



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : Université Paul Sabatier Toulouse III
Discipline ou spécialité : Immunologie et Maladies infectieuses

Présentée et soutenue par Solène ACCARIAS
Le : 16 Décembre 2014

Titre : Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*.

JURY

M. Thomas HENRY	Chargé de Recherche, INSERM, Lyon	Rapporteur
M. Pierre GERMON	Chargé de Recherche, INRA, Tours	Rapporteur
Mme Bettina COUDERC	Professeur des Universités C1, CLCC, Toulouse	Présidente du Jury
Mme Séverine BOULLIER	Maître de conférences, ENVT, Toulouse	Membre du Jury
M. Bernard PIPY	Directeur de Recherche émérite, IRD, Toulouse	Membre du Jury
M. Tarek MSADEK	Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Membre du Jury

Ecole doctorale : SEVAB, Sciences Economiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries

Unité de recherche : ENVT-INRA UMR1225 IHAP

Directeur de Thèse : Séverine BOULLIER et Guillaume TABOURET

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse à l'éclairage de leur expertise. Je suis honorée et profondément reconnaissante de leur siège dans mon jury de thèse.

Je remercie Gilles Foucras pour m'avoir accueillie dans son équipe. Ses conseils et critiques m'ont souvent éclairée dans mon travail, apportant une vision nouvelle riche de remarques pertinentes. Je lui suis extrêmement reconnaissante de l'implication dont il a fait preuve durant ma thèse et de l'aide précieuse qu'il a fournie pour mes articles.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Séverine Boullier, pour m'avoir permis de réaliser une thèse très enrichissante. Elle m'a appris les bases de la recherche en laboratoire dès mon stage de M2R, et s'est démenée pour que je puisse poursuivre mes recherches dans un travail de thèse. Je la remercie sincèrement pour sa grande pédagogie et la patience dont elle fait preuve avec mes questions incessantes. Je lui suis très reconnaissante de l'aide et des conseils qu'elle m'a apportés pendant l'ensemble du travail de ma thèse, autant du point de vue de ses idées pour les expériences à mener que de son investissement pour mes articles et mon mémoire.

Je tiens particulièrement à remercier Guillaume Tabouret, co-directeur de thèse et bien plus. Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans sa présence, ses conseils, ses critiques, son expérience, sa perspicacité, sa personnalité, son dévouement, sa disponibilité, ses efforts, son soutien, sa patience et son écoute. Nous avons travaillé comme un duo de « choc » pendant ces 3 années, et je ne saurais comment le remercier suffisamment pour tout ce qu'il m'a apporté. Les grandes discussions et débats que j'ai pu avoir avec lui ont été d'un enrichissement incroyable pour le développement de ma réflexion. Il a été pour moi un confident à qui j'ai pu raconter le moindre de mes doutes et de mes peurs, mais également à qui j'ai pu faire part de toutes mes pensées, tout simplement. Il m'a soutenu, m'a remonté le moral et m'a permis de voir les choses différemment dans les moments les plus difficiles. Il a toujours été d'une patience remarquable, voire même extraordinaire, avec mes multiples questions, interrogations et réflexions. Il a été pour moi une encyclopédie humaine dans toute sa splendeur. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordée et l'autonomie qu'il m'a inculquée. Le travail avec lui fût un réel plaisir, toujours dans la joie et la bonne

humeur. Je suis extrêmement heureuse et honorée d'avoir réalisé cette thèse avec lui, et j'espère pouvoir trouver une complicité semblable avec mes futurs collaborateurs. Je lui témoigne tout mon respect, ma gratitude, mon estime et mon amitié.

Je remercie Hélène Daniels pour ses connaissances aigues en microbiologie et pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée dans ce domaine. Je lui suis très reconnaissante pour tout le travail qu'elle a accompli avec dévouement. Son implication dans ma thèse me touche sincèrement.

Je remercie chaleureusement les techniciens Christian Tasca et Cécile Caubet pour l'attention qu'ils m'ont portée et l'aide qu'ils m'ont fournie. Ils ont toujours été d'une extrême gentillesse et m'ont systématiquement prêté main forte quand j'en avais besoin. J'ai réellement apprécié travailler en leur compagnie, mes « voisins de paillasses », et je garde en mémoire toutes les « bêtises » qu'on a pu raconter. Merci aussi pour leur patience à l'égard de mes chants.

Je n'oublie pas également ceux qui ont partagé une bonne partie de cette thèse dans mon équipe et toute l'équipe de Virologie. Je les remercie pour tous ces bons moments passés lors des repas et autour d'un café, pour leurs encouragements, leurs soutiens, leurs chaleurs et leurs sympathies.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et mes beaux-parents qui m'ont tant apporté par leur vision de la vie, à mon sens, exemplaire. Ils ont toujours été présents pour moi et m'ont constamment soutenue. Je remercie mes sœurs pour leur accompagnement chaleureux et sans qui je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui. Je remercie également mes amis qui m'ont épaulé tout au long de ce travail.

Sommaire

Tables des abréviations	7
Tables des illustrations	10
PARTIE 1 : Revue Bibliographique	13
A- <i>Staphylococcus aureus</i>	15
I- Classification.....	17
1- Historique.....	17
2- La famille <i>Staphylococcaceae</i>	17
2-1- Le genre <i>Staphylococcus</i>	17
2-2- L'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	18
II- Caractéristiques structurales et physiologiques.....	19
1- Morphologie et structure.....	19
2- Biochimie.....	21
3- Croissance.....	21
4- Génomique.....	22
5- Facteurs de virulence.....	23
5-1- Les constituants de l'enveloppe.....	24
5-2- Les composants de surface.....	25
5-3- Les composants sécrétés.....	26
5-3-1- Les exoenzymes et protéines.....	26
5-3-2- Les toxines.....	29
5-4- Les facteurs de persistance.....	31
5-5- Régulation des facteurs de virulence.....	33
5-6- Facteurs de virulence et spécificité d'hôte.....	34
III- Epidémiologie.....	36
1- Réservoir.....	36
2- Transmission.....	38
IV- Les infections à <i>S. aureus</i>	38
1- Chez l'Homme.....	38
1-1- Types d'infections.....	38
1-2- Acquisition de l'infection.....	39
1-2-1- Infections communautaires.....	39
1-2-2- Infections nosocomiales.....	39
1-2-3- Importance en santé publique.....	40
2- Chez les animaux.....	41
3- Clinique.....	42
3-1- Symptômes.....	42
3-2- Traitements disponibles et résistances aux antibiotiques.....	44
V- Contribution de la réponse immunitaire innée dans l'issue de l'infection.....	46
B- L'immunité innée	49
I- Les barrières épithéliales.....	52
II- Le système du complément.....	53
III- Le macrophage.....	53
1- La Biologie du macrophage.....	54
1-1- Distribution tissulaire : Des monocytes aux macrophages.....	54
1-2- Rôle dans l'homéostasie.....	56

2- Détection des pathogènes.....	58
3- Mécanismes de défense.....	61
3-1- La phagocytose.....	61
3-1-1- Voies d'activation.....	61
3-1-2- Activation des mécanismes indépendants de la production des radicaux libres	61
3-1-3- Le burst oxydatif.....	62
3-2- La réponse inflammatoire.....	63
3-2-1- Caractéristiques physiologiques de l'inflammation.....	63
3-2-2- Les différents phénotypes d'activation du macrophage.....	64
3-2-3- Synthèse des cytokines et des chimiokines	65
IV- Le recrutement leucocytaire.....	67
1- Les neutrophiles.....	68
2- Les monocytes.....	69
V- La régulation de l'inflammation.....	70
C- Spécificité d'interaction entre <i>S. aureus</i> et immunité innée.....	73
I- Rôle de l'immunité innée.....	75
II- Les macrophages et <i>S. aureus</i>	76
1- La reconnaissance de <i>S. aureus</i> par les macrophages.....	76
1-1- La reconnaissance des ligands.....	76
1-2- Les voies de signalisation.....	78
1-3- Eléments essentiels à la reconnaissance.....	79
2- La phagocytose.....	80
3- La réponse inflammatoire.....	81
III- Le recrutement leucocytaire.....	83
1- Les neutrophiles.....	83
2- Les monocytes.....	84
3- Coopération entre les neutrophiles et les macrophages.....	85
IV- Le détournement de l'immunité innée par <i>S. aureus</i>	86
1- L'inhibition du système du complément.....	86
2- L'induction de la mort des cellules.....	87
3- L'inhibition du recrutement leucocytaire.....	90
4- Echappement à l'élimination par les phagocytes et survie intracellulaire...90	
D- Problématique.....	95
PARTIE 2 : Travaux de recherche.....	101
A- Article 1 : Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory response against <i>Staphylococcus aureus</i> in resistant and susceptible mice.....	103
1- Présentation du travail.....	105
2- Résultats complémentaires.....	121
B- Article 2 : Single cell phenotyping reveals specific gene signatures in macrophages subsets of mouse peritoneal cavity at homeostasis.....	129
1- Présentation du travail	131
Discussion et perspectives.....	153
Références.....	175

Tables des abréviations

7-AAD :	7-Aminoactinomycin D
AAM :	Alternatively-activated macrophage
ADAM10 :	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
Agr :	Accessory gene regulator
AMP :	Antimicrobial peptides
AP-1 :	Activator protein 1
ASC :	Apoptosis-associated speck protein with a caspase activation and recruitment domain
ATP :	Adénosine tri-phosphate
Bcl2 :	B-cell lymphoma 2
BHI :	Brain heart infusion
BMDM :	Bone marrow derived macrophage
CAM :	Classically-activated macrophage
CA-MRSA :	MRSA dans la communauté
CCL :	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR :	Chemokine (C-C motif) receptor
CD :	Cluster de différenciation
CFU :	Colony Forming Unit
CGD :	Chronic granulomatous disease
Chi313 :	Chitinase 3-like 3
CHIPS :	Chemotaxis inhibitory protein of <i>S. aureus</i>
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CR1 :	Complement receptor type 1
CXCL :	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR :	Chemokine (C-X-C motif) receptor
DAMPs :	Damage-associated molecular pattern molecules
DC :	Dendritic cell
DO :	Densité optique
DPBS :	Dubelcco's phosphate buffered saline
EDTA :	Ethylène diamine tétra acétique
Efb :	Extracellular fibrinogen binding protein
EtBr :	Ethidium bromide
FCS :	Fetal calf Serum
FcR :	Receptor Fc
Fizz1 :	Found in inflammatory zone protein 1
fMLP :	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FnBP :	Fibronectin binding protein
FPR :	Formylated peptide receptor
G-CSF :	Granulocyte-colony stimulating factor
Hla :	α -hémolysine
hMDM :	Human monocyte-derived macrophage
HPRT1 :	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HBP :	Human beta defensin
HSP :	Heat shock protein
IAH :	Infection acquise à l'hôpital
IAC :	Infection acquise en communauté

IFN :	Interféron
IL :	Interleukine
iNOS:	Inducible nitric oxide synthase
i.p. :	Intra-péritonéale
IRAK :	IL-1 receptor-associated kinase
IRF :	IFN regulatory factor
i.v. :	Intra-veineux
KLF4 :	Kruppel like factor 4
LDH :	Lactate déshydrogénase
LDL :	Low-density lipoproteins
LPM :	Large peritoneal macrophage
LPS :	Lipopolysaccharide
LTA :	Acide lipoteichoïque
Luk :	Leukotoxin
MAPK :	Mitogen-activated protein kinases
Mcl1 :	Myeloid cell leukemia 1
MCP-1 :	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF :	Macrophage-colony stimulating factor
MBD :	Murine beta-defensin
MDP :	Muramyl dipeptide
MFthio :	Macrophage induit par le thioglycolate
MIP :	Macrophage inflammatory protein
MOI :	Multiplicity of infection
MRC1 :	Mannose receptor, C type 1
MSCRAMM :	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
Myd88 :	Myeloid differentiation primary response 88
NaCl :	Chlorure de sodium
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NALP3 :	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NF-κB :	Nuclear factor-κB
NLR :	NOD like receptor
NLRP3:	NOD, leucine rich repeat and pyrin domain containing
NOD :	Nucleotide oligomerization domain
PAMPs :	Pathogen associated molecular patterns
PerMF :	Macrophage péritonéal
PFT :	Pore-forming toxin
PGN :	Peptidoglycane
PGRP-L :	Peptidoglycan recognition protein L
PI3K :	Phosphatidyl inositol-3-kinase
PKC :	Protéine kinase C
PLP :	Protéine liant la pénicilline
PMN :	Polymorphonuclear neutrophil
PPARγ :	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRR :	Pattern recognition receptors NLR : Nod like receptor
PS :	Phosphatidylserine
PSM :	Phenol-soluble modulin
PVL :	Panton-Valentine leukocidin
RANTES :	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RIPK2 :	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
RPL9 :	Ribosomal protein L9

RPMI :	Roswell park memorial institute medium
RTQPCR :	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAK :	Staphylokinase
SARM :	<i>S. aureus</i> résistant à la méthiciline
SARV :	<i>S. aureus</i> résistant à la vancomycine
s.c. :	Sous-cutané
SCC :	Staphylococcal cassette chromosome
SCIN :	Staphylococcal complement inhibitor
SCN :	Staphylocoques à coagulase négative
SCP :	Staphylocoque à coagulase positive
SDHA :	Succinate déhydrogenase subunit A
SIGNR3 :	Specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin homolog-related 3
SOCS :	Suppressor of cytokine signaling
SPM :	Small peritoneal macrophage
SR :	Receptor scavenger
STAT :	Signal transducer and activator of transcription
SYK :	Spleen tyrosine kinase
TGFβ :	Transforming growth factor
TICAM2 :	TIR domain-containing adapter molecule 2
TIR :	Toll/interleukin-1 receptor
TLR :	Toll like receptor
TNFα :	Tumor necrosis factor α
TRAF :	TNF receptor associated protein
TSB :	Tryptic soy broth
TSST-1 :	Toxic shock syndrome toxin-1
VISA :	<i>S. aureus</i> avec une sensibilité intermédiaire à la vancomycine

Tables des illustrations

Figure 1 : Tableau récapitulatif des tests utilisés en première intention pour l'identification des espèces.

Figure 2 : Micrographie électronique à balayage colorisée de *S. aureus* résistant à la méticilline sur la surface d'un pansement de plaie.

Figure 3 : Structure de la paroi de *S. aureus*.

Figure 4 : Transfert horizontal de gènes entre les bactéries.

Figure 5 : Facteurs de virulence de *S. aureus*.

Figure 6 : Implication des facteurs de virulence de *S. aureus* dans l'évasion des défenses de l'hôte.

Figure 7 : Expression des facteurs de virulence et de persistance selon la croissance bactérienne et l'expression consécutive d'*agr*.

Figure 8 : Données du microarray de 217 isolats de *S. aureus* (161 isolats humains porteurs et invasifs et 56 isolats animaux), classées par une corrélation de Spearman en utilisant 728 gènes variables de base.

Figure 9 : Les gènes variables de base de la figure 8.

Figure 10 : Prévalence du portage nasal de *S. aureus* et de MRSA dans des individus sains dans neuf pays européens.

Figure 11 : Portage nasal selon les individus dans des foyers du nord de Manhattan.

Figure 12 : Dispositifs médicaux susceptibles d'induire une contamination par *S.aureus*.

Figure 13 : Prévalence mondiale des SARM acquises en établissement de soins.

Figure 14: Pathogénèse des infections staphylococciques.

Figure 15 : Chronologie de l'apparition des résistances de *S. aureus* aux antibiotiques.

Figure 16 : Le système des phagocytes mononucléés.

Figure 17 : Différentes nominations des macrophages selon la distribution tissulaire.

Figure 18 : Diversité et fonctions des macrophages.

Figure 19 : Les PRRs et leurs ligands.

Figure 20 : La phagocytose : Maturation du phagosome et présentation antigénique.

Figure 21 : Facteurs microbicides de l'hôte.

Figure 22 : Spectre d'activation et de polarisation des macrophages.

Figure 23 : Bilan de la réponse inflammatoire.

Figure 24 : La cascade d'adhésion des leucocytes.

Figure 25 : Présentation schématique des mécanismes dépendants et indépendants de

l'oxygène lors de la phagocytose des bactéries par les neutrophiles.

Figure 26 : Activation et transition du macrophage inflammatoire en macrophage résolutif au cours de la phase aiguë de l'inflammation.

Figure 27 : Méthodes de reconnaissance de *S. aureus* par les macrophages.

Figure 28 : Interaction des composants staphylococciques avec les récepteurs des cellules immunitaires permettant d'induire une réponse immunitaire.

Figure 29 : Les voies d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Figure 30 : Les mécanismes de la pyroptose.

Figure 31 : Mécanismes par lesquels l'interaction entre *S. aureus* et les leucocytes peut modifier l'issue de l'infection.

Figure 32 : Schéma bilan des mécanismes possibles de résolution ou de développement de l'infection par *S. aureus*.

PARTIE I :
Revue bibliographique

A- Staphylococcus aureus

I- Classification

1- Historique

Staphylococcus aureus fut découverte dans les années 1870 lors de l'étude microscopique d'échantillons de pus [1]. Ces bactéries de forme sphérique furent initialement nommées « *micrococci* », du grec *kokkos* pour grain. En 1880, Alexander Ogston, chirurgien écossais disciple de Lister, fut le premier à identifier formellement les *micrococci* comme la cause des abcès suppurés. La poursuite de ses travaux aboutit, en 1882, à la description des staphylocoques (du grec « staphyle » pour grappe de raisin), par opposition aux streptocoques (coques en chaîne) précédemment décrits par Billroth en 1874. En 1884, Anton J. Rosenbach, chirurgien allemand, isola deux souches différentes de staphylocoques qu'il baptisa en fonction de la couleur des colonies obtenues : *S. aureus* (dorées) et *S. albus* (blanches).

Initialement, les staphylocoques furent classés au sein du genre *Micrococcus*. Dans les années 1900, les premières classifications bactériennes officielles distinguèrent les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* tout en les regroupant au sein de la famille des *Micrococcaceae* [2]. Plus récemment, les données de phylogénie moléculaire associées à des analyses chimiques de ces deux genres ont conduit à la création de la famille des *Staphylococcaceae* à laquelle appartient *S. aureus* [3–5].

2- La famille des *Staphylococcaceae*

La famille des *Staphylococcaceae* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Elle comprend 5 genres : *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Salinicoccus* et *Staphylococcus* [5]. Les quatre premiers ne contiennent pas plus de deux espèces alors que le genre *Staphylococcus* en contient plus d'une quarantaine.

2-1- Le genre *Staphylococcus*

Tout d'abord basée sur l'aspect macroscopique, notamment la morphologie et la pigmentation des colonies, l'analyse des différentes espèces constituant le genre *Staphylococcus* a progressé lors de l'introduction de nouveaux critères de différenciation tels que la capacité de fermentation des sucres, la mobilité, la présence d'une activité catalase ou

la production de toxines. Ces critères sont aujourd’hui couramment utilisés à des fins diagnostiques (Figure 1).

Species	Coagulase	D-Xylose	Sucrose	D-Trehalose	Maltose	Manitol	Anaerobic growth thioglycolate	Hemolysis
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> ^a	+	-	+, -	-	-	+, -	+	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> ^b	-	-	-	+, -	-	-	+	+
<i>S. epidermidis</i> ^a	-	-	+	-	+	-	+	+, -
<i>S. haemolyticus</i> ^b	-	-	+	+	+	+, -	+	+
<i>S. saprophyticus</i> ^b	-	-	+	+	+	+, -	+	-
<i>S. warneri</i> ^b	-	-	+	+	+	+, -	+	+, -
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> ^a	-	-	+	+, -	+	-	-	-
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> ^b	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. simulans</i> ^a	-	-	+	+, -	±	+	+	+, -
<i>S. lugdunensis</i> ^b	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> ^a	-	-	+	-	-	+	+	+, -
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> ^a	-	-	+	-	+	+	+	+, -
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ^b	-	-	-	+	+, -	+, -	+	+, -
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i> ^b	-	-	-	+	+	+	+	+, -
<i>S. xyloso</i> ^a	-	+, ±	+	+	+	+	+, -	-
<i>S. caprae</i> ^b	-	-	-	+	+, -	+, -	+	+, -

+: positive reaction; -: negative reaction; +,-: positive or negative; a: species identified in a single step; b: species identified in two steps.

