specific labelling of *Staphylococcus lugdunensis* strains. *Plasmid* **70**, 377–384.
- Heilbronner, S. *et al.* 2011. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS Microbiol Lett* **322**, 60–67.
- Heilbronner, S. *et al.* 2016. Competing for iron: duplication and amplification of the *isd* locus in *Staphylococcus lugdunensis* HKU09-01 provides a competitive advantage to overcome nutritional limitation. *PLoS Genet* **12**, e1006246.
- Heilmann, C. *et al.* 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**, 1083–1091.
- Heilmann, C., Ziebuhr, W. & Becker, K. 2019. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect* **25**, 1071–1080.
- Heinrichs, J. H., Bayer, M. G. & Cheung, A. L. 1996. Characterization of the *sar* locus and its interaction

- with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178**, 418–423.
- Heldt Manica, L. A. & Cohen, P. R. 2017. *Staphylococcus lugdunensis* infections of the skin and soft tissue: a case series and review. *Dermatol Ther* **7**, 555–562.
- Hellbacher, C., Törnqvist, E. & Söderquist, B. 2006. *Staphylococcus lugdunensis*: clinical spectrum, antibiotic susceptibility, and phenotypic and genotypic patterns of 39 isolates. *Clin Microbiol Infect* **12**, 43–49.
- Herchline, T. E. & Ayers, L. W. 1991. Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *J Clin Microbiol* **29**, 419–421.
- Higaki, S., Kitagawa, T., Morohashi, M. & Yamagishi, T. 1999. Distribution and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci from skin lesions. *J Int Med Res* **27**, 191–195.
- Ho, P.-L. *et al.* 2015. Carriage niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* **81**, 141–144.
- Hochkeppel, H. K. *et al.* 1987. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. *J Clin Microbiol* **25**, 526–530.
- Hood, M. I. & Skaar, E. P. 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**, 10.1038/nrmicro2836.
- Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C. & Becker, K. 2015. The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization. *Int J Med Microbiol* **305**, 129–139.

## J

- Jarløv, J. O. *et al.* 1996. Coagulase-negative Staphylococci in Danish blood cultures: species distribution and antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* **32**, 217–227.
- Jarraud, S. *et al.* 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**, 6517–6522.
- Ji, G., Beavis, R. & Novick, R. P. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**, 2027–2030.
- Jochim, A. *et al.* 2020. An ECF-type transporter scavenges heme to overcome iron-limitation in *Staphylococcus lugdunensis*. *eLife* **9**, e57322.
- Johansson, M. U. *et al.* 1997. Solution structure of the albumin-binding GA module: a versatile bacterial protein domain. *J Mol Biol* **266**, 859–865.

## K

- Karavolos, M. H., Horsburgh, M. J., Ingham, E. & Foster, S. J. 2003. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **149**, 2749–2758.
- Karnani, R. & Myers, J. P. 2008. Bone and joint infections caused by *Staphylococcus lugdunensis*: report of 2 cases and review of the literature. *Infect Dis Clin Pract* **16**, 94–99.
- Kasprowicz, A. *et al.* 2011. The occurrence and comparative phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. from healthy and diseased, household and shelter dogs, based on routine biochemical diagnostic methods. *Pol J Microbiol* **60**, 19–26.
- Keshav, S., Chung, P., Milon, G. & Gordon, S. 1991. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by *in situ* hybridization. *J Exp Med* **174**, 1049–1058.
- Khan, B. A., Yeh, A. J., Cheung, G. Y. C. & Otto, M. 2015. Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Opin Investig Drugs* **24**, 689–704.
- Kinkel, T. L., Roux, C. M., Dunman, P. M. & Fang, F. C. 2013. The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *mBio* **4**, e00696-00613.

- Knobloch, J. K.-M., Horstkotte, M. A., Rohde, H. & Mack, D. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* **191**, 101–106.
- Kocianova, S. *et al.* 2005. Key role of poly-γ-dl-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest* **115**, 688–694.
- Koenig, R. L., Ray, J. L., Maleki, S. J., Smeltzer, M. S. & Hurlburt, B. K. 2004. *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-agr regulatory region. *J Bacteriol* **186**, 7549–7555.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. & Jabbouri, S. 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 11–16.
- Korea, C. G. *et al.* 2014. Staphylococcal Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. *Infect Immun* **82**, 4144–4153.
- Kragsbjerg, P., Bomfim-Loogna, J., Törnqvist, E. & Söderquist, B. 2000. Development of antimicrobial resistance in *Staphylococcus lugdunensis* during treatment-report of a case of bacterial arthritis, vertebral osteomyelitis and infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect* **6**, 496–499.
- Krauss, S. *et al.* 2020. Secretion of and self-resistance to the novel fibuopeptide antimicrobial lugdunin by distinct ABC transporters in *Staphylococcus lugdunensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **65**, e01734-20.
- Kubica, M. *et al.* 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **3**, e1409.
- Kyaw, H. *et al.* 2018. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis and cerebrovascular accident: a systemic review of risk factors and clinical outcome. *Cureus* **10**.