Figure 1 : Tableau récapitulatif des tests utilisés en première intention pour l’identification des espèces de *Staphylococcus* chez l’Homme [6]. Evaluation de la production de coagulase, de la fermentation du xylose, du sucrose, du tréhalose, du maltose et du mannitol, de la croissance anaérobie dans du thioglycolate et de la production d’hémolysines.

La présence d’une coagulase a notamment permis de séparer le genre *Staphylococcus* en deux groupes: les staphylocoques à coagulase positive (SCP) et les staphylocoques à coagulase négative (SCN). En raison de la capacité de la coagulase à générer des caillots dans le plasma, les SCP présentent généralement un pouvoir pathogène plus élevé, mais certaines études montrent que l’implication des SCN dans les infections augmente [7,8].

Parmi les *Staphylococcus*, les espèces les plus fréquemment isolées sont *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus aureus*. Cette dernière, pourvue d’une activité catalase et capable de sécréter de nombreuses toxines, est la plus pathogène du genre [9].

2-2- L’espèce *Staphylococcus aureus*

L’espèce est la seule unité taxonomique pouvant être définie en termes phylogénétiques. Ainsi, chaque espèce bactérienne regroupe plusieurs souches présentant au

moins 70% d'homologie en conditions optimales et un ΔT_m inférieur à 5°C, soit une divergence nucléotidique inférieure ou égale à 5%. Dans le cas de *S. aureus*, on dénombre plus de 400 souches partiellement ou complètement séquencées [5]. Elles possèdent de nombreuses caractéristiques qui seront détaillées ci-après.

II- Caractéristiques structurales et physiologiques de *S. aureus*

1- Morphologie et structure

S. aureus est de forme sphérique (coque) et se regroupe généralement en amas, souvent qualifiés de grappes de raisin (Figure 2).

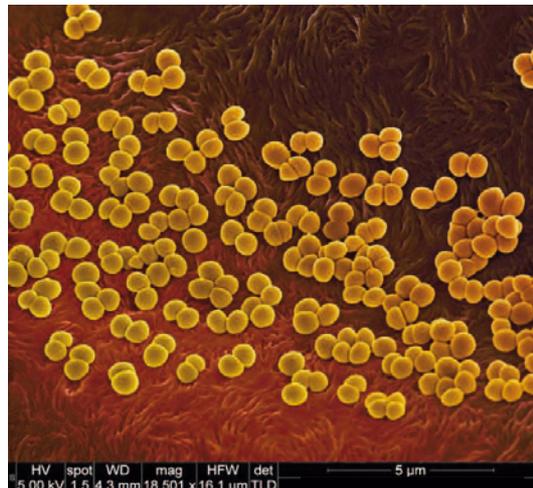


Figure 2 : Micrographie électronique à balayage colorisée de *S. aureus* résistant à la méticilline sur la surface d'un pansement de plaie. Grossissement x 18,501. <http://cellimagelibrary.org/images/40593>

D'un point de vue macroscopique, cette bactérie se caractérise par la pigmentation dorée de ses colonies, justifiant le nom vernaculaire de « staphylocoque doré ». Ces *cocci* mesurent de 0,5 à 1,5µm de diamètre, sont immobiles, non sporulés et positifs à la coloration de Gram [4]. Comme chez la majorité des bactéries Gram positives, l'enveloppe de *S. aureus* est composée d'une seule membrane plasmique recouverte d'une paroi épaisse riche en peptidoglycane et en acides téichoïques. La plupart des isolats infectieux possèdent également une capsule polysaccharidique externe contenant divers facteurs de virulence et permettant le sérotypage des souches.

Le peptidoglycane, formé de chaînes linéaires de N-acétylglucosamide et d'acide N-acétylmuramique, représente 50% du poids de la paroi bactérienne. Le reste de la paroi est majoritairement composé d'acides téichoïques (TA) caractéristiques des bactéries Gram positives. Comme le montre la figure 3A, les TA peuvent être liés de façon covalente au peptidoglycane. Ce sont les WTA pour « wall teichoic acids ». Alternativement, ils peuvent être insérés dans la membrane plasmique par une ancre lipidique (figure 3B) et sont alors nommés LTA pour « lipo-teichoic acids » [10–12].

Peptidoglycane et acides téichoïques sont d'importants motifs de reconnaissance associés au pathogène (ou PAMPs pour Pathogen Associated Molecular Pattern) impliqués dans l'activation de la réponse immunitaire innée [13,14].

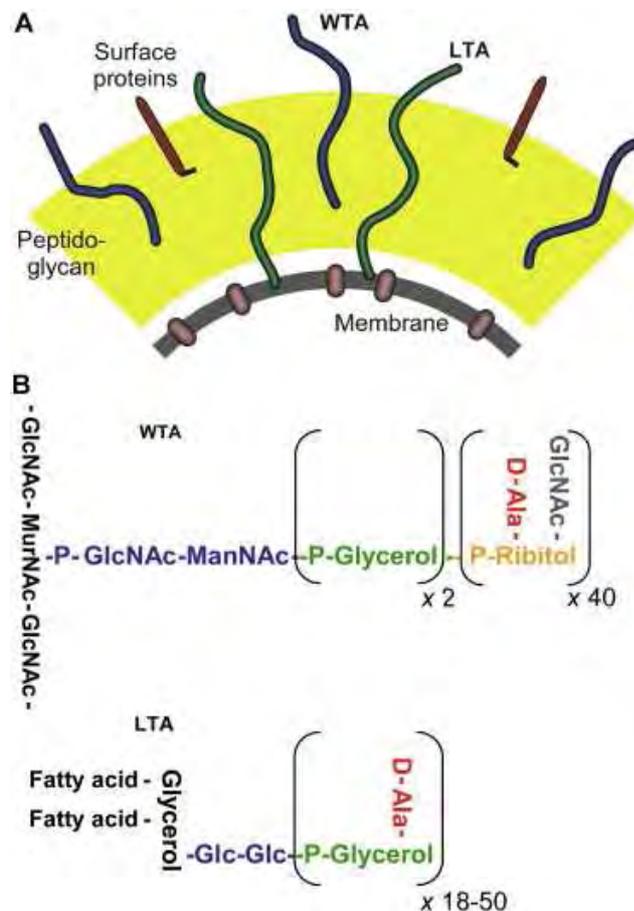


Figure 3 : Structure de la paroi de *S. aureus*.

A. Schéma global de la paroi de *S. aureus* **B.** Structure des acides poly-téichoïques (WTA et LTA) de *S. aureus*. P, phosphate; D-Ala, D-alanine; GlcNAc, N-acetylglucosamine; ManNAc, N-acetylmannosamine; MurNAc, N-acetylmuramic acid; Glc, Glucose (D'après [12]).

Plus de 90% des isolats cliniques possèdent également une capsule externe de nature polysaccharidique rarement présente lors de culture *in vitro* [15,16]. Sa composition permet de distinguer 11 sérotypes de staphylocoques plus ou moins virulents. Chez l'Homme par exemple, les sérotypes 5 et 8 sont responsables à eux seuls de 75% des infections.

De plus *S. aureus* présente de nombreuses protéines de surface possédant certaines caractéristiques communes, comme une région C-terminale ancrée dans la paroi cellulaire et une séquence signal sécrétrice à l'extrémité N-terminale. La partie N-terminale exposée à la surface de la cellule bactérienne possède un domaine de liaison au ligand, permettant à certaines de ces protéines de fonctionner comme des adhésines. Ces protéines de surface semblent ainsi jouer une part importante dans la colonisation des tissus de l'hôte [17] et seront abordées de manière plus détaillée dans le paragraphe II. 5 Facteurs de virulence.

2- Biochimie

S. aureus a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Ces bactéries possèdent une activité catalase, coagulase, phosphatase, ainsi que des nucléases thermostables mais pas d'oxydase [18,19]. Elles sont hémolytiques, ont la capacité de liquéfier la gélatine et de fermenter de nombreux sucres comme le glucose, le saccharose, le lactose et le mannitol [18]. Le diagnostic permettant de distinguer *S. aureus* des autres espèces est basé sur des tests réalisés sur colonies tels que l'identification du facteur agglomérant, de la coagulase, des hémolysines et de la désoxiribonucléase thermostable ou thermonucléase [20].

3- Croissance

In vitro, *S. aureus* est une bactérie non-exigeante. En effet, en plus d'être aéro-anaérobie facultative, elle est facilement cultivable en milieu gélosé classique tel que CBA (Columbia Blood Agar), TSA (Tryptic Soy Agar) ou BHI (Brain Heart infusion), ainsi que dans les milieux liquides correspondants [21,22]. La gélose de Chapman (ou MSA pour Mannitol-Salt-Agar) peut être utilisée comme milieu sélectif différentiel pour l'identification de *S. aureus* qui présente un caractère halophile ainsi que la capacité à fermenter le mannitol.

S. aureus se développe entre 10 et 42°C avec une température optimale de 37°C et un pH compris entre 7,4 et 7,6 [19]. Les colonies peuvent être observées après 24h d'incubation. Elles sont opaques, de pigmentation jaune-doré, ont un aspect circulaire de 2 à 3 millimètres de diamètre ainsi qu'une surface convexe lisse et brillante.

4- Génomique

Le génome de *S. aureus* est constitué d'un chromosome circulaire unique d'environ 2,8 Mb à faible teneur en guanidine et cytosine (30 à 39 %) [23,24], classant *S. aureus* parmi les bactéries gram positives à faible GC%. En plus du chromosome, le génome de *S. aureus* peut présenter divers éléments génétiques mobiles comme des plasmides, des prophages issus de phages tempérés ou encore des éléments transposables tels que transposons, intégrons, séquences d'insertion, îlots de pathogénicité ou cassettes chromosomiques [25]. Ces éléments sont souvent porteurs d'un ou plusieurs gènes conférant un avantage sélectif à la bactérie tels que la résistance à un antibiotique ou l'expression d'un facteur de virulence. Ainsi, l'élément génétique mobile le plus connu chez *S. aureus* est sans doute la SCC (pour staphylococcal chromosomal cassette) qui porte le gène *mecA* de résistance à la pénicilline [26].

En plus de leur transmission à la descendance par transfert vertical lors de la division bactérienne, ces éléments peuvent aussi se propager à d'autres bactéries « sœurs » par transfert horizontal de gènes (THG). Le THG est un mécanisme crucial pour la plasticité des génomes bactériens et l'adaptation des bactéries à leur environnement [27,28]. Il est d'ailleurs considéré comme le principal responsable de la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques au sein d'une population bactérienne [29,30]. Il peut avoir lieu au sein d'une même espèce mais aussi entre espèces, voire genres différents [31]. Comme le montre la figure 4, il existe trois grands mécanismes de THG :

- la conjugaison : le plasmide F passe d'une souche donneuse à une receveuse
- la transduction : un bactériophage tempéré encapside par erreur des portions de chromosome bactérien lors de la reprise de son cycle lytique et les « injecte » dans une autre cellule lors de l'infection.
- la transformation, basée sur la capacité que possèdent certaines bactéries à capturer de l'ADN exogène présent dans leur milieu environnant, à l'internaliser et à l'intégrer dans leur chromosome suivant un processus de recombinaison homologue.

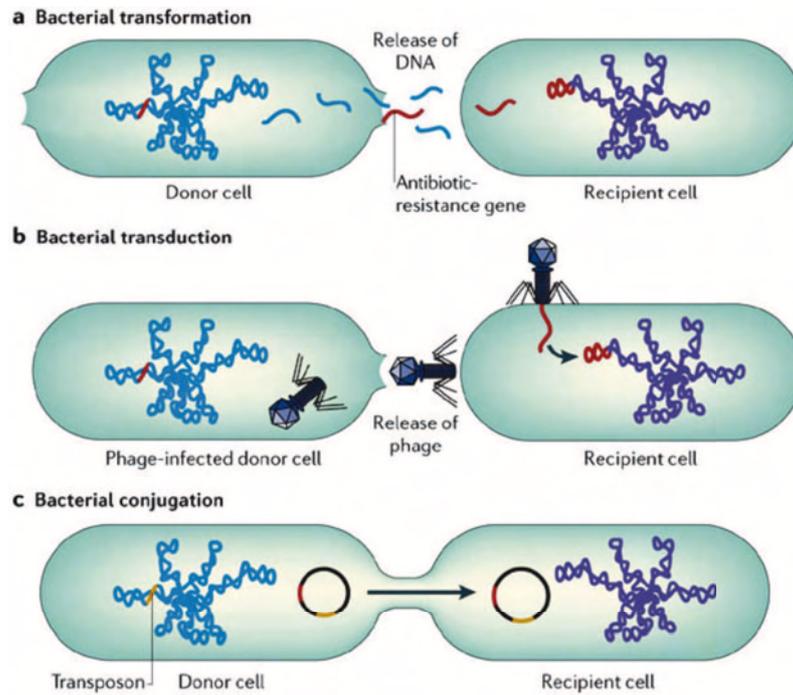


Figure 4 : Transfert horizontal de gènes entre les bactéries [32]

a- La transformation a lieu lorsque l'ADN, libéré lors de la lyse d'une bactérie, est repris par une autre bactérie. Un gène de résistance aux antibiotiques peut alors être intégré dans le génome de la bactérie receveuse. b- Dans la transduction, les gènes d'une bactérie sont transmis à d'autre bactérie par l'intermédiaire d'un bactériophage, et s'intègrent dans le génome de la bactérie receveuse. c- La conjugaison nécessite le contact entre 2 bactéries : l'échange de l'ADN est effectué par l'intermédiaire d'un plasmide. Les transposons sont des séquences d'ADN qui portent leur propre enzymes de recombinaison permettant la transposition d'un lieu à un autre.

5- Facteurs de virulence

La plupart des constituants de la paroi sont impliqués dans la virulence de *S. aureus*. En plus des protéines de surface, la bactérie sécrète un panel de toxines et d'enzymes possédant chacune des caractéristiques bien définies, sans que leur rôle ne soit encore bien compris individuellement (figure 5).

L'ensemble de ces protéines liées ou diffusibles contribue à la capacité de la bactérie à surmonter les défenses de l'hôte et à envahir, coloniser et survivre dans les tissus. Leur expression est donc étroitement régulée dans le temps.

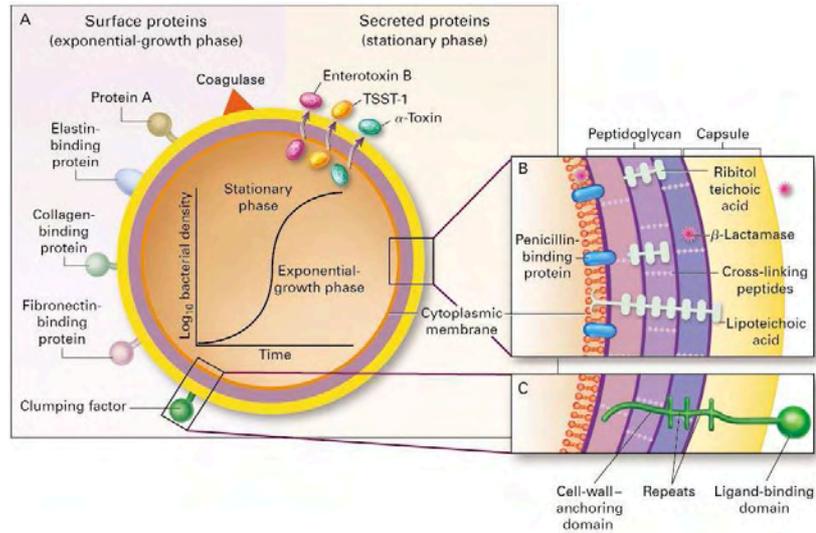


Figure 5 : Facteurs de virulence de *S. aureus* [17]

Le Panel A montre les protéines de surface et les protéines sécrétées. La synthèse de ces protéines est dépendante de la phase de croissance, comme montrée sur le graphe, et est contrôlée par des gènes régulateurs tel que *agr*. Les panels B et C montrent des coupes transversales de l'enveloppe cellulaire. Un grand nombre de protéines de surface ont une organisation structurale similaire au clumping factor, incluant les segments répétés d'acides aminés (Panel C). TSST-1 : Toxine du syndrome de choc toxique 1.

5-1- Les constituants de l'enveloppe.

Ils interviennent dans la reconnaissance de *S. aureus* par les cellules hôtes. Leur nature va moduler les interactions et les mécanismes de reconnaissance par le système immunitaire.

- La capsule polysaccharidique

La capsule améliore la virulence en conférant à la bactérie une meilleure résistance face au système immunitaire de l'hôte, notamment en interférant avec la phagocytose [15,16,33,34] et en empêchant les anticorps d'accéder aux épitopes de surface. Elle facilite aussi l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes. Dans ce cas, elle induit la sécrétion par ces cellules de cytokines inflammatoires telles que IL-1 β , IL6, TNF α et IFN γ et la chimiokine IL-8 [15,35].

- Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est immunogène et mitogène [36–38]. Il a une activité chimiotactique sur les neutrophiles en stimulant l'activation de la cascade du complément [39]. Il stimule la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6 et IL-8, CCL2, CCL3, CCL4) par les monocytes et les macrophages [40–42]. Bien que le peptidoglycane seul entraîne une faible induction de l'expression de cytokines, il a un effet synergique avec les acides téichoïques [14,43].

- Les acides téichoïques (TA)

Le WTA de *S. aureus* est impliqué dans la forme cellulaire, la division cellulaire, l'adhésion cellulaire, la formation de biofilm et la pathogénicité [12,44,45]. De plus, il confère une résistance aux β -lactames dans les souches résistantes à la méticilline [46]. Par ailleurs, sa structure semble gouverner le THG puisque *S. Aureus* échange plus efficacement de l'ADN avec une bactérie possédant un WTA de structure similaire et ce, même si elle appartient à un autre genre [31]. Au vu de son importance dans la biologie de *S. aureus*, le WTA est aujourd'hui considéré comme une cible potentielle pour de nouveaux antibiotiques [47].

Le LTA de *S. aureus* provoque une réponse inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines et chimiokines (TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-8, LTB₄, C5a, MCP-1, MIP1 α et G-CSF) par les phagocytes mononucléés. Le profil cytokinique induit par le LTA est similaire à celui produit par la bactérie entière [48]. Le LTA participent ainsi à la formation de pus en recrutant les neutrophiles via les chimiokines [43].

5-2- Les composants de surface

- La protéine A

La protéine A est produite lors de la phase exponentielle de croissance. Elle est retrouvée dans la majorité des souches pathogènes pour l'homme [49]. Elle se fixe sur le fragment Fc des immunoglobulines de classe G et M ce qui perturbe l'opsonisation et donc la phagocytose de la bactérie [50]. Elle a un rôle dans le phénomène d'agrégation bactérienne et

favorise le développement de biofilms, renforçant ainsi l'adhésion et la protection de la bactérie face à l'action des agents antimicrobiens produits par les cellules immunitaires [51].

- Les adhésines

S. aureus peut exprimer à sa surface un panel de protéines favorisant l'attachement à certaines molécules de l'hôte telles que la fibronectine, la laminine et le collagène qui forment la matrice extracellulaire des surfaces épithéliales et endothéliales. Ces protéines bactériennes sont nommées « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules » ou MSCRAMM [52,53].

Les protéines de liaison à la fibronectine et au fibrinogène sont retrouvées dans la majorité des souches de *S. aureus*. Elles contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang tels que les cathéters [54].

La protéine de liaison au fibrinogène, également appelée coagulase liée ou clumping factor, est responsable de l'adhésion bactérienne aux caillots sanguins et aux tissus endommagés [53,55]. C'est une protéine de surface pouvant aussi être diffusible suite à l'autolyse. Contrairement à ce que son nom semble indiquer, elle est dépourvue d'activité enzymatique. Sa structure, complémentaire de celle du fibrinogène, lui permet d'interagir directement avec lui ou avec des monomères de fibrine. Ainsi, elle inhibe la phagocytose par les neutrophiles en formant à la surface de *S. aureus* une couche protectrice de fibrinogène, empêchant la reconnaissance du pathogène, même opsonisé [56]. Au sein du genre *Staphylococcus*, seule l'espèce *S. aureus* possède cette protéine. Cette observation associée aux propriétés intrinsèques de la coagulase liée ont permis la mise au point d'un test de différenciation des espèces de staphylocoques basé sur l'agglutination d'hématies en présence de *S. aureus* [20].