## L

- Lambe, D. W., Ferguson, K. P., Keplinger, J. L., Gemmell, C. G. & Kalbfleisch, J. H. 1990. Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors. *Can J Microbiol* **36**, 455–463.
- Lambe, D. W., Jeffery, C., Ferguson, K. P. & Cooper, M. D. 1994. Examination of the glycocalyx of four species of *Staphylococcus* by transmission electron microscopy and image analysis. *Microbios* **78**, 133–143.
- Le, K. Y. & Otto, M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front Microbiol* **6**, 1174.
- Lebeurre, J. *et al.* 2019. Comparative genome analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows clonal complex-dependent diversity of the putative virulence factor, ess/Type VII locus. *Front Microbiol* **10**, 2479.
- Liesenborghs, L. *et al.* 2016. Shear-resistant binding to von Willebrand factor allows *Staphylococcus lugdunensis* to adhere to the cardiac valves and initiate endocarditis. *J Infect Dis* **213**, 1148–1156.
- Lin, J.-F. *et al.* 2015. Clinical experience and microbiologic characteristics of invasive *Staphylococcus lugdunensis* infection in a tertiary center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **48**, 406–412.
- Lindsay, J. A. & Riley, T. V. 1994. Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression. *Infect Immun* **62**, 2309–2314.
- Liu, C. *et al.* 2012. Clinical and microbiological characterization of *Staphylococcus lugdunensis* isolates obtained from clinical specimens in a hospital in China. *BMC Microbiol* **12**, 168.
- Liu, G. Y. *et al.* 2005. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* **202**, 209–215.
- Liu, J. *et al.* 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCCmec): a mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* **101**, 56–67.
- Liu, P.-Y. *et al.* 2010. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: a literature review and analysis of risk factors. *J Microbiol Immunol Infect* **43**, 478–484.

- Loughran, A. J. *et al.* 2014. Impact of individual extracellular proteases on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic *sarA* mutants. *Microbiologyopen* **3**, 897–909.
- Lourtet-Hascoët, J., Bicart-See, A., Félicé, M. P., Giordano, G. & Bonnet, E. 2016. *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Infect Dis* **51**, 56–61.
- Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**, 520–532.
- Lu, Y. *et al.* 2013. 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* **51**, 1310–1312.

## M

- Mack, D. *et al.* 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**, 175–183.
- Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu Rev Genet* **16**, 135–168.
- Malachowa, N. *et al.* 2011. Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. *PLoS One* **6**, e18617.
- Marlinghaus, L. *et al.* 2012. Construction and characterization of three knockout mutants of the *fbl* gene in *Staphylococcus lugdunensis*. *APMIS* **120**, 108–116.
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Jensen, E. R., Lenoy, E. & Schneewind, O. 2000. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5510–5515.
- Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K. & Schneewind, O. 2002. An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2293–2298.
- McHardy, I. H. *et al.* 2017. Clinical and microbiological aspects of β-Lactam resistance in *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* **55**, 585–595.
- Melly, M. A., Duke, L. J., Liau, D. F. & Hash, J. H. 1974. Biological properties of the encapsulated *Staphylococcus aureus* M. *Infect Immun* **10**, 389–397.
- Merino, N. *et al.* 2009. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**, 832–843.
- Mijajlovic, H. *et al.* 2010. Direct interaction of iron-regulated surface determinant *IsdB* of *Staphylococcus aureus* with the GPIIb/IIIa receptor on platelets. *Microbiology* **156**, 920–928.
- Mishra, N. N. *et al.* 2011. Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 526–531.
- Missineo, A. *et al.* 2014. *IsdC* from *Staphylococcus lugdunensis* induces biofilm formation under low-iron growth conditions. *Infect Immun* **82**, 2448–2459.
- Mitchell, J., Tristan, A. & Foster, T. J. 2004. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein *Fbl* of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology* **150**, 3831–3841.
- Monk, I. R., Shah, I. M., Xu, M., Tan, M.-W. & Foster, T. J. 2012. Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* **3**, e00277-11.
- Montanaro, L. *et al.* 2011. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* **34**, 824–831.
- Moreillon, P. *et al.* 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* **63**, 4738–4743.
- Morfeldt, E., Taylor, D., von Gabain, A. & Arvidson, S. 1995. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the *trans*-encoded antisense RNA, *RNAIII*. *EMBO J* **14**, 4569–4577.
- Morfeldt, E., Tegmark, K. & Arvidson, S. 1996. Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence

gene regulator, RNAlII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **21**, 1227–1237.

## N

- Nakamura, Y. *et al.* 2020. *Staphylococcus* Agr virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development. *Sci Transl Med* **12**, eaay4068.
- Nikolskaya, A. N. & Galperin, M. Y. 2002. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res* **30**, 2453–2459.
- Nilsson, M., Bjerketorp, J., Guss, B. & Frykberg, L. 2004. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **241**, 87–93.
- Nilsson, M. *et al.* 2004. A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **234**, 155–161.
- Novick, R. P. *et al.* 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**, 3967–3975.
- Novick, R. P. *et al.* 1995. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* **248**, 446–458.
- Novick, R. P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**, 1429–1449.

## O

- O'Riordan, K. & Lee, J. C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* **17**, 218–234.
- Onyango, L. A., Dunstan, R. H., Gottfries, J., von Eiff, C. & Roberts, T. K. 2012. Effect of low temperature on growth and ultra-structure of *Staphylococcus* spp. *PLoS One* **7**, e29031.
- Ortiz de la Tabla, V., Gutiérrez-Rodero, F., Martín, C., Zorraquino, A. & Belinchón, I. 1996. *Staphylococcus lugdunensis* as a cause of abscesses in the perineal area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 405–407.
- Otto, M. 2018. Staphylococcal biofilms. *Microbiol Spectr* **6**, 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023.