La protéine de liaison au collagène est plutôt retrouvée dans les souches causant de l'arthrite septique et de l'ostéomyélite [57]. L'interaction avec le collagène favorise l'attachement de la bactérie aux tissus endommagés où la couche sous-jacente a été exposée.

5-3- Les composants sécrétés

5-3-1- Les exoenzymes et protéines

- La coagulase libre

La coagulase libre, ou staphylocoagulase, est une protéine diffusible thermostable exprimée pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne. En se liant à une coaguline proche de la prothrombine dans le plasma, elle forme un complexe nommé staphylothrombine qui convertit le fibrinogène en fibrine [58]. Cette réaction entraîne la coagulation locale du plasma autour des cocci les protégeant de la phagocytose. Elle est à l'origine de la thrombophlébite suppurée [59].

- La fibrinolyse

La fibrinolyse, ou staphylokinase, est une protéine thermolabile et antigénique. Elle est capable de métaboliser le plasminogène en plasmine et ainsi induire la fibrinolyse [60]. En conditions physiologiques, ce mécanisme est associé à celui de la coagulation pour éviter l'apparition de thromboses. Dans le cas d'une infection à *S. aureus*, la fibrinolyse perturbe cet équilibre en favorisant la fibrinolyse et entraîne des saignements.

Parallèlement, la fibrinolyse possède la capacité de se lier aux défensines et de former un complexe avec celles-ci inhibant leur activité bactéricide [61].

- Les lipases

Les lipases sont un ensemble de protéines regroupant les lipases elles-mêmes, les phosphatases et les estérases. Elles sont responsables de la dégradation des lipides de l'hôte [62]. En effet, les molécules lipidiques de l'hôte telles que les acides gras présentent un effet tensio-actif qui perturbe l'intégrité de la membrane bactérienne. La lipase semble aussi avoir un rôle dans le prélèvement des nutriments dans l'environnement, dans la formation de biofilms et d'abcès, participant ainsi à la pathogénicité de *S. aureus* [63]. Ainsi, des souris infectées avec une souche mutante pour la lipase ont un défaut dans la formation d'abcès et une moindre charge bactérienne dans différents organes comparés à la souche sauvage.

- Hyaluronidase

La hyaluronidase est une enzyme extracellulaire thermolabile qui digère l'acide hyaluronique. Cette dépolymérisation de l'acide hyaluronique, substance fondamentale de la matrice du tissu conjonctif de l'hôte, contribue au processus infectieux en favorisant la

dissémination via la dégradation des tissus [64]. Au sein du genre *Staphylococcus*, seule *S. aureus* possède cette enzyme [65].

- Désoxyribonucléase thermostable

S. aureus est la seule espèce du genre *Staphylococcus* à produire une nucléase thermostable. Elle permet ainsi une identification rapide de *S. aureus* dans des cultures de sang [66]. Elle a une activité exo- et endo-nucléasique qui lui permet de dégrader l'ADN mais aussi l'ARN des cellules de l'hôte [67]. Elle est active à pH alcalin en présence de calcium [67].

- Les Protéases

Les protéases retrouvées chez *S. aureus* regroupent les métalloprotéases, les thiol protéases et les sérines protéases. Parmi ces dernières, les mieux décrites sont les protéases glutamate-dépendantes dont la protéase V8, ou glutamyl-endopeptidase qui clive les polypeptides préférentiellement après un glutamate mais aussi, plus rarement, après un aspartate. Initialement identifiée chez la souche *S. aureus* V8, il est maintenant établi qu'elle est exprimée par 67% des souches virulentes [68,69]. Lors de l'infection, elle peut cliver certaines protéines de l'hôte comme les chaînes lourdes des Immunoglobulines, indépendamment de leur classe [70] ou l'inhibiteur de protéase $\alpha 1$, induisant une augmentation de l'activité protéolytique de l'hôte [71]. Elle assure également la protection de *S. aureus* en clivant certains peptides antimicrobiens cationiques tels que la cathélicidine LL-17 produite par les kératinocytes et les neutrophiles [72]. Parallèlement, la protéase V8 agit également sur les protéines bactériennes elles-mêmes, notamment par clivage de la coagulase liée, entraînant une diminution de l'adhérence aux cellules hôtes et donc une meilleure dissémination [73]. En terme de pathogénicité, il a été montré qu'un mutant *S. aureus* n'exprimant plus la protéase V8 présentait une virulence atténuée dans trois modèles murins d'infection différents [74,75].

- Catalase

La catalase convertit le peroxyde d'hydrogène produit par les neutrophiles en molécules d'eau et d'oxygène. Elle empêche ainsi la formation de radicaux oxygénés toxiques

pour la bactérie et améliore ainsi sa survie dans le phagocyte [76]. En réalité, il semblerait que la catalase soit nécessaire à la prolifération intracellulaire plutôt qu'à la survie à proprement parler. En effet, Martinez et collaborateurs ont montré que la survie intracellulaire de *S. aureus* dans des macrophages murins ou des cellules épithéliales bovines était similaire entre la souche mutante pour la catalase et la souche sauvage. En revanche, l'absence de catalase est associée à une inhibition de la prolifération intracellulaire dans les cellules épithéliales bovines [77].

5-3-2- Les toxines

- L' α -hémolysine

L' α -hémolysine (hla) est une toxine cytolytique produite par plus de 90% des souches de *S. aureus* [78,79]. C'est un des facteurs de virulence majeur de cette bactérie et un des mieux caractérisés. C'est une protéine thermostable et antigénique, exprimée lors de la phase exponentielle de croissance. Cette α -toxine a la capacité de former des pores dans les membranes cellulaires de l'hôte. Pour ce faire, elle se lie tout d'abord à son récepteur à la surface de la cellule cible, la molécule ADAM10 [80]. Puis, elle s'insère dans la membrane plasmique où elle s'oligomérisse sous forme d'heptamères cylindriques [81,82]. Les canaux amphipatiques ainsi formés induisent une entrée de diverses molécules de faible poids moléculaire et notamment d'ions calcium, second messager important impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires chez les mammifères. Majoritairement, ce phénomène conduit à la lyse cellulaire [83]. En contexte d'intoxication sub-lytique, des études ont mis en évidence une réponse de la cellule cible consistant notamment en l'altération des voies de signalisation cellulaires responsables de la prolifération cellulaire, de la réponse inflammatoire, de la sécrétion de cytokines et des interactions cellulaires [84].

Lors de l'infection, l'effet cytolytique est un facteur primordial dans la progression de la maladie puisqu'il induit une altération des tissus en exerçant une action dermonécrotique mais aussi neurotoxique [85–87].

- β -hémolysine

Cette β -toxine est une phospholipase de type C, ou sphingomyelinase, qui altère les membranes riches en lipides. Son activité hémolytique sur les érythrocytes dépend de leur

contenu en sphingomyéline [85]. Elle a aussi un rôle dans la colonisation de la peau par sa capacité à endommager les kératinocytes [88]. La majorité des isolats humains n'expriment pas la β -hémolysine, mais elle a un haut niveau d'expression dans les souches animales [86].

- δ -hémolysine

La δ -hémolysine est une protéine thermostable, hydrophobe et faiblement antigénique, produite par 97% des souches [86,89]. Elle a un effet cytotoxique en agissant comme un détergent sur les membranes biologiques. Elle exerce un effet pro-inflammatoire en raison de sa spécificité de liaison pour les neutrophiles et les monocytes [90].

- Toxines à 2 composants

Les toxines à 2 composants sont constituées d'une protéine S et d'une protéine F. L'association et l'oligomérisation de ces protéines permettent la formation de pores dans la membrane de la cellule hôte [91]. Parmi les toxines à 2 composants, on retrouve la γ -hémolysine, la Leucocidine de Panton-Valentine (PVL), lukED et lukGH (ou lukAB).

La γ -hémolysine, ou leucotoxine, est exprimée par 50 à 90% des souches, alors que la PVL est produite par 2 à 20% des souches [78,92].

La γ -hémolysine agit de concert avec la PVL pour perturber la perméabilité de la membrane des neutrophiles [93]. Elle a aussi une action sur les lymphocytes T, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, et est capable de lyser une variété d'érythrocytes de mammifères [86,89].

Le rôle de la PVL n'est pas encore clairement défini, mais elle semble être un facteur important de la nécrose tissulaire, notamment des dommages musculaires, car elle est retrouvée dans la majorité des infections nécrosantes [94]. La PVL semble également avoir un impact majeur dans l'amplification des réponses immunes de l'hôte [95,96].

Les toxines lukED et lukGH, peu étudiées jusqu'ici, commencent à être mieux caractérisées. La toxine lukED est présente chez 60 à 80% des isolats cliniques [97]. Elle est capable de lyser les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles [91,95,98,99]. La toxine LukGH peut lyser efficacement les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles [95,100,101].

- Entérotoxines

Les entérotoxines sont responsables d'intoxinations alimentaires dues à la consommation d'aliments contaminés par *S. aureus*. Ce sont des protéines thermostables sécrétées par *S. aureus* dans l'aliment et résistantes aux enzymes protéolytiques. Il existe plusieurs variants antigéniques d'entérotoxines, néanmoins, ce sont toutes de puissants superantigènes capables de stimuler la prolifération non spécifique des lymphocytes T [102].

- Toxine du syndrome de choc toxique 1 (TSST-1)

La TSST-1 est une protéine extracellulaire qui agit comme un superantigène. Une fois dans le sang, elle va induire une forte réponse inflammatoire conduisant notamment à la libération de grande quantité de TNF α , conduisant au syndrome de choc toxique [103].

- Exfoliatine

L'exfoliatine, ou épidermolysine, est responsable de différentes formes de staphylococcies cutanées bulleuses. C'est une toxine protéique épidermolytique ayant une spécificité d'action sur la peau, dont l'activité entraîne un décollement intra-épidermique [104].

5. 4 Les facteurs de persistance

S. aureus peut former des biofilms. Ce mode de croissance entraîne la diversification de la population bactérienne en favorisant l'apparition de variants [105]. Ces variants sont un état de dormance de la bactérie et jouent un rôle majeur dans la stabilité et la persistance des biofilms [106]. Ces variants, ou small colony variants (SCVs) sont originaires de mutation dans les gènes métaboliques, tels que *sigB* et *agr*, et présentent ainsi une diminution de la pigmentation, une perte de l'activité hémolytique et de dissémination [105]. Ils peuvent faire partie du cycle normal de croissance de la bactérie ou être induit par des conditions de stress, telles que les antibiotiques, l'inanition et les peptides cationiques de l'hôte [106,107]. Ces SCVs formés par *S. aureus* ont été liés aux infections chroniques, récurrentes et résistantes aux antibiotiques [107]. Ces SCV jouent donc un rôle majeur dans la persistance de la bactérie, en particulier dans les ostéomyélites, les infections associées aux corps étrangers

[108] et les infections respiratoires dans les patients en fibrose cystique [109]. Ils ont la capacité de survivre à l'intérieur des cellules hôtes, et notamment dans les cellules épithéliales et endothéliales [110]. En effet, ils peuvent résister à l'activité bactéricide des lysosomes. De plus, ils sont moins sensibles à l'activité bactéricide des peptides antimicrobiens [111]. Ainsi, les SCV de *S. aureus* permettent d'échapper aux défenses de l'immunité innée et de favoriser l'établissement et la persistance de l'infection.

En conclusion, la figure 6 présente un récapitulatif des divers facteurs de virulence de *S. aureus* et le rôle qu'ils jouent dans sa pathogénicité. On pourrait rajouter le THG en tant que facteur indirect étant donné son rôle primordial dans l'émergence de nouvelles résistances. La pathogénicité de *S. aureus* est ainsi étroitement liée à l'expression de ces différents facteurs [112].

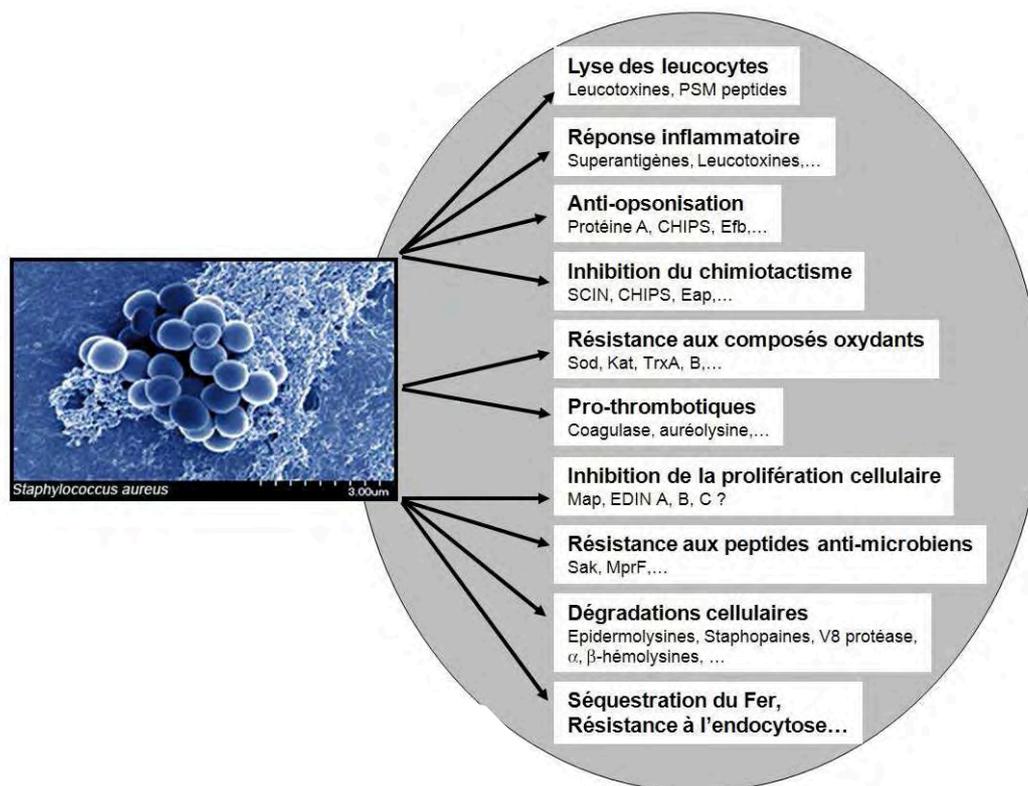


Figure 6 : Implication des facteurs de virulence de *S. aureus* dans l'évasion des défenses de l'hôte. [89]

5-5- Régulation des facteurs de virulence

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, les protéines de surface sont principalement synthétisées lors de la phase exponentielle de croissance. Elles permettent la fixation de la bactérie à la matrice extracellulaire et la colonisation des tissus. Par la suite, la dissémination à travers les tissus adjacents est rendue possible par l'expression des protéines sécrétées, telles que les protéases, synthétisées principalement lors de la phase stationnaire de croissance. Cette cinétique précise d'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* nécessite donc d'être étroitement régulée au cours des différents stades de l'infection.

Les locus *agr* (*accessory gene regulator*) et *sar* (*staphylococcal accessory regulator*) sont notamment impliqués dans cette régulation séquentielle complexe. Le locus *agr* code pour un système de transduction du signal à deux composants [113]. Dès le début de la phase de décélération, le locus *agr* régule négativement la production des protéines de surface et régule positivement l'expression des toxines sécrétés et des enzymes extracellulaires [114–116] (Figure 7). L'activation ou la répression de *sarA* influe sur l'activation du système *agr* [113,116]. De plus, l'expression d'*agr* et *sar* est elle-même régulée par le facteur sigma alternatif σ^B en réponse à l'activation du gène *rsbu* [114,115,117,118].

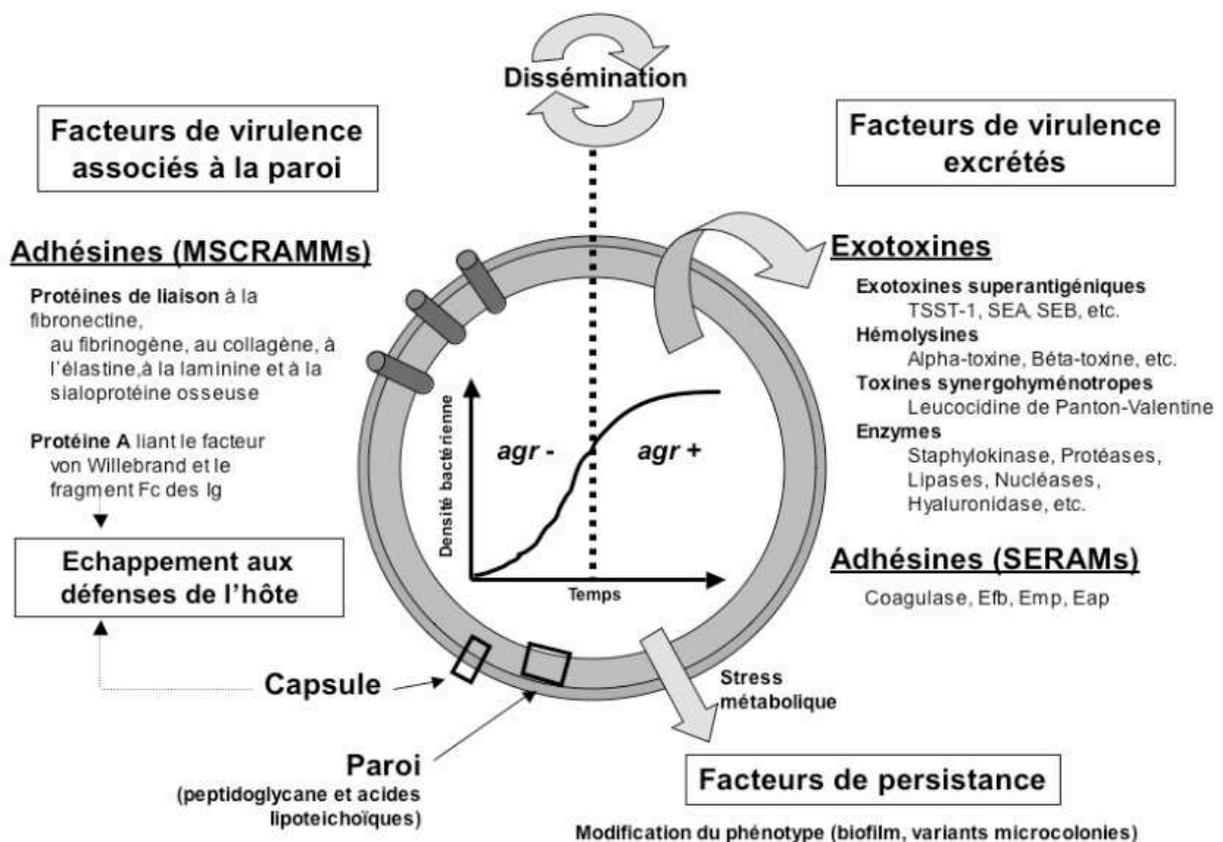


Figure 7 : Expression des facteurs de virulence et de persistance selon la croissance bactérienne et l'expression consécutive d'*agr*. Lors de la phase exponentielle de croissance de *S. aureus*, les constituants de l'enveloppe et les composants de surface permettent l'adhésion de la bactérie et l'échappement aux défenses de l'hôte. Au début de la phase de décélération, l'expression du gène régulateur *agr* est induite et entraîne la sécrétion de nombreuses exotoxines favorisant la dissémination de la bactérie. Lors d'un stress métabolique, *S. aureus* a la capacité de modifier son phénotype permettant la persistance de la bactérie. MSCRAMM : Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules. SERAM : Secretable expanded repertoire adhesive molecules.

5-6- Facteurs de virulence et spécificité d'hôte

S. aureus est réparti en de nombreuses lignées générées par des recombinaisons multiples et des échanges d'éléments génétiques mobiles entre les différentes lignées. Chacune de ces lignées possède une combinaison unique de protéines de surfaces et de régulateurs, identifiées par des séquences types. L'évolution de *S. aureus* lui permet ainsi de s'adapter à différents hôtes et d'exprimer différents facteurs de virulence selon le microenvironnement. Dans le but de mettre en évidence un lien possible entre la spécificité d'hôte et l'expression des divers facteurs de virulence de ces différentes lignées, Sung et ses collaborateurs ont comparés 217 isolats de *S. aureus* [119]. Ces isolats comprennent 161 isolats humains porteurs ou invasifs et 56 isolats animaux (vaches, chevaux, moutons, chèvres et un chameau). La comparaison génétique de ces isolats a permis une classification de *S. aureus* en différentes lignées, comme le montre les différents clusters de la Figure 8. Les isolats humains et animaux ont chacun été classés en dix lignées différentes. Bien que la majorité des isolats animaux (61%) ait été classée dans des lignées non présentes chez l'homme, ils ne sont pas sur une branche distincte de l'arbre de *S. aureus*. L'analyse de 2013 gènes de base des isolats humains montre qu'ils ne sont pas uniformément absents des isolats animaux. Bien que certains gènes soient plus conservés (*fnbA*, *fnbB* et *coa*) ou plus fréquemment exprimés (*chp*, *scn* et *sak*) chez l'homme, il n'existe pas de spécificité d'hôte à proprement parler (Figure 9). Ainsi, les isolats d'origine animale sont étroitement proches de ceux d'origine humaine et seuls quelques gènes ou combinaisons de gènes pourraient prédisposer ces isolats à développer des infections spécifiques de l'Homme ou de l'animal. Cette étude démontre que l'opportunisme prévaut de très loin sur la spécificité d'hôte et que le statut physiologique (immunitaire) de l'hôte est un facteur majeur influant sur la prédisposition à l'infection par *S. aureus*.

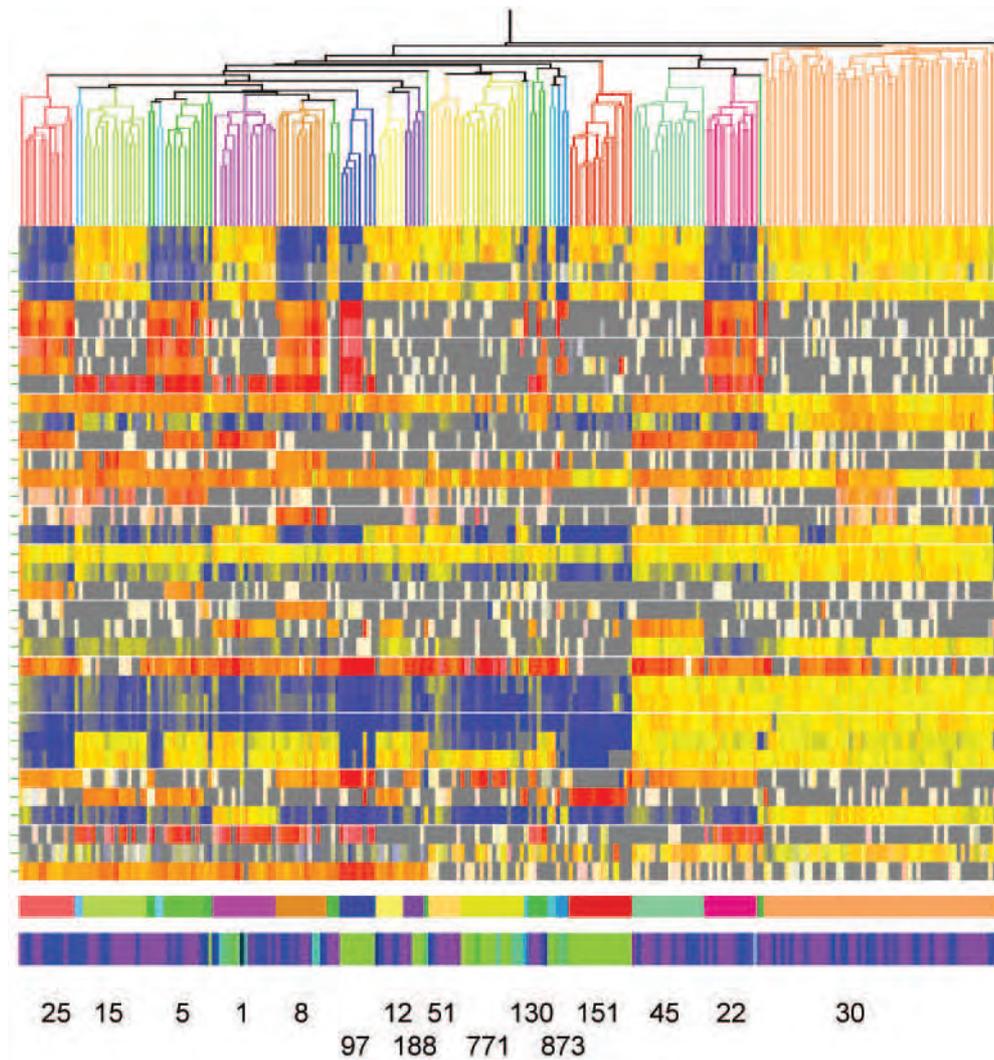


Figure 8 : Données du microarray de 217 isolats de *S. aureus* (161 isolats humains porteurs et invasifs et 56 isolats animaux), classées par une corrélation de Spearman en utilisant 728 gènes variables de base. Les lignes verticales représentent chaque isolat et sont colorés par lignées à la fois dans l'arbre et dans la rangée supérieure de blocs artificiellement colorés en dessous du microarray. Le nombre des lignées est noté en-dessous. La rangée inférieure des blocs artificiellement colorés représentent les différents isolats : isolats de bétails en vert clair, isolats de chevaux en bleu pale, et les isolats humains en bleu foncé (invasifs) et violet (porteur). Dans la principale figure, les lignes horizontales représentent les gènes individuels qui sont listés dans l'ordre dans la figure 9. Un signal jaune ou rouge indique que le gène est présent ; un signal bleu, blanc ou gris indique qu'il est absent. A noter que les lignées animales ne sont pas classées séparément des lignées humaines.

		Lineage											
Human:		25	15	5	1	8	12	51			45	22	30
Animal:						97	188	771	130	873	151		
CV	gene												
cap8H	R-0158												
cap8I	R-0159												
cap8J	R-0160												
cap8K	R-0161												
cap5H	N-0152												
cap5I	N-0153												
cap5J	N-0154												
cap5K	N-0155												
sasG	N-2285												
fnbA	R-2580									u	u	u	
fnbA*	R-2580v												
fnbA*	N-2291v												
fnbA*	8-3446												
fnbB	N-2290												
fnbB*	N-2290v		u										u
fnbB*	8-3444												
cna	R-2774									u	u		u
coa	R-2222												
coa*	R-0222v												
coa*	N-0222v												
coa*	8-0239												
coa*	M-0206v												
ebh	R-1447												
sasA	N-2447v												u
vra	R-0670												
vraF	R-0671												
vraG	R-0672												
lytN	R-1223												
fmhC	R-1224												
agr	8-agrI												
	N-agrII												
	R-agrIII												
sarT	N-2286		u										
trap	R-1926									u	u	u	u
	M-1775												

Figure 9 : Les gènes variables de base de la figure 8. Les gènes sont listés dans l'ordre par leurs noms et par leurs identifiants ou le nombre de gènes annotés (R, MRSA252 ; N, N315 ; 8, 8325 ; M, MW2). 'v' ou * désigne un produit PCR conçu pour une région spécifique de la variante. Un carré noir indique que le gène est présent dans le complexe clonal ou la séquence type. 'u' indique une variation dans la distribution du gène pour cette lignée.

III -Epidémiologie

1- Réservoir

S. aureus fait partie de la flore commensale de l'Homme et de l'animal. Elle est présente sur la peau et les muqueuses, notamment au niveau des voies aériennes respiratoires supérieures et dans les intestins. Chez l'Homme, elle est principalement retrouvée dans les

muqueuses nasales en raison de l'affinité de la bactérie pour l'épithélium qui tapisse les cavités [120,121]. Dans la population, *S. aureus* est présent dans plus de 40% des foyers [122] et on dénombre environ 30% d'individus porteurs de manière asymptomatique [17,123–125]. Cependant, la prévalence du portage nasal de *S. aureus* est très différente selon les pays et selon les individus [125,126] (Figure 10 et 11).

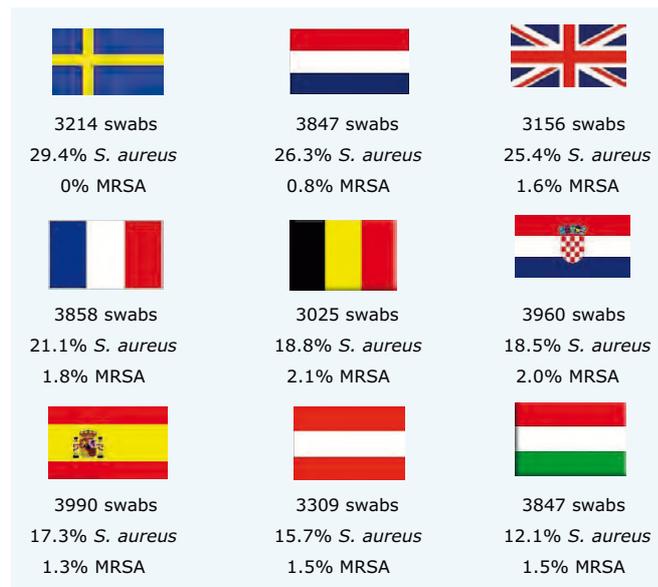


Figure 10 : Prevalence du portage nasal de *S. aureus* et de MRSA dans des individus sains dans neuf pays européens [126]. Le pourcentage de *S. aureus* et de MRSA sont indiqués selon les pays européens et le nombre d'écouvillons analysés. MRSA : *S. aureus* résistant à la méticilline.

Characteristics	Total population		<i>S. aureus</i> positive N = 203 (25%)	<i>S. aureus</i> negative N = 620 (75%)
	N	(%)	%	%
Sociodemographics				
Male	362	(39.6)	30	70
Female	552	(60.4)	22	78
Latino	813	(89.0)	25	75
Other	101	(11.0)	24	76
Age^a				
<5	84	(9.2)	15	85
5–17	238	(26.2)	33	67
18–24	74	(8.2)	29	71
25–44	223	(24.5)	24	76
45+	290	(31.9)	20	80

Figure 11 : Portage nasal selon les individus dans des foyers du nord de Manhattan.

Adapté de [122]. 914 individus ont été analysés provenant de 321 foyers. La répartition des individus à d'abord été réalisée selon le sexe, puis selon l'origine ethnique et enfin selon l'âge. a : manque l'âge de 5 ans.

Pour finir, les différentes souches de *S. aureus* présentent un tropisme d'hôte. Ainsi, certaines souches infectent préférentiellement les bovins, les ovins ou les humains. Chez un même hôte, il existe également une variabilité inter-souche en termes de pathogénicité [127]. Parallèlement, il a été démontré qu'au sein d'une même race animale, une souche de *S. aureus* pouvait être plus ou moins virulente [128].

2- Transmission

En raison de sa localisation, c'est principalement le mode de transmission manuportée qui est à l'origine des infections. Cette transmission peut être due soit à un portage direct par l'individu lui-même, soit par une contamination transitoire par un autre réservoir.

Bien que *S. aureus* soit capable de survivre plusieurs mois dans l'environnement en état de dormance [129,130], la contamination par une source environnementale reste relativement rare, sauf en milieu hospitalier où elle est prévalente [131].

Une autre voie de contamination est l'ingestion d'aliments colonisés par des souches de *S. aureus* libérant des entérotoxines, responsables d'intoxications alimentaires [132].

IV- Les infections à *S. aureus*

1- Chez l'Homme

1- 1- Types d'infections

S. aureus est une bactérie pyogène pouvant être responsables de différents types d'infections, selon la nature de la souche et la qualité de la réponse immunitaire de l'hôte.

- les toxémies: la sécrétion de toxines *in vivo* lors d'une infection par *S. aureus* peut entraîner des pathologies sévères telles que le syndrome du choc toxique, rare mais fatal [133]. La sécrétion d'entérotoxines, quant à elle, peut entraîner une intoxication alimentaire suite à l'ingestion d'aliments contaminés [132].

- les infections suppuratives: *S. aureus* est responsable d'infections cutanéomuqueuses suite à sa pénétration au travers de l'épithélium, notamment à la faveur d'une brèche. Ces infections peuvent rester locales, mais peuvent aussi être le point de départ de suppurations profondes ou d'infections généralisées et conduire à une septicémie éventuellement accompagnée d'un *purpura fulminans* [112,134,135].

1-2- Acquisition de l'infection

Chez l'Homme, on distingue 2 types d'infections staphylococciques :

- Les infections acquises en communauté
- Les infections nosocomiales, acquises en établissement de santé.

1-2-1- Les infections communautaires

Au sein d'une communauté (*e.g* internats, maisons de retraite, casernes militaires) la majorité des infections à *S. aureus* sont des infections de la peau ou des tissus mous. Néanmoins, des cas mortels ont aussi été rapportés, comme des pneumonies nécrosantes ou des septicémies [136]. Les infections communautaires sont plus fréquentes chez les enfants en bonne santé que chez les adultes [122,137]. Ces études réalisées sur des échantillons aléatoires d'individus immunocompétents montrent qu'il ne semble exister aucune prédisposition particulière à l'infection. Ainsi, malgré un système immunitaire fonctionnel, il existe une grande variabilité de sensibilité à l'infection par *S. aureus* [122,136,137] et les causes de cette variabilité sont encore mal connues.

1-2-2- Les infections nosocomiales

Selon l'OMS, les infections nosocomiales sont des « *infections survenant chez un patient admis à l'hôpital ou dans un autre établissement de santé pour une raison autre que cette infection et chez qui elle n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission* » A l'hôpital, *S. aureus* est la principale cause de bactériémie, d'infections de la peau et des tissus mous, d'endocardites et de pneumonies [8,138]. La mortalité due à une infection par *S. aureus* ne cesse de croître, en raison notamment de l'émergence de résistances multiples aux antibiotiques [139–141]. Les individus les plus touchés sont les personnes âgées, les jeunes

enfants ou les immunodéprimés, ayant un système immunitaire moins compétents et plus affaibli [136].

La transmission dans les hôpitaux peut être manuportée dans le cas d'une hygiène insuffisante du personnel soignant ou bien provenir du matériel médical comme les aiguilles de suture, les prothèses ou encore les dispositifs intravasculaires tels que cathéters et valves cardiaques artificielles (figure 12) [21,139,142].

Parallèlement, les porteurs sains sont également plus à même de développer une infection due à leur propre souche lors d'une chirurgie ou à la suite de soins post-opératoires, ceux-ci représentant une porte d'entrée systémique pour la bactérie [125,143].

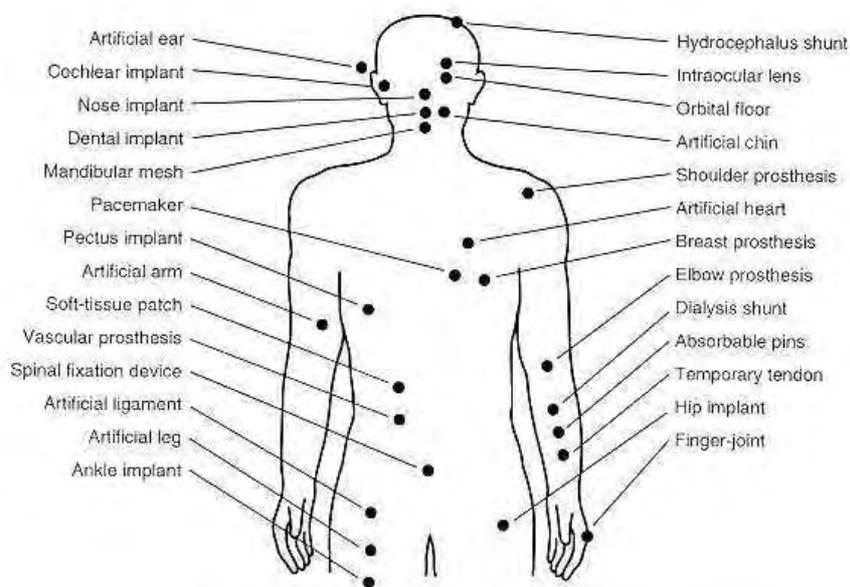


Figure 12 : Dispositifs médicaux susceptibles d'induire une contamination par *S.aureus*. [21]

1-2-3 Importance en santé publique

La prévalence mondiale de ces deux types d'infections a connu un pic à la fin du XXème siècle. Pour exemple, rien qu'entre 1987 et 1997, le nombre d'infections nosocomiales à *S. aureus* a augmenté de 35% [8,141]. Malheureusement, ce phénomène s'accompagna également d'une augmentation du taux de mortalité en raison de l'émergence de résistances multiples aux antibiotiques et notamment à l'apparition de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) ([144] et cf. paragraphe 3-2 « Traitements disponibles et résistances aux antibiotiques »). A ce sujet, l'OMS rapporte que des personnes infectées avec

SARM auraient un risque de mortalité 64% plus élevé que les personnes atteintes d'une forme non résistante.

Ces dernières années, grâce aux mesures d'hygiène drastiques mises en place dans les établissements de santé, la prévalence des infections à SARM semble enfin amorcer une décroissance en Europe [145,146]. Néanmoins, les SARM représentent toujours 17,8 % des infections nosocomiales en Europe et jusqu'à 50% aux Etats-Unis [145,147] (figure 13).

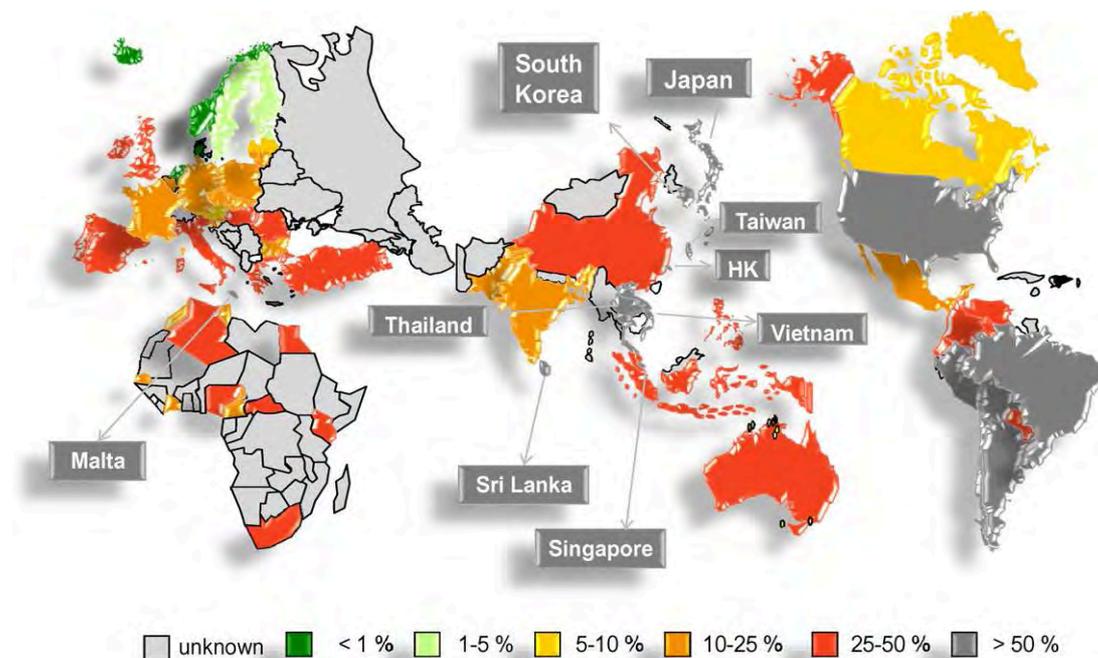


Figure 13 : Prévalence mondiale des SARM acquis en établissement de soins. HK : Hong Kong. [147]

Concernant les infections communautaires, des études menées aux Etats-Unis montrent que les SARM présentent un développement très rapide depuis les années 1990 et que leur proportion atteint aujourd'hui un seuil épidémique [148,149]. Les auteurs concluent également que les SARM acquis en communauté sont responsables de près de 14% des infections invasives à SARM développées dans le pays.

2- Chez les animaux

S. aureus est un pathogène important pour l'Homme mais pose également de réels problèmes en médecine vétérinaire et en agriculture. En effet, cette bactérie est responsable d'infections chez une grande variété d'animaux comme le chat, le chien, le cheval, le cochon, le lapin, la volaille et les bovins [150]. Comme chez l'Homme, les infections chez les

animaux sont principalement des infections de la peau et des tissus mous mais peuvent parfois être létales.