## P

- Palma, M., Nozohoor, S., Schennings, T., Heimdal, A. & Flock, J. I. 1996. Lack of the extracellular 19-kilodalton fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* decreases virulence in experimental wound infection. *Infect Immun* **64**, 5284–5289.
- Pang, Y. Y. *et al.* 2010. *agr*-Dependent interactions of *Staphylococcus aureus* USA300 with human polymorphonuclear neutrophils. *J Innate Immun* **2**, 546–559.
- Pareja, J., Gupta, K. & Koziel, H. 1998. The toxic shock syndrome and *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia. *Ann Intern Med* **128**, 603–604.
- Park, R.-Y., Sun, H.-Y., Choi, M.-H., Bai, Y.-H. & Shin, S.-H. 2005. *Staphylococcus aureus* siderophore-mediated iron-acquisition system plays a dominant and essential role in the utilization of transferrin-bound iron. *J Microbiol* **43**, 183–190.
- Parthasarathy, S., Shah, S., Raja Sager, A., Rangan, A. & Durugu, S. 2020. *Staphylococcus lugdunensis*: review of epidemiology, complications, and treatment. *Cureus* **12**, e8801.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. & Höök, M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**, 585–617.
- Paulsson, M., Petersson, A. C. & Ljungh, A. 1993. Serum and tissue protein binding and cell surface properties of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Med Microbiol* **38**, 96–102.
- Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. & Schlievert, P. 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **170**, 4365–4372.

- Periasamy, S. *et al.* 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1281–1286.
- Peschel, A. *et al.* 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* **193**, 1067–1076.
- Peschel, A. *et al.* 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**, 8405–8410.
- Pfaller, M. A. *et al.* 1999. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* **33**, 283–297.
- Pinsky, B. A., Samson, D., Ghafghaichi, L., Baron, E. J. & Banaei, N. 2009. Comparison of real-time PCR and conventional biochemical methods for identification of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* **47**, 3472–3477.
- Pishchany, G., Dickey, S. E. & Skaar, E. P. 2009. Subcellular localization of the *Staphylococcus aureus* heme iron transport components IsdA and IsdB. *Infect Immun* **77**, 2624–2634.
- Pishchany, G. *et al.* 2010. Specificity for human hemoglobin enhances *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe* **8**, 544–550.
- Poitevin-Later, F., Vandenesch, F., Dyke, K., Fleurette, J. & Etienne, J. 1992. Cadmium-resistance plasmid in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **78**, 59–63.
- Ponnuraj, K. *et al.* 2003. A 'dock, lock, and latch' structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell* **115**, 217–228.
- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C. & Trieu-Cuot, P. 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative Staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J Clin Microbiol* **39**, 4296–4301.
- Price, E. E. & Boyd, J. M. 2020. Genetic regulation of metal ion homeostasis in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **28**, 821–831.

## Q, R

- Quave, C. L. & Horswill, A. R. 2014. Flipping the switch: tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Front Microbiol* **5**, 706.
- Queck, S. Y. *et al.* 2008. RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* **32**, 150–158.
- Rajendran, N. B. *et al.* 2015. Important contribution of the novel locus comEB to extracellular DNA-dependent *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation. *Infect Immun* **83**, 4682–4692.
- Ramarao, N. & Sanchis, V. 2013. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins* **5**, 1119–1139.
- Rautenberg, M., Joo, H.-S., Otto, M. & Peschel, A. 2011. Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulin release and virulence. *The FASEB Journal* **25**, 1254–1263.
- Ravaioli, S. *et al.* 2020. Various biofilm matrices of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis*: exopolysaccharides, proteins, eDNA and their correlation with biofilm mass. *Biofouling* **36**, 86–100.
- Recsei, P. *et al.* 1986. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol Gen Genet* **202**, 58–61.
- Regassa, L. B., Novick, R. P. & Betley, M. J. 1992. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **60**, 3381–3388.
- Reniere, M. L. & Skaar, E. P. 2008. *Staphylococcus aureus* haem oxygenases are differentially regulated by iron and haem. *Mol Microbiol* **69**, 1304–1315.

- Reniere, M. L., Torres, V. J. & Skaar, E. P. 2007. Intracellular metalloporphyrin metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Biometals* **20**, 333–345.
- Rice, K. C. *et al.* 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8113–8118.
- Rohde, H. *et al.* 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**, 1711–1720.
- Ruivard, M. 2013. Iron chelating therapy in adults: how and when ?. *Rev Med Interne* **34**, 32–38.

## S

- Sadovskaya, I. *et al.* 2006. Carbohydrate-containing components of biofilms produced *in vitro* by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**, 75–82.
- Sakinc, T., Kulczak, P., Henne, K. & Gatermann, S. G. 2004. Cloning of an *agr* homologue of *Staphylococcus saprophyticus*. *FEMS Microbiol Lett* **237**, 157–161.
- Sakoulas, G. *et al.* 2002. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1492–1502.
- Sberro, H. *et al.* 2013. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol Cell* **50**, 136–148.
- Scarlato, V., Aricò, B., Prugnola, A. & Rappuoli, R. 1991. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* **10**, 3971–3975.
- Schneewind, O. & Missiakas, D. M. 2012. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**, 1123–1139.
- Schnitzler, N., Meilicke, R., Conrads, G., Frank, D. & Haase, G. 1998. *Staphylococcus lugdunensis*: report of a case of peritonitis and an easy-to-perform screening strategy. *J Clin Microbiol* **36**, 812–813.
- Schröder, I., Johnson, E. & de Vries, S. 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 427–447.
- Seifert, H., Oltmanns, D., Becker, K., Wisplinghoff, H. & von Eiff, C. 2005. *Staphylococcus lugdunensis* pacemaker-related infection. *Emerg Infect Dis* **11**, 1283–1286.
- Seng, P. *et al.* 2017. *Staphylococcus lugdunensis*: an underreported pathogen in osteomyelitis. *J Foot Ankle Surg* **56**, 412–413.
- Shah, N. B. *et al.* 2010. Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. *J Clin Microbiol* **48**, 1600–1603.
- Sharma-Kuinkel, B. K. *et al.* 2009. The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *J Bacteriol* **191**, 4767–4775.
- Shibuya, R. *et al.* 2020. Complete genome sequence of a methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* strain and characteristics of its staphylococcal cassette chromosome *mec*. *Sci Rep* **10**, 8682.
- Singh, R. & Ray, P. 2014. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiol* **9**, 669–681.
- Singh, V. K., Singh, K. & Baum, K. 2018. The role of methionine sulfoxide reductases in oxidative stress tolerance and virulence of *Staphylococcus aureus* and other bacteria. *Antioxidants* **7**, E128.
- Sivadon, V. *et al.* 2005. Use of genotypic identification by *sodA* sequencing in a prospective study to examine the distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluate their significance. *J Clin Microbiol* **43**, 2952–2954.
- Sompolinsky, D. *et al.* 1985. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol* **22**, 828–834.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J. & Geoghegan, J. A. 2014. Protein-based biofilm matrices in

- Staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 171.
- Stanley, S. A., Raghavan, S., Hwang, W. W. & Cox, J. S. 2003. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13001–13006.
- Stoakes, L. *et al.* 1994. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. *J Clin Microbiol* **32**, 1908–1910.
- Sun, Z. *et al.* 2020. Determining the genetic characteristics of resistance and virulence of the “Epidermidis Cluster Group” through pan-genome analysis. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 274.
- Sung, J. M. L., Chantler, P. D. & Lloyd, D. H. 2006. Accessory gene regulator locus of *Staphylococcus intermedius*. *Infect Immun* **74**, 2947–2956.
- Surewaard, B. G. J. *et al.* 2016. Identification and treatment of the *Staphylococcus aureus* reservoir *in vivo*. *J Exp Med* **213**, 1141–1151.
- Szabados, F. *et al.* 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.

## T

- Taha, L., Stegger, M. & Söderquist, B. 2019. *Staphylococcus lugdunensis*: antimicrobial susceptibility and optimal treatment options. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **38**, 1449–1455.
- Tan, T. Y., Ng, S. Y. & He, J. 2008. Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* **46**, 2393–2395.
- Tee, W. S. N., Soh, S. Y., Lin, R. & Loo, L. H. 2003. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the *mecA* gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. *J Clin Microbiol* **41**, 519–520.
- Tegmark, K., Morfeldt, E. & Arvidson, S. 1998. Regulation of *agr*-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAlII from coagulase-negative staphylococci. *J Bacteriol* **180**, 3181–3186.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E. & Horswill, A. R. 2011. Peptide signaling in the Staphylococci. *Chem Rev* **111**, 117–151.
- Ton-That, H., Marraffini, L. A. & Schneewind, O. 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 269–278.
- Tse, H. *et al.* 2010. Complete genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* strain HKU09-01. *J Bacteriol* **192**, 1471–1472.
- Tuomanen, E., Durack, D. T. & Tomasz, A. 1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 521–527.

## U, V

- Unnikrishnan, M., Constantinidou, C., Palmer, T. & Pallen, M. J. 2017. The enigmatic Esx proteins: looking beyond Mycobacteria. *Trends Microbiol* **25**, 192–204.
- Vacheethasanee, K. & Marchant, R. E. 2000. Surfactant polymers designed to suppress bacterial (*Staphylococcus epidermidis*) adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res* **50**, 302–312.
- van der Mee-Marquet, N. *et al.* 2003. *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. *J Clin Microbiol* **41**, 1404–1409.
- Van Wamel, W. J., van Rossum, G., Verhoef, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Fluit, A. C. 1998. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* **163**, 1–9.
- Vandenesch, F., Etienne, J., Reverdy, M. E. & Eykyn, S. J. 1993. Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. *Clin Infect Dis* **17**, 871–876.
- Vandenesch, F., Projan, S. J., Kreiswirth, B., Etienne, J. & Novick, R. P. 1993. *Agr*-related sequences in

- Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **111**, 115–122.
- Vandenesch, F. et al. 1991. Delta-like haemolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* **62**, 65–68.
- Vandenesch, F., Eykyn, S. J., Etienne, J. & Lemozy, J. 1995. Skin and post-surgical wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Infect* **1**, 73–74.
- Vasconcelos, N. G., Pereira, V. C., Araújo Júnior, J. P. & da Cunha, M. de L. R. S. 2011. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J Appl Microbiol* **111**, 749–762.
- Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M. J., de Jonge, B. L., Wilkinson, B. J. & Jayaswal, R. K. 1995. Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *J Bacteriol* **177**, 5116–5121.
- Visai, L. et al. 2009. Immune evasion by *Staphylococcus aureus* conferred by iron-regulated surface determinant protein IsdH. *Microbiology* **155**, 667–679.
- von Bodman, S. B., Majerczak, D. R. & Coplin, D. L. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7687–7692.
- von Eiff, C., Arciola, C. R., Montanaro, L., Becker, K. & Campoccia, D. 2006. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *Int J Artif Organs* **29**, 360–367.
- Vuong, C., Saenz, H. L., Götz, F. & Otto, M. 2000. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **182**, 1688–1693.
- Vuong, C. et al. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**, 54881–54886.
- Vuong, C., Kocanova, S., Yao, Y., Carmody, A. B. & Otto, M. 2004. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* *in vivo*. *J Infect Dis* **190**, 1498–1505.