Dans les élevages bovins par exemple, *S. aureus* est responsable d'infections de la glande mammaire, ou mammites, pouvant être fatales. A ce titre, il est responsable de 5 à 30% des formes cliniques et de 5 à 10% des formes subcliniques de mammites [151]. Chez les ovins, son rôle dans le développement des formes cliniques est plus élevé encore, puisqu'il est probablement le germe dominant, voire exclusif [152].

Ces pathologies requièrent un recours à l'utilisation d'antibiotiques, avec pour conséquence leur libération dans l'environnement *via* les excréments des animaux d'élevage. Sachant que *S. aureus* peut survivre longtemps dans le milieu extérieur, ce relargage d'antibiotiques augmente les chances d'apparition de souches résistantes dans l'environnement, conduisant la médecine vétérinaire à plaider pour un usage raisonné de l'antibiothérapie dans les élevages.

Comme chez l'Homme, on observe chez les bovins une différence de sensibilité à l'infection par *S. aureus*, suggérant l'idée d'une possible sélection génétique des individus naturellement résistants [153,154].

Pour finir, il a été démontré que ces infections peuvent être transmises directement de l'animal à l'Homme *via* la consommation de lait contaminé par exemple [155] ou de l'homme à l'animal, notamment lors de la traite des bovins [156,157]. Cette boucle Animal-(Environnement)-Homme -Animal, associée à l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques, souligne l'importance de contrôles sanitaires stricts afin de contrôler de ces infections dans les élevages et ainsi diminuer les chances de transmission de souche multirésistantes à l'Homme.

3- Clinique

3-1- Symptômes

Dans le cas d'intoxications alimentaires, on observe habituellement des vomissements violents souvent accompagnés de diarrhées pendant un à deux jours, suivis d'une guérison complète [155]. La FDA (Food and Drug Administration) rapporte que le décès d'un individu suite à une intoxication alimentaire par *S. aureus* est un événement très rare. En 2009, en

Europe, sur 49000 personnes intoxiquées, seuls 46 cas eurent une issue fatale [158]. En général, il s'agissait d'enfants, de personnes âgées, très affaiblies ou immunodéprimées.

Le syndrome de choc toxique staphylococcique dû aux souches libérant la toxine TSST1 est associé à une hypotension, à de la fièvre et à une érythrodermie desquamante généralisée. Cette infection est rare mais souvent mortelle. Elle peut être favorisée par l'utilisation de tampons vaginaux lors de la menstruation [159].

Les infections cutanées entraînent, entre autres, la formation locale de furoncles, folliculites, panaris et impétigo. Les femmes allaitantes peuvent également présenter des abcès mammaires suite à l'infection de l'épithélium aréolaire fragilisé par les souches commensales de *S. aureus* présentes chez le nourrisson dès les premiers jours suivant la naissance [160].

Les infections muqueuses se traduisent généralement par l'apparition d'orgelets, et de conjonctivites au niveau oculaire ou encore, d'angines, d'otites et de sinusites en ce qui concerne la sphère ORL. Mais *S. aureus* est aussi responsable d'infections plus profondes au niveau des voies respiratoires, telles que des pneumonies ou des pleurésies. Au niveau des voies génitales, il peut causer des salpingites et des endométrites.

Les infections par *S. aureus* peuvent aussi se généraliser, principalement dans un contexte hospitalier chez des personnes immunodéprimées, et aboutir à des septicémies et/ou des *purpura fulminans*. Ces infections donnent fréquemment lieu à des localisations secondaires de la bactérie entraînant diverses pathologies telles que les ostéomyélites, les endocardites et les méningites [21].

Ces différents tableaux cliniques sont résumés dans la figure 14.

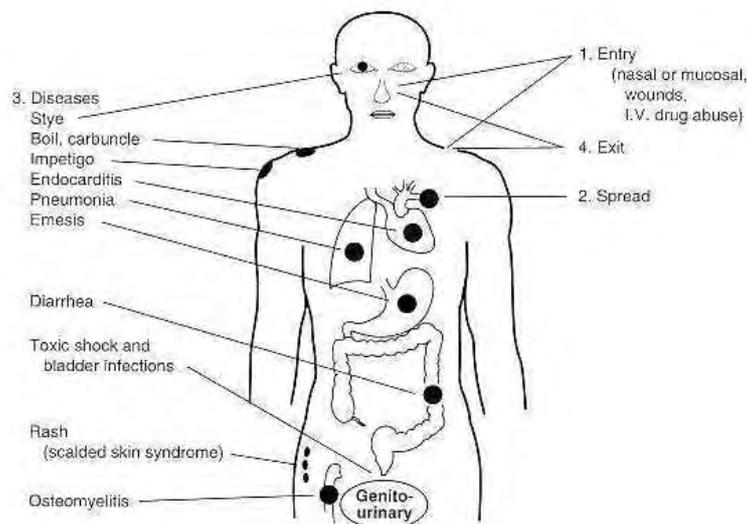


Figure 14: Pathogénèse des infections staphylococciques.

1- *S. aureus* entre dans l'hôte *via* les muqueuses ou à la faveur d'une brèche cutanée. 2- *S. aureus* peut se disséminer dans l'organisme en passant dans la circulation sanguine. 3- *S. aureus* est responsable de nombreuses pathologies. 4- *S. aureus* peut être transmise par le biais de mains contaminées. [21]

3-2- Traitements disponibles et résistances aux antibiotiques

Dans les années 1940, la pénicilline permit la guérison de patients atteints d'infections auparavant mortelles, signant le début de l'ère de l'antibiothérapie.

Néanmoins, en 1942, apparut la première souche de *S. aureus* résistante à la pénicilline [161]. De par leur nouvel avantage sélectif, ces souches résistantes sont rapidement devenues majoritaires, rendant la pénicilline inefficace contre près de 90% des souches de *S. aureus* [161].

Le développement de nouvelles molécules efficaces contre ces souches, telles que la méticilline, a alors permis de poursuivre la lutte contre *S. aureus*. Malheureusement, quelques années seulement suffirent pour voir émerger les premières souches résistantes à la méticilline, avec la première souche résistante isolée en 1961 [162].

Le mécanisme de résistance envers la pénicilline puis la méticilline, mal compris à l'époque, est aujourd'hui élucidé. Ces souches possèdent des enzymes appelées bêta-lactamases du fait de leur activité d'hydrolyse des noyaux bêta-lactames caractéristiques de la classe d'antibiotiques des bêta-lactamines à laquelle appartiennent pénicilline et méticilline [163]. Il existe aujourd'hui de nombreuses bêta-lactamases différentes, capables d'inhiber les effets d'une ou plusieurs bêta-lactamines, comme c'est le cas pour les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), récemment apparues.

Le phénomène de l'acquisition de nouvelles résistances par une souche donnée de *S. aureus* est quant à lui de plus en plus documenté. Sous la pression de sélection exercée par le traitement antibiotique, les bactéries peuvent acquérir de nouveaux gènes codant pour ces résistances [28,30] par transfert horizontal. Jusqu'à présent, les mécanismes à l'origine de l'acquisition des gènes de nouveaux gènes par les staphylocoques étaient inconnus. Cependant, il a récemment été démontré que l'activation d'un gène de *S. aureus*, appelé *sigH*, codant pour un facteur sigma alternatif, permet à ce dernier, dans certaines conditions, de mettre en route une machinerie spécialisée lui permettant de capturer l'ADN présent dans son environnement, et donc potentiellement d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques [164]. Les auteurs concluent que l'inhibition du gène *sigH* serait une piste sérieuse pour lutter

contre l'apparition de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques. Il faudrait ainsi administrer, conjointement à tout traitement antibiotique, un antagoniste de σ^B ou des molécules induisant son expression.

Concernant plus particulièrement la résistance à la méticilline, problème majeur de santé publique à l'heure actuelle, elle est le fruit du gène *mecA*, localisé sur la cassette chromosomale staphylococcique (SCC) et qui code pour des protéines de liaison à la pénicilline (PLPs) modifiées [30,140,161,162]. Les souches résistantes à la méticilline (SARM) sont résistantes à l'ensemble des beta-lactamines mais aussi souvent à d'autres classes d'antibiotiques telles que les aminoglycosides et les fluoroquinolones, améliorant leur fitness et restreignant les possibilités de traitement.

Les souches de SARM sont néanmoins encore sensibles à certaines molécules telles que la rifampicine, l'acide fusidique, les glycopeptides et certains aminosides. La rifampicine et l'acide fusidique sont souvent utilisés en combinaison car utilisées seules, ces molécules doivent être utilisées à plus forte dose et exercent donc une forte pression de sélection sur les souches bactériennes risquant d'entraîner l'apparition de résistances [161]. Les aminosides et les glycopeptides, souvent utilisés en association, ont une action néphrotoxique sur l'organisme. Ils sont donc utilisés pour des traitements de courte durée, et notamment pour les infections endovasculaires [165]. En effet, la combinaison de ces 2 molécules permet de diminuer rapidement la bactériémie et montre des résultats cliniques rapides comparés à un traitement avec une seule molécule dans ces infections.

Jusqu'à maintenant, la vancomycine, un glycopeptide, restait le traitement de choix pour les infections sévères à SARM. Mais l'émergence récente de souches résistantes à la vancomycine limite de nouveau les alternatives thérapeutiques (Figure 15). Les dernières molécules utilisées contre *S. aureus* sont la daptomycine et le linézolide, mais leur utilisation reste limitée et coûteuse et des souches résistantes ont déjà été reportées [162,166].

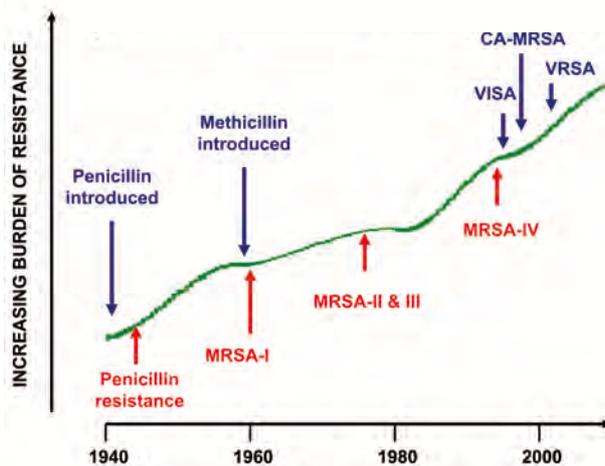


Figure 15 : Chronologie de l'apparition des résistances de *S. aureus* aux antibiotiques.

MRSAI à IV, résistances associées à des changements génétiques dans SCCmec ; VISA, *S. aureus* présentant une sensibilité intermédiaire à la vancomycine ; CA-MRSA, MRSA communautaire ; VRSA, *S. aureus* résistant à la vancomycine. D'après [140].

En conclusion, le choix de l'antibiothérapie doit être réfléchi en fonction de la souche en cause, de la localisation et de la gravité de l'infection, du niveau d'immunocompétence et d'éventuelles allergies du patient.

V. Contribution de la réponse immunitaire innée dans l'issue de l'infection.

Comme abordé précédemment, il existe une sensibilité différentielle de l'hôte vis-à-vis de *S. aureus*. En étudiant plus en détail les raisons de cette différence phénotypique chez la brebis et en complétant cette étude à l'aide d'un modèle murin, l'équipe dans laquelle j'ai mené mes travaux de thèse a réuni des éléments qui supportent l'idée que l'issue de l'infection par *S. aureus* serait dépendante de facteurs génétiques de l'hôte en lien avec la polarisation des macrophages suivant le phénotype M1 ou M2 (communication personnelle).

Les macrophages représentent la première ligne de défense de la réponse immunitaire innée. Selon le micro-environnement dans lequel ils évoluent (facteurs génétiques de l'hôte, cytokines sécrétées et composés microbiens), les macrophages peuvent prendre différents phénotypes, classiquement divisés en deux groupes M1 et M2 [167]. Ceux-ci diffèrent en termes de récepteurs, de sécrétion de cytokines, et de fonctions effectrices. Les macrophages M1 sont pro-inflammatoires et microbicides alors que les M2 sont immuno-modulateurs et peu microbicides. Les pathogènes, en perpétuelle coévolution avec leurs hôtes, ont développé des mécanismes pour détourner cette étape de différenciation à leur avantage.

Dans le cas de *S. aureus*, les récents résultats obtenus dans l'équipe suggèrent qu'une polarisation M2 serait plus avantageuse pour le développement de l'infection. Conformément à ces résultats, de multiples études ont démontré le lien entre la polarisation des macrophages, l'évolution d'une infection bactérienne et le rôle actif de certains pathogènes dans ce phénomène [168].

Dans la continuité et en complément de ces travaux, l'axe principal de mon travail de thèse fut de déterminer l'importance du phénotype des macrophages résidents, première ligne de défense de la réponse immunitaire innée, lors d'infections par *S. aureus*.

B- Immunité innée

L'immunité est l'ensemble des mécanismes développés par l'organisme pour se protéger des agressions microbiennes et des proliférations malignes. On appelle système immunitaire l'ensemble des cellules et tissus assurant l'immunité de l'organisme. Les cellules du système immunitaire sont appelées, de manière générale, les leucocytes. Ce système participe ainsi au maintien de l'intégrité de l'organisme en évoluant constamment face aux multiples micro-organismes présents dans l'environnement et aux stratégies qu'ils ont développées pour contrecarrer les nôtres. Cependant, de nombreux micro-organismes font partie de notre flore commensale et sont donc nécessaires à notre équilibre, impliquant la capacité du système immunitaire à faire la distinction entre cellules du soi en parfaite santé et intrus/non-soi/cellules du soi altérées. Les micro-organismes responsables d'infections sont qualifiés de pathogènes. Toute réponse immunitaire débute par la reconnaissance de cet agent infectieux pour ensuite développer une réaction destinée à l'éliminer. Les réponses mises en place par le système immunitaire dépendent ainsi de la nature de l'agent infectieux, de la localisation de l'infection et de la génétique de l'hôte.

Les premières barrières de défense de l'organisme sont la peau et les muqueuses. Elles permettent la protection du milieu intérieur vis à vis l'extérieur. La pénétration des micro-organismes au travers de ces barrières déclenche la première ligne de défense du système immunitaire : l'immunité innée. Celle-ci, constituée principalement du système du complément et de cellules phagocytaires, permet à l'organisme de se défendre de manière innée et immédiate. Elle est génétiquement héritée et donc présente dès la naissance. L'immunité innée est ainsi qualifiée de naturelle mais aussi de non spécifique car ses modes d'action sont invariants et ne s'adaptent pas aux micro-organismes rencontrés. Elle se mobilise rapidement en tout point de l'organisme, et assure la défense de l'hôte en combattant directement le pathogène ou en informant l'organisme de sa présence. Grâce à des systèmes de défense moléculaires et cellulaires, à la suite de cette première réponse, une deuxième ligne de défense plus spécifique se met en place, l'immunité adaptative, constituée de cellules lymphocytaires. La coopération de ces systèmes de défense par interaction directe ou par l'intermédiaire de médiateurs cellulaires tels que les cytokines et les chimiokines, permet ainsi un meilleur contrôle de l'infection [169].

I- Les barrières épithéliales

Les surfaces épithéliales exposées à l'extérieur de l'organisme, telles que la peau et les muqueuses, sont les premières à être en contact avec le pathogène. Elles représentent ainsi la première ligne de défense physique, chimique et microbiologique de l'organisme [170].

Les surfaces épithéliales sont constituées de cellules épithéliales jointives et juxtaposées, solidaires les unes des autres par des jonctions intercellulaires serrées, l'ensemble formant un épithélium. L'épithélium de la peau, l'épiderme, est constitué de plusieurs couches permettant une barrière physique efficace face aux pathogènes [171]. Les muqueuses sont plus fragiles, étant constituées d'une seule couche de cellules épithéliales, et sont la cible favorite des pathogènes [172].

Outre leur fonction de barrière physique, ces épithélia produisent diverses substances chimiques protectrices, bactéricides et bactériostatiques [171,172]. Le mucus et le sébum, produits respectivement par les muqueuses et la peau, ont un rôle antimicrobien. La production de molécules tels que les lysosymes contenus dans la salive et les sécrétions lacrymales, et les défensines aux niveaux des épithélia intestinaux, respiratoires, uro-génitaux et cutanés renforce cette fonction de barrière chimique.

Pour finir, les épithélia sont constitués d'une flore commensale de bactéries saprophytes qui inhibent la multiplication des agents pathogènes en rentrant en compétition pour l'espace et les nutriments, mais aussi parfois, par la production de peptides antimicrobiens.

Par ces diverses fonctions, les épithélia s'opposent ainsi à la pénétration des pathogènes dans l'organisme. Cependant, une brèche de ces barrières facilite l'entrée du germe dans l'organisme et les micro-organismes ont aussi développés de nombreux mécanismes pour les contourner ou les détruire [172]. Il est également important de noter que ces épithelia communiquent intensément avec les cellules de l'immunité. La production de médiateurs inflammatoires est une fonction essentielle de ces barrières qui permet le recrutement précoce de cellules immunitaires effectrices sur le site infectieux. Le déchiffrement du dialogue moléculaire entre ces deux compartiments cellulaires est une clé essentielle de notre compréhension des mécanismes précocement mis en jeu lors d'une infection.

II- Le système du complément

Le système du complément est l'un des premiers mécanismes à se mettre en place suite à l'entrée d'un pathogène dans l'organisme. Il représente un ensemble de plus de trente protéines plasmatiques et membranaires jouant un rôle essentiel dans l'élimination des micro-organismes. La majorité des protéines du complément sont plasmatiques et s'activent selon différents modes de reconnaissance des pathogènes. On distingue 3 voies majeures d'activation du complément :

- la voie classique, activée par reconnaissance d'un complexe antigène-anticorps
- la voie alterne, activée par reconnaissance directe des micro-organismes
- la voie des lectines, activée par reconnaissance d'un résidu mannose présent à la surface de certains micro-organismes.

L'activation de ces voies conduit à la formation de complexes enzymatiques, permettant la libération de différents facteurs effecteurs du complément : C3a, C3b, C5a et C5b. Les facteurs C3b et C5b restent fixés à la surface du pathogène. C3b a un rôle d'opsonine : elle se fixe à la bactérie afin de permettre sa reconnaissance par les phagocytes. C5b induit le recrutement des composants du complexe d'attaque des membranes (CAM) formant un pore dans la membrane plasmique de la bactérie et conduisant à sa mort par choc osmotique. Cependant, le CAM n'est pas efficace sur les bactéries Gram positives en raison de leur épaisse paroi, riche en peptidoglycane. Les facteurs C3a et C5a sont des anaphylatoxines : elles induisent des réactions caractéristiques de l'anaphylaxie. Ces 2 peptides se fixent sur les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ce qui stimule la chimiotaxie des neutrophiles et la production de dérivés toxiques de l'oxygène par les phagocytes.

Le système du complément participe donc à l'opsonisation, à la réponse inflammatoire, à l'élimination des complexes antigènes-anticorps et à la destruction des pathogènes [173,174].

III- Le macrophage

Les premières cellules de l'immunité à rencontrer le pathogène sont les macrophages tissulaires résidents. Ils sont un composant essentiel de l'immunité innée et jouent un rôle central dans l'inflammation et les défenses de l'hôte. De plus, ces cellules remplissent des fonctions homéostatiques au-delà de la défense de l'organisme, comme le remodelage des tissus dans l'ontogenèse, l'orchestration des fonctions métaboliques et la cicatrisation. Les

macrophages sont caractérisés par une grande diversité phénotypique permettant de répondre à l'ensemble de leurs fonctions [169,175–177].

1- La biologie du macrophage

1-1-La distribution tissulaire : des monocytes aux macrophages

Les macrophages dérivent des monocytes qui représentent 4 à 10% des leucocytes sanguins. Les monocytes et macrophages appartiennent au système des phagocytes mononucléés originaires de la lignée myéloïde dont la genèse a lieu dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur myéloïde commun avec les granulocytes [178] (Figure 16). Les étapes de différenciation du monocyte sont essentiellement dépendante du facteur de croissance M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor ou CSF-1). Lorsque la maturation cellulaire est atteinte, les monocytes quittent la moelle osseuse pour aller dans la circulation sanguine. Ils forment une population hétérogène présentant une grande variabilité dans l'expression des marqueurs cellulaires. Les monocytes du sang se divisent en 2 sous-populations distinctes avec des propriétés migratoires différentes : les monocytes circulants et les monocytes inflammatoires [179,180]. Les monocytes circulants patrouillent dans le sang et sont recrutés dans les tissus non inflammatoires où ils se différencient en macrophages résidents ou en cellules dendritiques (CD). Les macrophages résidents participent principalement à l'homéostasie tissulaire alors que des CD sont impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire spécifique. A l'inverse, les monocytes inflammatoires sont recrutés sur les sites inflammatoires, où ils vont rapidement répondre aux stimuli microbiens en sécrétant des cytokines et des facteurs antimicrobiens [181,182]. Il a été montré, chez la souris que la demi-vie des monocytes inflammatoires dans le sang est d'une dizaine d'heures alors que celle des monocytes circulants est de plusieurs jours [183]. Avec la moitié des monocytes du sang quittant la circulation sanguine chaque jour, les monocytes constituent un réservoir systémique considérable de précurseurs myéloïdes [179]. Cependant, des études suggèrent que les macrophages résidents ont aussi la capacité de s'autorenouveler [180].

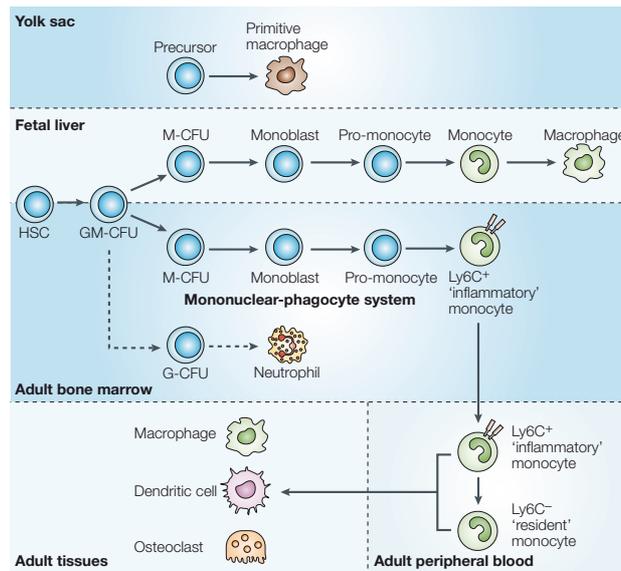


Figure 16 : Le système des phagocytes mononuclées [180]. Les macrophages en développement sont d'abord retrouvés dans les sacs embryonnaires. Plus tard dans le développement, l'hématopoïèse dans le foie fœtal devient la source de macrophages qui ressemblent à ceux présent chez l'adulte. A l'âge adulte, les macrophages des différents tissus peuvent être issus de la différenciation des monocytes dérivés de la moelle osseuse. Lorsque les monocytes dérivés de la moelle osseuse sont libérés dans le sang périphérique (Ly6C+), ils semblent pouvoir se différencier en un sous-ensemble cellulaire phénotypiquement distinct (Ly6C-). G-CFU : Granulocyte colony-forming unit ; GM-CFU : Granulocyte/macrophage colony-forming unit ; HSC : Haematopoietic stem cell ; M-CFU : Macrophage colony-forming unit

Les macrophages, disséminés dans l'ensemble de l'organisme, se distinguent des monocytes par une plus grande taille, le développement considérable de l'appareil vacuolaire (vésicules d'endocytose, endosomes, lysosomes primaires, phagosomes, phagolysosomes), des expansions cytoplasmiques qui forment de véritables pseudopodes et des modifications majeures du transcriptome global [184]. Les macrophages résidents sont présents dans presque tous les tissus ou organes. Selon leur localisation tissulaire, les macrophages ont différentes nominations (Figure 17).

Tissus	Macrophages
Tissus conjonctifs lâches	Histiocytes
Poumons	Macrophages alvéolaires
Reins	Cellules mésangiales
Cerveau	Astrocytes
Foie	Cellules de Kupffer
Os	Ostéoclastes
Péritoine	Macrophages péritonéaux
Villosités du placenta	Cellules de Hofbauer

Figure 17 : Différentes nominations des macrophages selon la distribution tissulaire. D'après [176].

Les fonctions et le phénotype des macrophages tissulaires dépendent d'une interaction complexe entre leurs voies de différenciation intrinsèques et les signaux reçus des cellules résidentes voisines. En fonction du microenvironnement dans lequel ils migrent, les macrophages acquièrent des phénotypes fonctionnels distincts.

1-2- Rôle dans Homéostasie

Bien que les macrophages tissulaires soient anatomiquement distincts les uns des autres, aient des profils transcriptionnels et des capacités fonctionnelles différents, ils sont tous requis pour le maintien de l'homéostasie [176,177].

Il a ainsi été montré que les macrophages participent au remodelage tissulaire homéostatique lors de la vie oncofoetale et dans certains tissus à l'âge adulte [176,177,185,186]. Les fonctions de développement des phagocytes mononucléés incluent le remodelage de la matrice extracellulaire, la prolifération épithéliale, le développement et l'organisation du réseau vasculaire et la mise en forme de l'organisation tissulaire [178] (Figure 18). L'analyse transcriptionnelle des macrophages impliqués dans les processus de développement montre une augmentation des gènes impliquant des fonctions anti-inflammatoires et de remodelage tissulaire tels que des gènes codant pour des enzymes dégradant les tissus, des chimiokines et des récepteurs scavengers [185].

A l'âge adulte, les macrophages jouent aussi un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie tissulaire à l'état basal [175]. Les macrophages ont une fonction phagocytaire

majeure. Ils nettoient environ 2×10^{11} érythrocytes chaque jour, ce qui équivaut à presque 3kg de fer et d'hémoglobine chaque année recyclés et réutilisés par l'organisme. Ce processus de clairance est une contribution métabolique vitale à l'intégrité de l'organisme. Les macrophages limitent aussi le processus de coagulation plasmatique et de fibrinolyse en participant à la clairance des facteurs de coagulation activés, des molécules de fibrine et de plasmine. Les cellules de Kupffer participent au catabolisme lipidique permettant la synthèse de cholestérol et d'acide arachidonique. Les macrophages sont aussi impliqués dans l'élimination des débris cellulaires qui sont générés lors du remodelage tissulaire, et phagocytent rapidement et efficacement les cellules apoptotiques. Les récepteurs qui permettent ces processus de clairance homéostatique incluent les récepteurs scavengers, les récepteurs de la phosphatidyl-sérine, les récepteurs à la trombospondine, aux intégrines et au complément. En général, ces récepteurs qui déclenchent la phagocytose à l'état basal ne transmettent pas de signaux induisant la transcription de gènes de cytokines. Ils induisent à l'inverse des signaux inhibiteurs du déclenchement d'une réponse inflammatoire. De plus, la majorité des phagocytoses homéostatiques sont indépendantes des autres cellules de l'immunité. Ainsi, la fonction primaire des macrophages résidents est de nettoyer l'environnement interstitiel des matériaux cellulaires extrinsèques.

Diversity of macrophages

Tissue	Specific macrophage name	Function
Bone	Osteoclast	Bone remodelling and providing a stem cell niche
	Bone marrow macrophage	Erythropoiesis
Brain	Microglial cell	Neuronal survival and connectivity, and repair after injury
Epidermis	Langerhans cell	Immune surveillance
Eye	NA	Vascular remodelling
Intestine	Crypt macrophage	Immune surveillance
Kidney	NA	Ductal development
Liver	Kupffer cell	Clearance of debris from blood and liver tissue regeneration after damage; liver development?
Mammary gland	NA	Branching morphogenesis and ductal development
Ovary	NA	Steroid hormone production and ovulation
Pancreas	NA	Islet development
Testis	NA	Steroid hormone production; Leydig-cell development?
Uterus	Uterine DC	Angiogenesis and decidualization
	Uterine macrophage	Cervical ripening

DC, dendritic cell; NA, not applicable.

Figure 18 : Diversité et fonctions des macrophages. [178]

2- Détection des pathogènes : les PRR

Les phagocytes mononucléés sont aussi des éléments essentiels de l'orchestration des réponses immunitaires innées et adaptatives lors d'une infection. En effet, lors d'une infection bactérienne, l'initiation de la réponse débute toujours par la reconnaissance du pathogène et des signaux de dangers par les macrophages. Cette reconnaissance est permise par un ensemble de récepteurs, les PRR (pattern recognition receptors). Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires conservés exprimés par les micro-organismes, appelés les PAMPs. (pathogen associated molecular pattern) [169,187]. Les PAMPs sont produits uniquement par les micro-organismes, sont exprimés constitutivement et sont invariants entre micro-organismes du même groupe. Ces caractéristiques permettent une reconnaissance efficace par un petit nombre de PRR. Par exemple, de nombreux PAMP font partie de l'enveloppe bactérienne, tels que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives ou l'acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries Gram positives, permettant la reconnaissance de l'ensemble des bactéries Gram négatives et positives. En plus de ces PAMPs, des signaux de dangers, ou alarmines, sont libérées par la lyse cellulaire lors d'une infection ou de dommages tissulaires ou rapidement sécrétées par les leucocytes et les épithélia stimulés [188]. L'ensemble des PAMPs et des alarmines constitue ainsi la famille des DAMPs (Damage-associated molecular pattern). Ces alarmines jouent un rôle dans l'immunité et l'inflammation. Les alarmines représentent plusieurs protéines, telles que HMGB1, HSPs et S100 (humains seulement) et peptides, tels que les défensines et les cathelicidines [188,189]. Elles présentent plusieurs caractéristiques fonctionnelles dont des rôles anti-microbiens, chimiotactiques et participent à l'induction des réponses immunitaires de l'hôte. Parmi les peptides antimicrobiens (AMP), on retrouve principalement les défensines et les cathelicidines [190]. La chimiotaxie et l'activation du système immunitaire sont stimulées par HMGB1 et les protéines S100 [191,192]. Les protéines HSP sont des chaperones, plutôt caractérisées dans le maintien de l'homéostasie et la survie cellulaire, semblent aussi avoir un rôle dans les réponses immunitaires [193].

Au sein des PRR, on va distinguer plusieurs types de récepteurs, avec principalement les récepteurs scavengers, les récepteurs de la famille des lectines, les TLR (Toll like receptor) et les récepteurs NLR (nucleotide oligomerization domain (Nod)-like receptors) [194] (Figure 19).

Les récepteurs scavengers et ceux de la famille des lectines, essentiellement exprimés par les phagocytes, permettent de capter les bactéries et de les phagocyter. Les récepteurs

scavengers, tels que SR-A et CD36, reconnaissent les bactéries via les PAMPs et on aussi la capacité de reconnaître les cellules mortes, via notamment les phosphatidylsérines, et des lipoprotéines de faible densité oxydées (oxLDL) [195]. Les récepteurs de la famille des lectines sont nombreux et reconnaissent les oses de la paroi des bactéries. Parmi eux, on retrouve par exemple, le MMR (Macrophage mannose receptor ou MR) et dectin-1, reconnaissant respectivement les résidus mannoses et glucoses (β -glucane) de la paroi des pathogènes [196].

Les TLR représentent une grande famille de récepteurs, avec dix récepteur chez l'Homme de TLR1 à TLR10 et douze récepteurs chez la souris de TLR1 à TLR13 (le TLR10 étant un pseudogène) [197,198]. Ils sont situés soit à la surface de la membrane plasmique, soit sur la membrane des vésicules intracellulaires. Ce sont des molécules transmembranaires qui possèdent un domaine de reconnaissance comprenant de nombreux motifs riches en leucine (LRR) et un domaine de transduction du signal intracytoplasmique (TIR). Ils sont ainsi capables de reconnaître un grand nombre de composants microbiens. Ainsi, le LPS des bactéries Gram négatives est reconnu spécifiquement par le TLR4, alors que le peptidoglycane et l'acide lipoteichoïque, exprimés par les bactéries Gram positives, sont reconnus par le TLR2 [187].

Plus récemment, il a également été montré que les TLR sont aussi capables de détecter les alarmines [189]. En effet, HMGB1 est capable d'entraîner la signalisation des TLR2 et TLR4 [199]. De plus, HMGB1 peut coopérer avec les CpG pour améliorer la signalisation via TLR9 [200]. Les protéines S100 et HSP ont aussi la capacité de signaler via TLR4 [189].

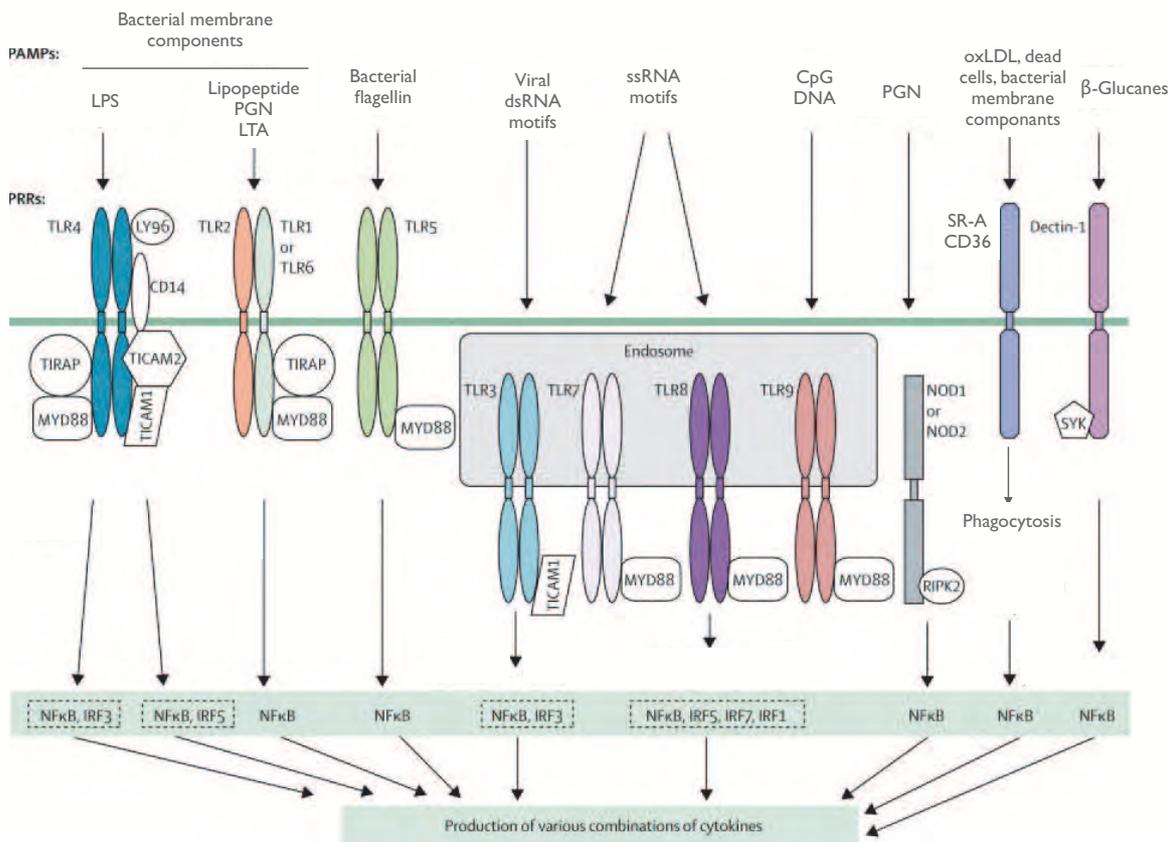
Les TLR peuvent être présents sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères, en s'associant les uns avec les autres. Ainsi, les dimères TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 reconnaissent les lipopeptides, les lipoarabinomannanes (LAM), les lipomannanes, les acides lipoteichoïques, les lipoprotéines et les peptidoglycanes. Le TLR4 reconnaît le LPS des bactéries Gram négatives et le TLR5 reconnaît les flagellines bactériennes. Le TLR3 reconnaît l'ADN double brin viral, le TLR7 et TLR8 reconnaissent les motifs d'ARN simple brin et le TLR9 reconnaît les dinucleotides cytosines polyguanines (CpG) de l'ADN [194].

Les NLR regroupent principalement les récepteurs NOD et les récepteurs NLRP ou NALP (NLRP : NOD, leucine rich repeat and pyrin domain containing; NALP : NACHT, LRR and PYD domains-containing protein) [201]. Ces récepteurs sont cytoplasmiques et ont la capacité à reconnaître les produits microbiens. Les protéines NOD, NOD1 et NOD2, reconnaissent certains motifs du peptidoglycane des bactéries Gram positives et négatives [202]. Les récepteurs NLRP représentent une grande famille d'une dizaine de récepteurs.

Seuls les récepteur NLRP1 et NLRP3 seront abordés. En réponse aux pathogènes ou à leurs produits dérivés, ces 2 récepteurs ont la capacité de former un complexe multiprotéique cytoplasmique appelé inflammasome qui est requis pour la maturation de la caspase-1. L'activation de la caspase-1 permet la libération d'IL-1 β et d'IL-18. Les récepteurs NLRP3 peuvent aussi être activés par les DAMPs [203].

La reconnaissance d'un PAMP par les TLR et les protéines NOD conduit à l'activation de facteurs de transcription, tels que NF κ B (Nuclear factor- κ B), AP-1 (Activator protein 1) ou IRF (IFN regulatory factor), permettant l'expression d'un grand nombre de gènes, dont les gènes de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de facteurs antimicrobiens [187,194].

Grâce à ces récepteurs, la présence d'un pathogène est directement détectée par les cellules de l'immunité innée. Cette reconnaissance rapide et efficace des micro-organismes permet l'induction de la réponse inflammatoire qui va varier selon les PRR engagés.



Figures 19 : Les PRR et leurs ligands. Adapté de [204].

(LTA : acide lipoteichoïque ; LPS : Lipopolysaccharide ; NOD : protéine à domaine d'oligomérisation liant les nucléotides ; SR-A : récepteur scavenger de classe A ; TLR : récepteur de type Toll.)

3- Les mécanismes de défenses

3-1- La phagocytose

3-1-1- Voie d'activation

La phagocytose est une fonction clé des macrophages. En plus de son rôle dans l'homéostasie par l'élimination des cellules sénescents et des débris cellulaire, elle est cruciale pour les défenses anti-infectieuses. Elle permet la dégradation des micro-organismes mais aussi le recrutement et l'activation d'autres cellules de l'immunité [205,206]. La phagocytose est assurée par les phagocytes professionnels que sont les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles.

La phagocytose correspond à l'internalisation de grosses particules dans des vacuoles appelées phagosomes. Pour aboutir à cette internalisation, la bactérie se retrouve entourée de pseudopodes par les phagocytes. La formation de ces pseudopodes est induite par plusieurs récepteurs. On distingue une reconnaissance directe du micro-organisme par les récepteurs scavengers et par ceux de la famille des lectines, et une reconnaissance indirect via des opsonines. Les opsonines peuvent être soit un anticorps, soit un composant du complément. Elles se fixent aux pathogènes et permettent ainsi la reconnaissance par les phagocytes qui possèdent des récepteurs aux opsonines : le CR (récepteur au complément) et le FcR. La phagocytose conduit à l'internalisation d'une partie de la membrane du phagocyte pour former une vacuole intracellulaire, le phagosome, qui contient le micro-organisme reconnu. Celui-ci subit ensuite plusieurs étapes de maturation qui vont permettre la production de nombreux facteurs anti-microbiens.

3-1-2- Activation des Mécanismes indépendants de la production des radicaux libres

Le phagosome va d'abord fusionner avec des endosomes, ce qui va permettre une modification de la composition de sa paroi et de son contenu (Figure 20). On observe ainsi l'activation d'une pompe à proton (ATPase) qui permet l'acidification de son contenu [207]. Le phagosome acquiert également de nombreuses enzymes responsables de la digestion du micro-organisme comme des protéases acides (cathepsines), des lipases et des glycosidases

[208,209]. Lors de cette maturation on observe aussi une forte augmentation de la concentration en peptides anti-microbiens, dont la défensine, dans le phagosome [210].