## W

- Wakeman, C. A., Stauff, D. L., Zhang, Y. & Skaar, E. P. 2014. Differential activation of *Staphylococcus aureus* heme detoxification machinery by heme analogues. *J Bacteriol* **196**, 1335–1342.
- Wang, R. et al. 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* **13**, 1510–1514.
- Warne, B. et al. 2016. The Ess/Type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* shows unexpected genetic diversity. *BMC Genomics* **17**, 222.
- Wästfelt, M., Stålhammar-Carlemalm, M., Delisse, A. M., Cabezon, T. & Lindahl, G. 1996. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. *J Biol Chem* **271**, 18892–18897.
- Waters, C. M. & Bassler, B. L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319–346.
- Weidenmaier, C. et al. 2005. DltABCD- and MprF- mediated cell envelope modifications of *Staphylococcus aureus* confer resistance to platelet microbicidal proteins and contribute to virulence in a rabbit endocarditis model. *Infect Immun* **73**, 8033–8038.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487.
- Wright, J. S., Jin, R. & Novick, R. P. 2005. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1691–1696.

## X, Y

- Xue, L. *et al.* 2019. Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence therapy. *Infect Drug Resist* **12**, 2151–2160.
- Yarwood, J. M., McCormick, J. K. & Schlievert, P. M. 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**, 1113–1123.
- Yarwood, J. M. & Schlievert, P. M. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus infections*. *J Clin Invest* **112**, 1620–1625.
- Yeh, C.-F. *et al.* 2016. Clinical features, outcomes, and molecular characteristics of community- and health care-associated *Staphylococcus lugdunensis* infections. *J Clin Microbiol* **54**, 2051–2057.
- Yen, T.-Y. *et al.* 2016. Emergence of oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying staphylococcal cassette chromosome *mec* type V in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **49**, 885–891.
- You, Y. O., Kim, K. J., Min, B. M. & Chung, C. P. 1999. *Staphylococcus lugdunensis*-a potential pathogen in oral infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **88**, 297–302.
- Ythier, M. *et al.* 2010. Natural variability of *in vitro* adherence to fibrinogen and fibronectin does not correlate with *in vivo* infectivity of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **78**, 1711–1716.

**Z**

- Zaaroura, H., Geffen, Y., Bergman, R. & Avitan-Hersh, E. 2018. Clinical and microbiological properties of *Staphylococcus lugdunensis* skin infections. *J Dermatol* **45**, 994–999.
- Zapotoczna, M., Heilbronner, S., Speziale, P. & Foster, T. J. 2012. Iron-regulated surface determinant (Isd) proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Bacteriol* **194**, 6453–6467.
- Zhang, H. Z., Hackbarth, C. J., Chansky, K. M. & Chambers, H. F. 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science* **291**, 1962–1965.
- Zinkernagel, A. S. *et al.* 2008. Significance of *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: report of 28 cases and review of the literature. *Infection* **36**, 314–321.
- Zipperer, A. *et al.* 2016. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **535**, 511–516.



# **ANNEXES**

---



## Annexe 1 : Poster présenté à l'ECCMID en juillet 2021 sur le rôle du régulateur transcriptionnel AgrA de *S. lugdunensis* dans la réponse au stress oxydatif.

**31st ECCMID** Online 9 – 12 July 2021

**ESCMID** EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

**INTRODUCTION**

*Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase-negative staphylococci (CoNS), here described as a human skin commensal but that emerges as an opportunistic pathogen and can be the causative agent of serious infections similar to those generated by *Staphylococcus aureus* (Parthasarathy et al. 2020).

Based on knowledges about the virulence of *S. aureus*, it can be suspected that the transcriptional regulator AgrA (that play a major role in the regulation of virulence) could also be important for the pathogenicity of *S. lugdunensis*. The *agr* locus (*agrDCA*) of *S. lugdunensis* N920143 displays 63% identity with the one of *S. aureus* (Franck et al. 2008). The « -10 » and « -35 » elements of the 2 promoters of the *agr* operon are highly conserved, as well as motif involved in the potential activation of transcription (Vandevecht et al. 1993).

Thus, we constructed the *ΔagrA* deletion mutant (*ΔagrA*) and analyzed its phenotypes compared to the parental strain *S. lugdunensis* N920143 (WT).

**MATERIALS AND METHODS**

The *agrA* deletion mutant was constructed by homologous recombination using the pBAD vector. This *ΔagrA* mutant was compared to the WT in respect with biofilm formation, survival in mouse macrophages, pigmentations, and  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress response.

Global transcriptomic and proteomic studies were also performed.

**RESULTS**

**Figure 1** Biofilm formation by WT (grey) and *ΔagrA* mutant (black). Growth after 24h, 48h, and 72h. Each bar represents the standard deviation of three independent experiments.

**Figure 2** Time course of intracellular ROS (H2O2) in a biofilm formed by WT (grey) and *ΔagrA* mutant (black). The WT shows a significant increase in ROS production compared to the *ΔagrA* mutant. The *ΔagrA* mutant shows a significant decrease in ROS production compared to the WT.

**Figure 3** Representative survival curves of WT with 0.4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (grey) and *ΔagrA* mutant in the white (black) dark grey). A-C: Yellow colonies of WT strain after 24 hours of incubation on agar BCP. C: White colonies of the *ΔagrA* mutant after 24 hours of incubation on agar 15% BHI overnight at 30°C.

**CONCLUSION**

The deletion of the *agrA* gene in *S. lugdunensis* N920143 resulted in a decrease in biofilm formation, a decrease of virulence, a difference in pigmentation of bacterial colonies and a reduced resistance to oxidative stress.