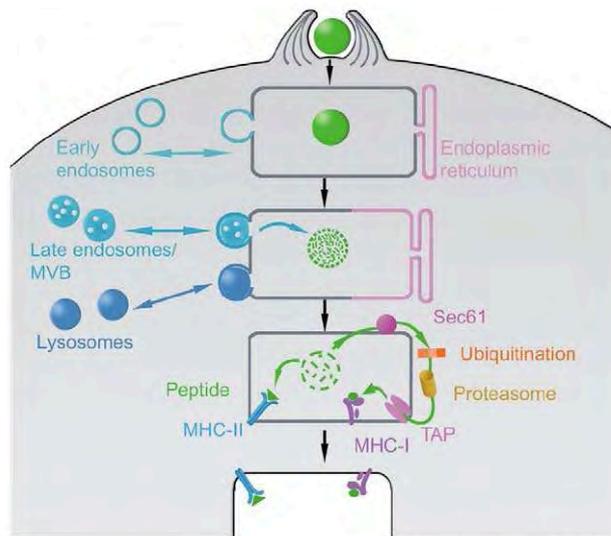


Figure 20 : La phagocytose : Maturation du phagosome et présentation antigénique. [205]

Le phagosome subit une série d'événements de fusion avec le compartiment endocyttaire (endosomes précoces, endosomes tardifs, corps multivésiculaires (MVB) et les lysosomes). Les peptides générés de la dégradation de la particule internalisée sont ensuite chargés sur les molécules de CMH de classe II (MHC-II), acquises des compartiments endocytaires qui stockent des molécules de MHC-II nouvellement synthétisées. La fusion avec le réticulum endoplasmique délivre le CMH de classe I (MHC-I) au phagosome. Les peptides générés par dégradation dans le phagolysosome acide sont exportés dans le cytosol via le complexe Sec61, ubiquitinylés, traités par le protéasome et transporté de nouveau vers la lumière du phagosome via TAP où ils sont éventuellement chargés sur les molécules de MHC-I. Les complexes peptide/MHCI-II sont alors exportés à la surface cellulaire.

3-1-3- Le burst oxydatif

Lors de la fusion avec le lysosome, on observe l'activation d'un complexe enzymatique, la NADPH oxydase. Cette enzyme crée un potentiel de membrane qui réduit le dioxygène en anion superoxyde. Sous l'action de la super oxyde dismutase, le superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [211].

En parallèle, un deuxième complexe enzymatique s'active, la NO-synthase inductible (iNOS). Cette enzyme est responsable de la formation d'espèces réactives de l'azote, comme le peroxyde nitrite et les nitrites [212].

Cette double activation constitue le burst oxydatif, caractérisé par la production de nombreux composés présentant de puissantes activités anti-microbiennes et qui participent activement à la dégradation des micro-organismes phagocytés (Figure 21).

Par ailleurs, la dégradation du pathogène permet l'apprêtement des peptides antimicrobiens pour la présentation antigénique à la surface des phagocytes, étape indispensable à l'activation des lymphocytes T spécifiques du micro-organisme [205,206].

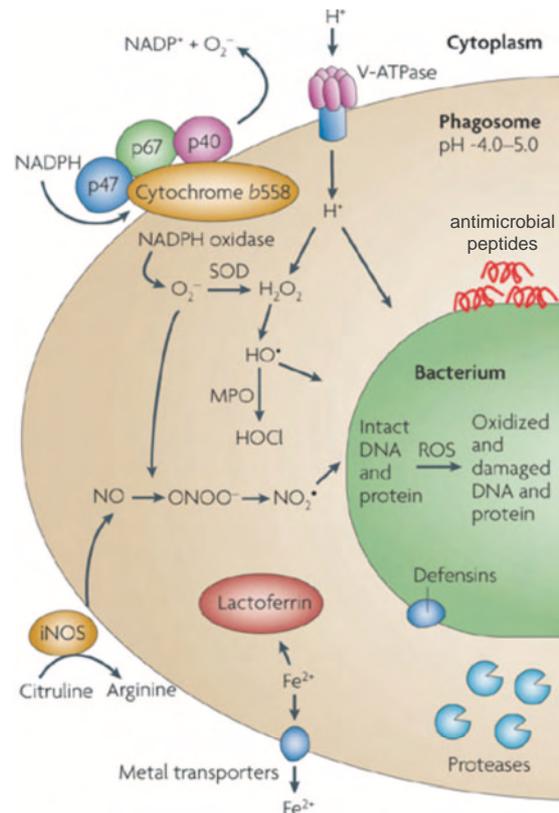


Figure 21 : Facteurs microbicides de l'hôte. Adapté de [213].

Les mécanismes microbicides de l'hôte incluent la NADPH oxydase, la NO-synthase inductible (iNOS), la liaison du fer par la lactoferrine et l'exportation du fer, des peptides antimicrobiens et des protéines qui perméabilisent et dégradent la bactérie.

3-2- La réponse inflammatoire

3-2-1- Caractéristiques physiologiques de l'inflammation

La conséquence de la reconnaissance et de la phagocytose des microorganismes par les macrophages est l'induction de la réponse inflammatoire, caractérisée par la production de

facteurs solubles : les cytokines, les chimiokines et les médiateurs lipidiques. Ces médiateurs de l'inflammation vont avoir pour fonction de recruter de nouvelles cellules et molécules sur le site de l'infection pour tuer les micro-organismes, éviter la dissémination de l'agent pathogène et initier la phase de cicatrisation tissulaire. La réponse inflammatoire se caractérise par quatre signes dus à des modifications vasculaires importantes énoncées par Celsus au 1^{er} siècle : « Rubor et tumor cum calor et dolore » (rougeur et oedème avec chaleur et douleur) qui correspondent à [169]:

- La vasodilatation permettant d'augmenter le flux sanguin et d'en réduire la vitesse
- L'activation endothéliale par l'expression de molécules d'adhésion permettant l'attachement des leucocytes et leur extravasation tissulaire
- L'augmentation de la perméabilité vasculaire responsable de l'oedème
- La coagulation localisée dans les micro vaisseaux du site infecté afin d'éviter la dissémination.

Les médiateurs lipidiques de l'inflammation tels que les prostaglandines et les leucotriènes jouent un rôle important dans ces modifications vasculaires. La dégradation des phospholipides membranaires entraîne la libération d'acide arachidonique. Ce dernier est métabolisé en prostaglandines et en leucotriènes par les cellules de l'hôte. Les prostaglandines jouent un rôle vasodilatateur lors de l'inflammation et les leucotriènes permettent d'augmenter la perméabilité capillaire et ont une activité chimiotactique [214]. L'activation du système des kinines en cas de lésions vasculaires entraîne la formation de bradykinine qui augmente la perméabilité vasculaire et est responsable de la douleur. Les lésions vasculaires entraînent également l'activation du système de la coagulation menant à la formation de thrombus fibrineux.

3-2-2- Les différents phénotypes d'activation du macrophage

Les macrophages sont caractérisés par une incroyable diversité et plasticité. Selon la distribution tissulaire et les signaux du microenvironnement, les macrophages ont la capacité de modifier leur phénotype. On distingue 2 types d'activation du macrophage : l'activation dite « classique » et par opposition, l'activation dite « alternative ». Ces voies d'activation vont conduire à des macrophages phénotypiquement différents reflétant les réponses Th1/Th2 : les macrophages M1, pro-inflammatoires, et les macrophages M2, anti-inflammatoires.

L'activation dite « classique » du macrophage conduit à un phénotype M1, impliqué dans l'initiation et le maintien de l'inflammation et qui joue un rôle majeur dans les défenses anti-microbiennes. En revanche, les macrophages M2, très hétérogènes, ont des fonctions de régulation et de réparation tissulaire et sont impliqués dans la résolution de l'inflammation et le maintien de l'homéostasie. Cependant, il est important de noter que les stades d'activation M1 et M2 apparaissent comme les extrémités d'un continuum de forme d'activation du macrophage avec un panel d'expression de récepteurs et de fonctions variant selon le microenvironnement [167,175,215] (Figure 22).

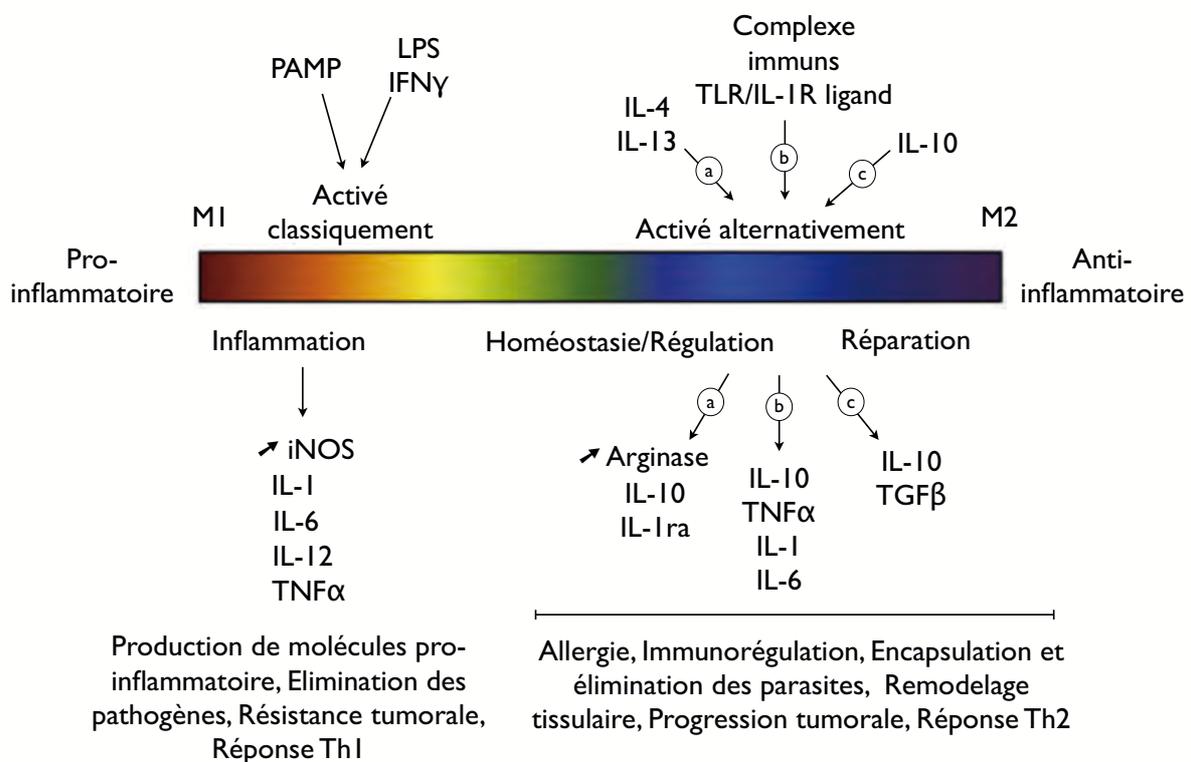


Figure 22 : Spectre d'activation et de polarisation des macrophages. D'après [175,215].
Selon les signaux du microenvironnement, les macrophages vont se polariser dans différents états. Ces états de polarisation sont impliqués dans différents processus biologiques nécessitant une expression génique et une production cytokinique spécifiques.

3-3-3 Synthèse des cytokines et des chimiokines

La réponse commune des macrophages à une infection bactérienne induit principalement une augmentation de l'expression des gènes de polarisation M1 ayant une forte activité bactéricide et microbicide [168]. Cette polarisation vers le phénotype M1 est consécutive à l'engagement des PRR par les PAMPs, ce qui conduit à la production et

sécrétion de cytokines inflammatoires telles que le $\text{TNF}\alpha$. Il a été montré que cette cytokine renforce la polarisation M1 par un effet autocrine et paracrine [216]. Cet effet est également amplifié par la production d' $\text{IFN}\gamma$ par les cellules telles que les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les Natural Killer (NK) [217].

L'organisation de la réponse inflammatoire est ainsi assurée par la sécrétion d'un panel de cytokines pro-inflammatoires caractéristiques du phénotype M1, incluant l'IL-12, le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-6 et l'IL-1 β et la production de chimiokines telles que CCL2 (MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1), CCL5 (RANTES : Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) et CXCL8 (Mantovani, 2004, trends immuno). Les macrophages sont aussi les principaux producteurs des chimiokines CXCL1 et CXCL2 [218]. Ainsi, en plus de leur activité microbicide directe, ces cellules induisent le recrutement d'autres cellules de l'immunité innée et favorisent une réponse Th1 et Th17, l'ensemble ayant pour but de contrôler l'infection (Figure 23). La régulation de l'inflammation sera alors ensuite assurée par les macrophages de phénotype M2 qui interviennent dans la résolution de l'infection, que nous détaillerons plus tard.

Les cytokines inflammatoires produites par les macrophages activés lors d'une infection bactérienne peuvent avoir des effets autocrines ou paracrines. L'IL-12 initie la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 [219]. Le $\text{TNF}\alpha$ induit la production de chimiokines par les macrophages et les cellules endothéliales [220]. L'IL-1 β favorise l'activation des lymphocytes T, facilite la prolifération des lymphocytes B, stimule le burst oxydatif et amplifie la réponse inflammatoire [221]. L'IL-6 stimule la phagocytose et le burst oxydatif des phagocytes, favorise la synthèse de la matrice extracellulaire, induit la sécrétion de CCL2 pour recruter les monocytes et favorise l'activation des lymphocytes B et la production d'anticorps [222]. Le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 β et l'IL-6 augmentent aussi l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium.

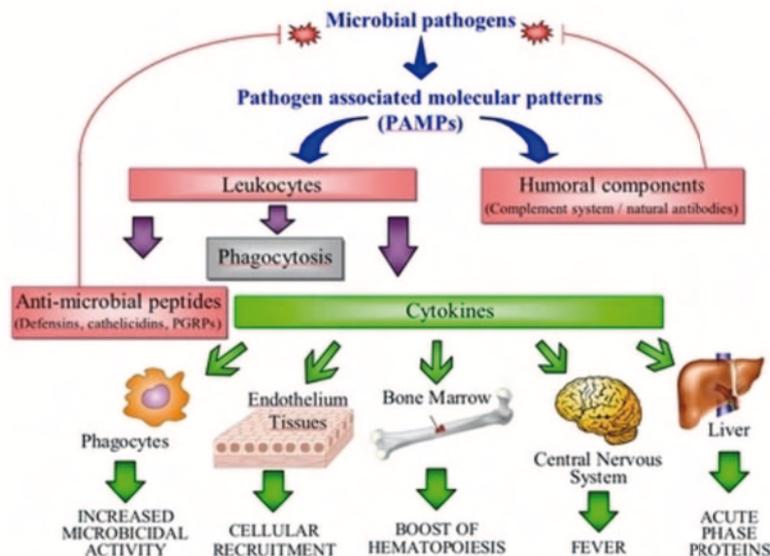


Figure 23 : Bilan de la réponse inflammatoire. [223]

Lors de l'entrée de pathogènes dans l'organisme, les PAMPs vont être détectés par les leucocytes et les composants humoraux, ces derniers ayant une activité bactéricide direct sur le pathogène. La reconnaissance des PAMPs par les leucocytes va déclencher plusieurs mécanismes: la sécrétion de peptides antimicrobiens, la phagocytose et la sécrétion de cytokines. Les cytokines produites vont entrainer de nombreux processus biologiques détaillés dans la figure.

IV- Le recrutement leucocytaire

Sous l'action des chimiokines, les leucocytes adhèrent à l'endothélium grâce aux molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales. On distingue 4 phases d'extravasation des leucocytes [224] :

- le « rolling » ou roulement grâce aux sélectines
- l'arrêt par adhésion forte à l'endothélium via les intégrines
- la diapédèse des leucocytes, qui est le passage à travers les cellules endothéliales par transmigration paracellulaire ou transcellulaire
- la migration intratissulaire vers le site infectieux dépendant des gradients de concentration de chimiokines fixées aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire.

Les molécules d'adhésion diffèrent selon la nature du leucocyte. L'ensemble des interactions entre leucocytes et cellules endothéliales, selon le stade d'extravasation des leucocytes, est indiqué dans la figure 24 :

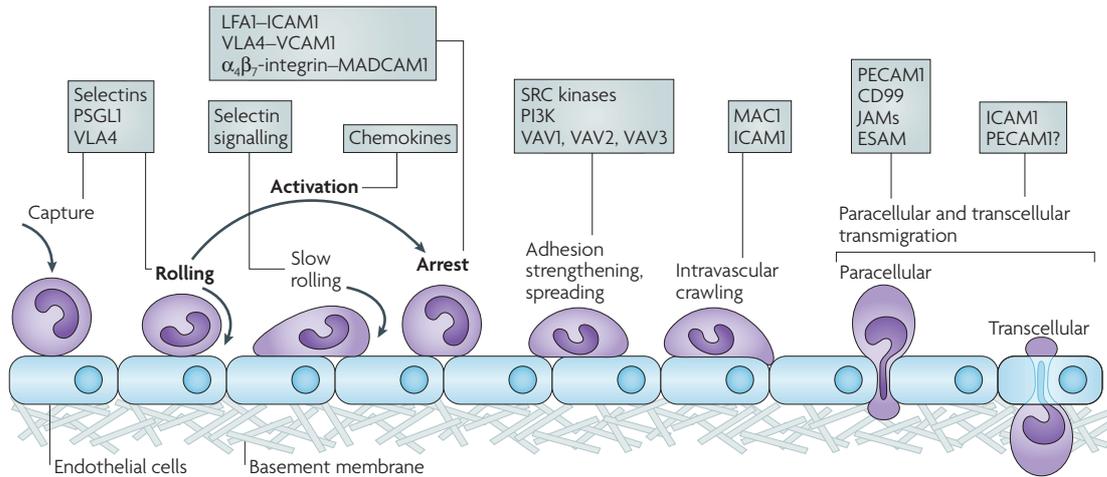


Figure 24 : La cascade d'adhésion des leucocytes. [224]

Les chimiokines sont les molécules clés qui contrôlent le recrutement cellulaire. Elles permettent une adhésion forte des phagocytes à l'endothélium et le recrutement des leucocytes en créant un gradient de concentration de molécules fixées à la matrice extracellulaire. Elles induisent non seulement un recrutement efficace des cellules de l'immunité qui circulent dans les vaisseaux irriguant les tissus lésés, mais aussi un contrôle du type de leucocyte recruté selon les agents chimiotactiques libérés. Le recrutement des différents leucocytes est ainsi séquentiellement régulé dans le temps. Dans un premiers temps, les chimiokines CXCL8, CXCL1 et CXCL2 induisent le recrutement des granulocytes neutrophiles. Cette action est renforcée par la libération de G-CSF, qui est le facteur de croissance des neutrophiles dans la moelle osseuse, et qui induit la libération de neutrophiles dans le courant circulatoire [225–227]. Dans un second temps, la production des chimiokines CCL2 et CCL5 augmente, permettant le recrutement des monocytes.

1- Les neutrophiles

Lors d'une infection, sous l'action des chimiokines telles que CXCL8 ou CXCL1 et CXCL2, les premières cellules à être recrutées au site infectieux sont les granulocytes neutrophiles [228]. Les neutrophiles sont les leucocytes les plus nombreux du sang et sont rapidement mobilisables. Une fois au site infectieux, les neutrophiles activés phagocytent et éliminent les bactéries par la libération de produits antimicrobiens contenus dans les granules ou générés par activation métabolique, comme la NADPH oxydase [229]. Les neutrophiles

possèdent trois types de granules dans leur cytoplasme : les granules azurophiles, les granules spécifiques et les petits granules de stockage. Ces granules contiennent de nombreux facteurs antimicrobiens, protéases et enzymes, telles que le lysosyme, des défensines, des élastases et des cathepsines. L'activité bactéricide des granules, comme pour les macrophages, permet la destruction des pathogènes phagocytés (Figure 25). Les neutrophiles sont ainsi des cellules clés de la lutte antibactérienne à travers leur forte capacité de phagocytose et d'élimination intracellulaire des pathogènes.