In addition, this deletion affected the expression of 400 genes and 161 proteins. The deregulation of some genes such as transporters (*rvfA*/*rvfB*), *isdB* could participate in the observed phenotypes in the *ΔagrA* mutant. Among the deregulated genes, search for the motif recognized by the AgrA regulator made it possible to identify 48 potential direct targets of the AgrA regulator.

**Figure 4** *ΔagrA* appears as a pleiotropic transcriptional regulator involved in its opportunistic behavior.

**REFERENCES**

Frank JL, del Poco JL, Patel R (2008) From clinical epidemiology to genetic pathogenesis: how dengue virus and hepatitis C virus are two models. Clin Microbiol Rev 21(1):11-33.

Parthasarathy S, Shah S, Raja Sager A, Rangan A, Dangul S (2020) *Staphylococcus lugdunensis*: review of epidemiology, complications, and treatment. Clinics 12(6):6601.

Vandenesch F, Pujol SJ, Kerswini B, Etienne J, Novick RP (1993) Aggraffed sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. FEMS Microbiol Letters, 111(1):15-22.



**Annexe 2 : Résumé de la communication orale présentée au congrès de la SFM en septembre 2021 portant sur le rôle du régulateur transcriptionnel AgrA de *S. lugdunensis* dans la réponse au stress oxydatif.**

**The role of the transcriptional regulator AgrA of *Staphylococcus lugdunensis* in the oxidative stress response**

Marion Aubourg<sup>1</sup>, Anne Dhalluin<sup>1</sup>, François Gravey<sup>2</sup>, Cecilia Martini<sup>3</sup>, Maurizzio Sanginetti<sup>3</sup>, Michel Auzou<sup>2</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Caen Normandie, EA4655 U2RM (équipe «Antibio-résistance»), 14033 Caen, France

<sup>2</sup> Université de Caen Normandie, GRAM 2.0, CHU de Caen, Service de Microbiologie, 14033 Caen, France

<sup>3</sup> Catholic University of Sacred Heart, Institute of Microbiology, L. go F. Vito 1, 00168 Rome, Italy

**Background and objectives**

*Staphylococcus lugdunensis* (SLU) is a coagulase-negative staphylococci that emerges as an opportunistic pathogen and can be the causative agent of infections similar to those generated by *Staphylococcus aureus* (SA). Based on the knowledge about the virulence of SA, it can be suspected that the transcriptional regulator AgrA could also play a role in the ability to cope with stresses. The *agr* locus of SLU N920143 displays 63% identity with the one of SA and is also transcribed in the opposite direction of RNAIII, another regulator of virulence genes. Thus, we constructed the *agrA* mutant ( $\Delta agrA$ ) and analyzed its phenotypes compared to the parental strain (WT).

**Materials and methods**

The *agrA* deletion mutant was constructed by homologous recombination using the pMAD vector. This  $\Delta agrA$  mutant was compared to the WT in respect with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress response, pigmentation, and survival in mouse macrophages. Transcriptomic study by RT-qPCR was also performed.

**Results, discussion and conclusion**

Compared to WT, the  $\Delta agrA$  mutant was affected in its ability to counteract oxidative stress that encountered during the infectious process. The growth of  $\Delta agrA$  was significantly delayed by the addition of 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to the WT. Moreover, survival of  $\Delta agrA$  after 2 h with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was more than 10 fold reduced. Interestingly, the  $\Delta agrA$  mutant colonies were white while they were slightly yellow for the WT colonies. SLU has two enzymes (CrtMN) of the pathway for the synthesis of 4,4'-Diaponeurosporene (yellow pigment) capable of absorbing excess energy from reactive oxygen species. In addition, the  $\Delta agrA$  mutant was less able to survive into mouse macrophages. Our transcriptomic results were well correlated with the phenotypes since we showed repression of *crtMN* genes, as well as of *katA* encoding the catalase. As expected, the RNAIII gene was also found to be repressed in the  $\Delta agrA$  mutant. However, RNAIII did not appear involved in the observed phenotype since the corresponding mutant behaved like the WT.

Our results demonstrated that, in SLU, AgrA (and not RNAIII) was an important transcriptional regulator involved in the oxidative stress response, which is in line with its pathogenicity.



### Annexe 3 : Poster présenté à l'ECCMID en juillet 2021 concernant l'identification du stimulon de la limitation en fer chez *S. lugdunensis*.

## Identification of the iron-limitation stimulon in *Staphylococcus lugdunensis*

Marion Aubourg<sup>1</sup>, François Gravé<sup>2</sup>, Anne Dhalluin<sup>1</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> EA4655 U2RNM, CHU de Caen, Université de Caen Normandie, France.

<sup>2</sup> GRAM 2.0, CHU de Caen, Université de Caen Normandie, France.

### RESULTS

**INTRODUCTION**

Described for the first time in 1988, *Staphylococcus lugdunensis* is a coagulase negative staphylococci (CoNS) that is part of the normal human skin flora but recognized as an emerging opportunistic pathogen that can cause serious infections similar to those generated by *Staphylococcus aureus* (Parthasarathy *et al.* 2020). Iron limitation is a crucial stress during infectious process and it was shown that the CoNS, *S. lugdunensis*, *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus caprae* encoded the Isg system for iron capture and metabolism close to that of *S. aureus* (Sun *et al.* 2020). Moreover, a recent study identified an iron-regulated Energy-Coupling Factor (ECF) type transporter in *S. lugdunensis*, Lha which is specific for heme, and which functions independently of the canonical heme acquisition Isg system (Jochim *et al.* 2020).

In order to understand how *S. lugdunensis* copes with the 'nutritional immunity', a strategy setting up by the host to restrict access to essential ions and to prevent infection we performed the first global transcriptomic analysis of *S. lugdunensis*.

**MATERIALS AND METHODS**

RNAs were extracted from cells of *S. lugdunensis* NS20143 cultivated in Brain Heart Infusion (BHI), with and without 350 µM of iron chelator (2,2'-dipyridyl) or DIP harvested at late-exponential phase ( $OD_{600}$  of 1). For each condition, RNA-Seq analyses have been carried out using four independent RNA samples. Reads were mapped against the *S. lugdunensis* reference genome and differential expression analyses (growth in BHI with DIP versus BHI without DIP) were performed.

### CONCLUSION

These data provide a global overview of transcriptomic regulation which took place in response to iron-limitation corresponding to a stress encountered during infectious process.

Interestingly, the new ECF operon probably involved in iron metabolism and uptake discovered in *S. lugdunensis* is also present in *S. aureus*. However, *S. lugdunensis* is the only staphylococci to possess the *lha* operon required for heme acquisition independently of the Isg system. These results bring some answers about the ability of *S. lugdunensis* to trigger several pathways to cope with stresses that may in part explain the opportunistic behavior of this pathogen.

### REFERENCES

Aubourg M, Dhalluin A, Gravé F, Pottier M, Thivry M, Berry B, Jochim A, Giard JC, Dhalluin C, Gravé M, Giard K (2020) Iron-poor environments: the response to iron limitation in *Staphylococcus lugdunensis*. *BMC Microbiol* 20:328.

Aubourg M, Gravé F, Dhalluin A, Giard JC (2021) Identification of the *lha* operon in *Staphylococcus lugdunensis* as a key regulator of heme acquisition. *Arch Microbiol* 203:100075020210291252. <https://doi.org/10.1007/s00434-021-02912-2>. *Epub ahead of print* PMID: 33983488.

Jochim A, Adil L, Belkova D *et al.* (2020) An ECF-type transporter, S. lugdunensis hemin-iron transporter, in *Staphylococcus lugdunensis* to overcome iron-limitation. *Int J Antimicrob Agents* 55:357-362.

Parthasarathy S, Shah S, Raja Sager A, Rangan A, Dunugui S (2020) *Staphylococcus lugdunensis*: review of epidemiology, complications, and treatment. *Cureus* 12:e6801.

Sun Z, Zhou D, Zhang X *et al.* (2020) Determining the genetic characters of resistance and virulence of the 'Epidemic Cluster Group' through pan-genome analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 10:274.

**FIGURE 1** Volcano plot of genes differentially expressed under iron limitation condition (BHI with 350 µM DIP) compared to growth in BHI.

**FIGURE 2** Schematic representation of functional classification of genes upregulated (blue) and downregulated (red) in *S. lugdunensis* NS20143.

**FIGURE 3** Schematic diagram of the *lha* operon (SLUG\_19150 to SLUG\_192143) in blue of *S. lugdunensis*. The arrows (size and percentage of homology of genes coding the ECF-type transporters) and Fur-boxes were indicated.

**FIGURE 1** Summary of the presence or absence of *lha* operon, ECF operon and *ser* operon in *S. lugdunensis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. caprae* and *S. epidermidis* by search for genes in using Standard Protein BLAST.

	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>lha</i> operon	+	+	+	+	+
ECF operon	+	+	+	+	+
<i>ser</i> operon	+	-	-	-	-
<i>lslC</i>	+	+	+	+	+
<i>lslF</i>	+	+	+	+	+
<i>lslG</i>	+	+	+	+	+

**FIGURE 3** This last has been found into a 13-genes putative operon and also highly overexpressed under iron limitation condition with perfect palindromic Fur-box motif in the putative promoter region.

Among the 5 staphylococci, *S. lugdunensis* is the only one to have the *lha* ECF and *lsl* operons, and even appears better equipped than *S. aureus* to recover iron (Table 1).



# RÉSUMÉ



## RÉSUMÉ

Mon projet de thèse portant sur l'étude des facteurs d'opportunisme chez *Staphylococcus lugdunensis* avait pour but de mieux comprendre comment cette bactérie commensale peut être responsable d'infections graves. La première partie de nos travaux a consisté en la construction chez *S. lugdunensis* de mutants  $\Delta agrA$  et  $\Delta ARNIII$ , codant des régulateurs potentiellement impliqués dans la virulence, afin de les caractériser phénotypiquement et d'identifier les membres des régulons par des analyses transcriptomique et protéomique globales. Nos résultats ont mis en évidence que AgrA est le régulateur majeur du système Agr chez *S. lugdunensis* et qu'il contrôle l'expression de gènes lui permettant d'être plus virulent, de s'adapter aux stress environnementaux (notamment les stress osmotique et oxydatif), d'induire la formation de biofilm ainsi que la synthèse des pigments caroténoïdes. La seconde partie de nos travaux a consisté à évaluer l'impact de la limitation en fer, qui représente un stress rencontré par les bactéries pendant l'infection, sur l'expression de la pathogénicité de *S. lugdunensis*. Des approches phénotypique, transcriptomique et protéomique ont été entreprises et la méthode d'évaluation de la pathogénicité de *S. lugdunensis* en modèle d'infection de larves de *Galleria mellonella* a été mise au point. Nos données ont révélé que la carence en fer chez *S. lugdunensis* est un stress qui favorise sa capacité à former du biofilm tandis qu'il diminue sa résistance au stress oxydatif ainsi que sa virulence. De plus, en réponse à la condition de limitation en fer, *S. lugdunensis* est capable de mettre en place plusieurs mécanismes d'acquisition du fer, ce qui lui apporte vraisemblablement un avantage lors de l'infection et peut expliquer en partie le caractère opportuniste de ce pathogène.

Mots clés : *Staphylococcus lugdunensis*, système Agr, régulateur transcriptionnel AgrA, régulateur AR- $III$ , virulence, limitation en fer, biofilm, stress oxydatif.

## ABSTRACT

My PhD project on the study of opportunistic factors in *Staphylococcus lugdunensis* aimed to better understand how this commensal bacterium can be responsible for serious infections. The first part of our work was the construction of the  $\Delta agrA$  and  $\Delta RNAIII$  mutants of *S. lugdunensis*, encoding regulators potentially involved in virulence, to phenotypically characterize them and to identify the members of the regulons by global transcriptomic and proteomic analyzes. Our results have shown that AgrA is the major regulator of the Agr system in *S. lugdunensis* and that it controls the expression of genes allowing it to be more virulent, to adapt to environmental stresses (especially osmotic and oxidative stresses), to induce the formation of biofilm as well as the synthesis of carotenoid pigments. The second part of our work consisted in evaluating the impact of iron limitation, which represents a stress encountered by bacteria during infection, on the expression of the pathogenicity of *S. lugdunensis*. Phenotypic, transcriptomic and proteomic approaches were undertaken and the method for evaluating the pathogenicity of *S. lugdunensis* in a model of infection of *Galleria mellonella* larvae was developed. Our data revealed that iron deficiency in *S. lugdunensis* is a stress that promotes its ability to form biofilm while decreasing its resistance to oxidative stress as well as its virulence. Moreover, in response to this condition, *S. lugdunensis* is able to set up several mechanisms of iron acquisition, which probably provides it an advantage during infection and may partly explain the opportunistic behavior of this pathogen.

Key words: *Staphylococcus lugdunensis*, Agr system, AgrA transcriptional regulator, RNAIII regulator, virulence, iron limitation, biofilm, oxidative stress.

## RÉSUMÉ

Mon projet de thèse portant sur l'étude des facteurs d'opportunisme chez *Staphylococcus lugdunensis* avait pour but de mieux comprendre comment cette bactérie commensale peut être responsable d'infections graves. La première partie de nos travaux a consisté en la construction chez *S. lugdunensis* de mutants  $\Delta agrA$  et  $\Delta RNAIII$ , codant des régulateurs potentiellement impliqués dans la virulence, afin de les caractériser phénotypiquement et d'identifier les membres des régulons par des analyses transcriptomique et protéomique globales. Nos résultats ont mis en évidence que AgrA est le régulateur majeur du système Agr chez *S. lugdunensis* et qu'il contrôle l'expression de gènes lui permettant d'être plus virulent, de s'adapter aux stress environnementaux (notamment les stress osmotique et oxydatif), d'induire la formation de biofilm ainsi que la synthèse des pigments caroténoïdes. La seconde partie de nos travaux a consisté à évaluer l'impact de la limitation en fer, qui représente un stress rencontré par les bactéries pendant l'infection, sur l'expression de la pathogénicité de *S. lugdunensis*. Des approches phénotypique, transcriptomique et protéomique ont été entreprises et la méthode d'évaluation de la pathogénicité de *S. lugdunensis* en modèle d'infection de larves de *Galleria mellonella* a été mise au point. Nos données ont révélé que la carence en fer chez *S. lugdunensis* est un stress qui favorise sa capacité à former du biofilm tandis qu'il diminue sa résistance au stress oxydatif ainsi que sa virulence. De plus, en réponse à la condition de limitation en fer, *S. lugdunensis* est capable de mettre en place plusieurs mécanismes d'acquisition du fer, ce qui lui apporte vraisemblablement un avantage lors de l'infection et peut expliquer en partie le caractère opportuniste de ce pathogène.

Mots clés : *Staphylococcus lugdunensis*, système Agr, régulateur transcriptionnel AgrA, régulateur AR- $RNAIII$ , virulence, limitation en fer, biofilm, stress oxydatif.

## ABSTRACT

My PhD project on the study of opportunistic factors in *Staphylococcus lugdunensis* aimed to better understand how this commensal bacterium can be responsible for serious infections. The first part of our work was the construction of the  $\Delta agrA$  and  $\Delta RNAIII$  mutants of *S. lugdunensis*, encoding regulators potentially involved in virulence, to phenotypically characterize them and to identify the members of the regulons by global transcriptomic and proteomic analyzes. Our results have shown that AgrA is the major regulator of the Agr system in *S. lugdunensis* and that it controls the expression of genes allowing it to be more virulent, to adapt to environmental stresses (especially osmotic and oxidative stresses), to induce the formation of biofilm as well as the synthesis of carotenoid pigments. The second part of our work consisted in evaluating the impact of iron limitation, which represents a stress encountered by bacteria during infection, on the expression of the pathogenicity of *S. lugdunensis*. Phenotypic, transcriptomic and proteomic approaches were undertaken and the method for evaluating the pathogenicity of *S. lugdunensis* in a model of infection of *Galleria mellonella* larvae was developed. Our data revealed that iron deficiency in *S. lugdunensis* is a stress that promotes its ability to form biofilm while decreasing its resistance to oxidative stress as well as its virulence. Moreover, in response to this condition, *S. lugdunensis* is able to set up several mechanisms of iron acquisition, which probably provides it an advantage during infection and may partly explain the opportunistic behavior of this pathogen.

Key words: *Staphylococcus lugdunensis*, Agr system, AgrA transcriptional regulator, RNAIII regulator, virulence, iron limitation, biofilm, oxidative stress.