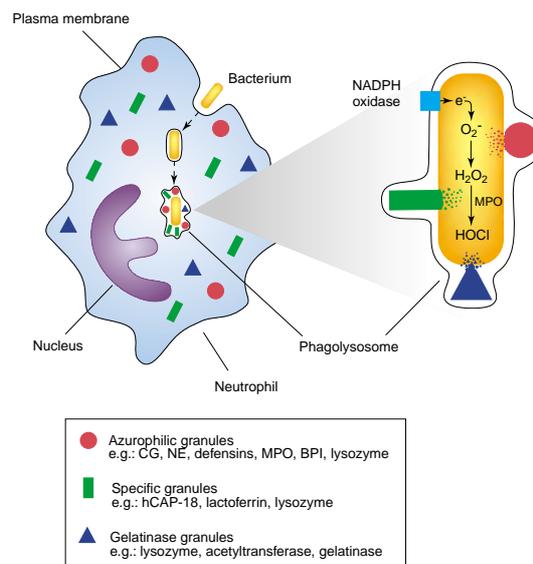


Figure 25 : Présentation schématique des mécanismes dépendants et indépendants de l'oxygène lors de la phagocytose des bactéries par les neutrophiles [210]. Les mécanismes indépendants de l'oxygène englobent le contenu des trois types de granules des neutrophiles : les granules azurophiles spécifiques et gélatinases qui contiennent des protéases, des protéines antimicrobiennes et des peptides caractéristiques et des enzymes. Les lysosomes, en perturbant les surfaces bactériennes anioniques, rendent la bactérie plus perméable, alors que l'élastase neutrophilique (NE) dégradent les facteurs de virulence. Les mécanismes dépendants de l'oxygène reposent sur le complexe de la NADPH oxydase qui s'assemble à la membrane phagosomale et produit du O_2^- , qui est rapidement convertit en peroxyde d'hydrogène. A son tour, la myéloperoxydase, un composant des granules azurophiles, génère du HOCl à partir du peroxyde d'hydrogène.

2- Les monocytes

Les monocytes inflammatoires sont recrutés dans un second temps. Ils sont attirés par d'autres chimiokines telles que CCL2 qui est produite de manière retardée par rapport à CXCL8, mais qui persiste plusieurs jours [181,230]. Les monocytes, ainsi recrutés au site

infectieux, se différencient en macrophages qui complètent l'activité phagocytaire des neutrophiles. Ils sont également capables de phagocyter les neutrophiles sénescents et ont la capacité de présenter les antigènes aux lymphocytes T [182]. Les monocytes peuvent aussi se différencier en cellules dendritiques qui captent les antigènes et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux lymphocytes T et mettre en route la réponse immunitaire adaptative.

V- La régulation de l'inflammation

La résolution de l'inflammation est un processus complexe nécessitant la coopération des cellules recrutées au site inflammatoire. Même si le phénotype pro-inflammatoire (M1) des macrophages est nécessaire pour combattre l'infection, la persistance, sans contrôle, du processus inflammatoire devient néfaste et peut induire des dommages tissulaires importants [168,231–234]. En effet, une inflammation excessive ne permet pas de conservée l'intégrité tissulaire : la production continue de cytokines inflammatoires et de chimiokines par les macrophages M1 entraîne un recrutement leucocytaire aberrant perpétuant l'inflammation. Dans ce contexte, les monocytes recrutés se polarisent vers un phénotype M1 entraînant la libération de radicaux hydroxyles et les neutrophiles recrutés vont avoir une dégranulation non contrôlée ou vont mourir par nécrose. L'ensemble de ces facteurs va alors directement causer des dommages tissulaires [234,235]. Les macrophages M1 semblent ainsi participer à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques ou autoimmunes [233]. Lors d'une infection résolutive, ces processus sont contrebalancés par différents médiateurs permettant la résolution de l'inflammation, tels que des glucocorticoïdes, des lipoxines, des résolvines et des prostaglandines [236]. Les glucocorticoïdes favorisent la phagocytose et l'apoptose des leucocytes [237]. Les lipoxines inhibent le recrutement des neutrophiles, et stimulent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques [238]. Les résolvines régulent l'expression des cytokines, inhibent un recrutement aberrant de neutrophiles et stimule leur apoptose [239]. Les prostaglandines inhibent l'activation de NfκB [214]. L'ensemble de ces médiateurs va ainsi favoriser des processus non inflammatoires permettant la résolution de l'inflammation et le retour à l'homéostasie.

Les neutrophiles apoptotiques représentent un important stimulus anti-inflammatoire pour les cellules impliquées dans la résolution de l'inflammation [240–242]. L'exposition des résidus phosphatidylsérine (PS) sur la membrane des neutrophiles apoptotiques permet une

meilleure reconnaissance par les macrophages [243]. L'interaction des PS avec les récepteurs scavengers sur les macrophages initie la phagocytose et l'élimination des corps apoptotiques [244]. Cette clairance des corps apoptotiques est nécessaire afin d'empêcher le passage des neutrophiles en nécrose secondaire. Elle permet ainsi d'éviter la lyse cellulaire qui a pour conséquence la libération des composants intracellulaires toxiques.

Les macrophages ont ainsi une fonction cruciale dans le milieu inflammatoire en éliminant les cellules apoptotiques par un processus phagocytaire spécialisé, appelé efferocytose, qui permet de limiter les dommages tissulaires [245]. Cette élimination des cellules apoptotiques par les macrophages ne provoque pas la libération de cytokines pro-inflammatoires, mais modifie le profil transcriptionnel des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire, de type M2. Les cellules apoptotiques jouent ainsi un rôle important dans la résolution de l'inflammation en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF α et en stimulant la libération de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF β et l'IL-10 [240,241,245]. En effet, la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages stimule la production endogène d'IL-4, qui en agissant de manière autocrine sur les macrophages et en combinaison avec l'IL-13, induit une polarisation M2 des macrophages [245] (Figure 26). Les macrophages M2 sont caractérisés par l'expression du récepteur mannose, des récepteurs scavengers et la production de facteurs angiogéniques [167,186,246,247]. Cette activation alternative des macrophages induit la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF β qui sont associées à la résolution de la réponse inflammatoire et qui favorisent la réparation tissulaire. Ainsi, l'équilibre entre cytokines pro et anti-inflammatoires est central dans l'efficacité de la réponse inflammatoire. Une fois que la phagocytose est complète, les macrophages quittent le site enflammé via le drainage lymphatique ou meurt localement par apoptose. Si tous ces processus sont respectés, l'inflammation aiguë, qui a permis l'élimination du micro-organisme, est résolue sans causer de dommages tissulaires excessifs. Le tissu revient alors à sa physiologie normale avec retour de l'homéostasie tissulaire.

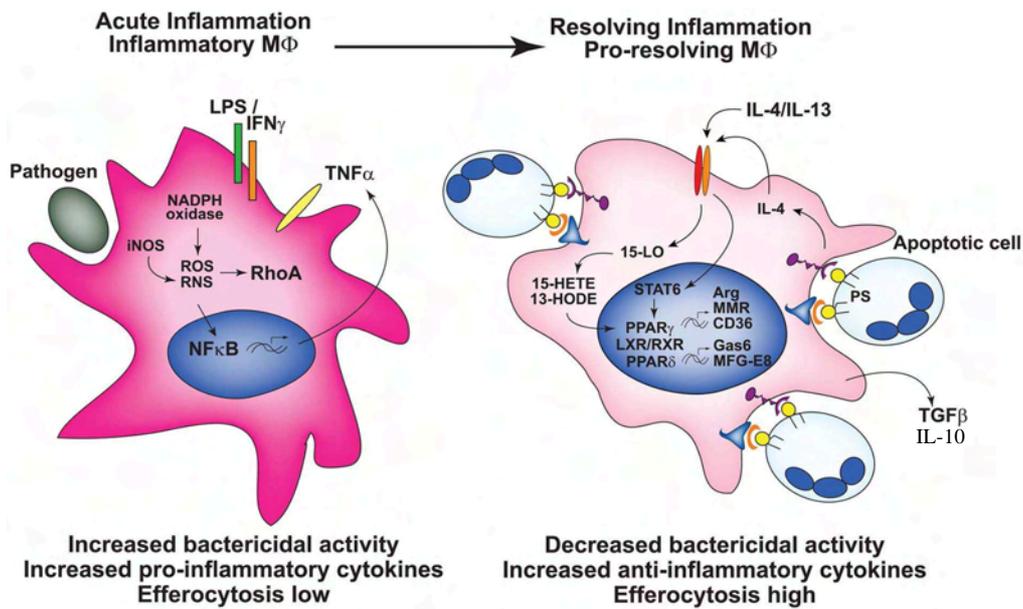


Figure 26 : Activation et transition du macrophage inflammatoire en macrophage résolutif au cours de la phase aiguë de l'inflammation. Adapté de [245].

A gauche : Les macrophages inflammatoires, générés par des stimuli tels que LPS+IFN γ , ont une activité bactéricide élevée, produisent des médiateurs pro-inflammatoires, et ont une faible activité d'efferocytose. *A droite :* Après activation des récepteurs nucléaires, les macrophages pro-résolutifs ou de la phase de résolution sont programmés pour une efferocytose élevée, avec une augmentation de l'expression des récepteurs et des molécules de pontage requis pour la reconnaissance des cellules apoptotiques et la production de cytokines anti-inflammatoires. *In vivo*, au cours de la phase aiguë de l'inflammation, les macrophages inflammatoires se transforment en macrophage résolutifs.

C- Spécificité d'interaction entre *S. aureus* et immunité innée

I- Rôle de l'immunité innée

Il existe, chez les individus immunocompétents, une grande variabilité de sensibilité à l'infection par *S. aureus*. Les mécanismes qui gouvernent ces différences de sensibilité sont encore mal compris. Aucun facteur prédisposant à l'infection n'a pu être clairement identifié à ce jour [122,136,137]. Les différences de réponses immunitaires mises en place, qui pourraient expliquer cette différence, n'ont pas encore été clairement caractérisées. Les études réalisées en modèle murin ont cependant permis de définir plusieurs facteurs immunitaires clefs impliqués dans la protection contre *S. aureus*. Il est maintenant admis que les souris C57BL/6 sont naturellement résistantes à l'infection i.v. par *S. aureus*. La déplétion des lymphocytes T, B et des Natural Killer (NK) dans ces souris ne modifie pas le profil de l'infection : les souris C57BL/6 Rag2-IL2R γ ^{-/-} montrent un contrôle de la charge bactérienne et une survie similaire aux souris C57BL/6 sauvages [248]. Dans une autre étude, il a été montré que la déplétion des neutrophiles et des macrophages augmente la sensibilité des animaux à l'infection i.v. par *S. aureus*, mettant en évidence le rôle fondamental de ces cellules dans le contrôle de ces infections [249]. Dans un modèle d'infection intradermique, la déplétion des neutrophiles et des cellules monocytaires par injection d'anticorps spécifiques est associée à une augmentation de la charge bactérienne et au développement de lésions ulcéraives [250]. Le contrôle de l'infection par *S. aureus* dépend ainsi principalement des défenses mises en place par les cellules de l'immunité innée. Bien que les neutrophiles et les macrophages jouent un rôle important dans le contrôle des infections staphylococciques, les rôles respectifs de chacune de ces sous-populations restent mal connus. La déplétion spécifique des populations monocytaires entraîne une augmentation de la mortalité suite à l'infection par *S. aureus*, associée à une charge bactérienne plus élevée, comparé aux souris sauvages [251]. De même, l'injection de macrophages dans des souris dépourvues de neutrophiles et macrophages restaure la survie de ces souris à un taux proche de 100% [249]. Ces études suggèrent que les monocytes et les macrophages sont des acteurs majeurs dans le contrôle de l'infection. Les neutrophiles semblent aussi avoir un rôle important dans le contrôle des infections par *S. aureus*. L'injection de neutrophiles dans des souris dépourvues de neutrophiles et macrophages augmente la survie des souris à un taux d'environ 25% [249]. En parallèle, le rôle crucial des neutrophiles est aussi mis en exergue par la grande sensibilité des patients neutropéniques à l'infection par *S. aureus* [252]. L'implication de ces 2 populations cellulaires de l'immunité innée dans le contrôle des infections staphylococciques est donc incontestable. Nous allons donc nous attacher à décrire l'état actuel des

connaissances sur les interactions spécifiques entre les cellules de l'immunité innée et *S. aureus*.

II- Les macrophages et *S. aureus*

1- La reconnaissance de *S. aureus* par les macrophages

La reconnaissance rapide de *S. aureus* lors de son entrée dans l'organisme induit une réponse très précoce permettant de limiter la dissémination de la bactérie et le développement d'une maladie infectieuse.

1-1- La reconnaissance des ligands

S. aureus possède de nombreux PAMPs reconnus par les cellules de l'immunité dont les principaux sont les lipoprotéines, l'acide lipoteichoïque (LTA) et le peptidoglycane (PGN). Les récepteurs TLR2 et NOD2 jouent un rôle majeur dans la reconnaissance de ces composants et dans la mise en place des défenses de l'hôte [253].

Parmi les composants de paroi de *S. aureus*, le LTA et les lipoprotéines sont les ligands prédominants de TLR2. La liaison du LTA et des lipoprotéines au TLR2 entraîne son hétérodimérisation avec le TLR1 ou le TLR6 selon que les lipoprotéines soient triacylées ou diacylées, respectivement [254]. De plus, TLR2 est capable d'agir avec d'autres co-récepteurs facilitant la reconnaissance des PAMPs. Plusieurs études ont montré, dans des monocytes humains, que la reconnaissance du LTA est facilitée par les corécepteurs CD14 et CD36 associés au TLR2 [255–257]. Le CD36 est un récepteur scavenger qui agit en combinaison avec l'hétérodimère TLR2/TLR6 pour améliorer la phagocytose et la production de cytokines en réponse à *S. aureus* et à ses composants de paroi [254,257]. Par ailleurs, les lipoprotéines sont aussi des composants importants de *S. aureus*, capables d'activer NfκB [258,259].

Les mécanismes de reconnaissance du PGN restent encore assez controversés. Une première étude montre que les macrophages de souris déficientes en TLR2 ne sont plus capables de répondre au PGN de *S. aureus* [40]. Une autre étude montre cependant que des monomères de PGN, issus de préparations de PGN hautement purifié, n'induisent pas de signaux dépendants de TLR2 dans des cellules murines et humaines, contrairement aux lipoprotéines et au LTA [14]. Il semblerait donc que l'activation du TLR2 par le PGN soit

dépendante des lipoprotéines contenues dans la structure macromoléculaire des polymères de PGN.

En effet, le PGN serait plutôt un ligand naturel de NOD2 [14]. Le récepteur NOD2 reconnaît la structure minimale du PGN : le muramyl dipeptide (MDP) [14,260]. Des cellules murines déficientes en NOD2 n'induisent pas la sécrétion de cytokines observée dans les cellules normales suite à une stimulation avec des monomères de PGN [14]. De même, la déficience en NOD2 inhibe la réponse au MDP comparée aux cellules murines normales [261].

Le LTA et le PGN peuvent aussi être reconnus par les récepteurs lectines liant le mannose sur les macrophages [262,263]. Cette reconnaissance induit l'activation de la voie des lectines au cours de laquelle la sous-unité C3b du complément se lie à la surface de *S. aureus* et est ensuite reconnue par le CR1 des phagocytes. Le PGN peut aussi activer directement le système du complément par la voie alterne [264]. De plus, l'ADN de *S. aureus* peut être reconnu par les récepteurs TLR7 et TLR9 suite à l'internalisation de la bactérie [253].

Ainsi, en plus de la reconnaissance directe de la bactérie par les TLR et les NLR, les macrophages ont aussi la capacité de reconnaître la bactérie via les opsonines, et même parfois par une combinaison des 2 modes de reconnaissance [257,265]. De nombreux mécanismes, parfois redondants, permettent ainsi la reconnaissance de la bactérie (Figure 27).

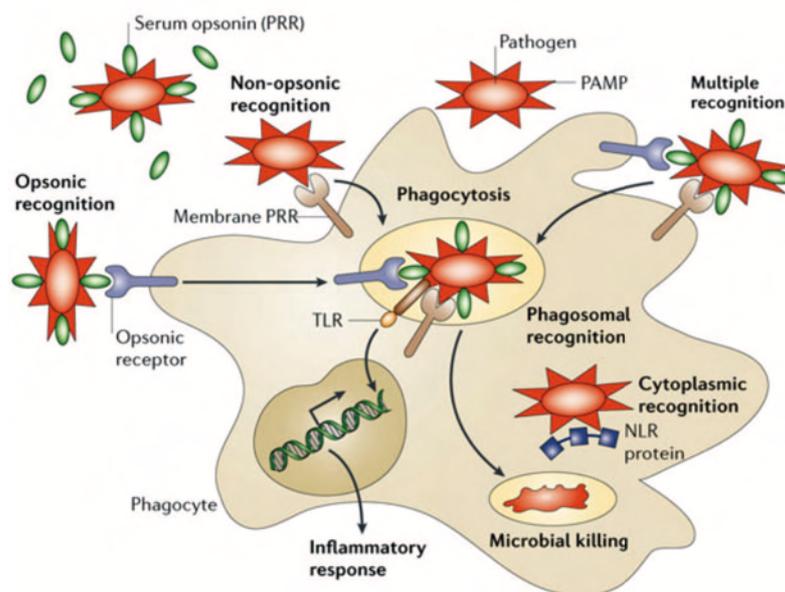


Figure 27 : Méthodes de reconnaissance de *S. aureus* par les macrophages. Adapté de [266].

1-2- Les voies de signalisation

La reconnaissance de ces ligands par les récepteurs cellulaires conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation permettant l'induction d'une réponse inflammatoire. L'engagement et l'activation de TLR2 par des ligands staphylococciques entraînent le recrutement de TIRAP (TIR domain-containing adapter protein) qui lie le TLR à Myd88 (Myeloid differentiation primary response protein 88) [253]. Myd88 interagit ensuite avec les sérine-thréonines kinases de la famille IRAK (IL-1 receptor associated kinase) ou active la PI3K (phosphatidyl inositol-3- kinase) pouvant conduire à l'activation du facteur de transcription NFκB (nuclear transcription factor) et à l'activation de la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated kinase) [253,267,268]. L'activation de la voie des MAPK conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1.

L'activation de NOD2 conduit à son oligomérisation et au recrutement de l'adaptateur RIP2 (Receptor-interacting protein 2) [202]. Cette association entraîne l'activation de plusieurs cascades de signalisation aboutissant à l'activation des facteurs de transcription NF-κB et AP-1. La reconnaissance de *S. aureus* par les récepteurs NOD peut aussi conduire à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Interferon regulatory factor) permettant l'expression des gènes de l'IFNα et β [202,269]. De même, la reconnaissance de l'ADN de *S. aureus* par les récepteurs TLR7 et TLR9 conduit à l'activation du facteur de transcription IRF7 via les voies de signalisation dépendantes de Myd88 [253].

L'activation du récepteur scavenger CD36 mène à l'activation de la voie PI3K conduisant à la polymérisation de l'actine et au remodelage cellulaire permettant la phagocytose, mais aussi à l'activation du facteur de transcription NfκB [267].

La reconnaissance par les récepteurs lectines liant le mannose implique principalement l'activation de la PKC (Protein kinase C) qui semble conduire à la phagocytose et à l'activation de NFκB [270].

Les récepteurs au complément C5a utilisent les voies de signalisation PKC et PI3K menant à l'initiation de la voie des MAPK [271].

L'activation du récepteur CR1 conduit à l'activation de la PKC [271].

L'activation de NF-κB, AP-1 et IRF permet la transcription et la synthèse d'une grande variété de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui participent à la réponse inflammatoire et au recrutement leucocytaire consécutif à l'arrivée de *S. aureus*.

1-3- Eléments essentiels à la reconnaissance de *S. aureus*

La reconnaissance de *S. aureus* est cruciale dans la mise en place de la réponse inflammatoire et participe ainsi au contrôle de l'infection. L'absence de TLR2 a été associée à l'augmentation de la sensibilité de l'hôte à l'infection par voie i.v. ou i.p. [272,273]. En effet, ces études montrent que des souris déficientes en TLR2 ont une mortalité fortement augmentée. De même, une déficience d'un composant des voies de signalisation de TLR2 augmente la sensibilité de l'hôte à l'infection par *S. aureus*. Ainsi, des souris Myd88 *-/-* ont une mortalité plus importante que les souris sauvages suite à l'infection i.v. par *S. aureus* [272]. Ces déficiences pour TLR2 ou Myd88 sont associées à une nette diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages [265,272]. La charge bactérienne permet aussi de rendre compte de l'importance de cette voie de signalisation lors d'infection i.v. par *S. aureus* : des souris Myd88 $-/-$ ou IRAK1 $-/-$ montrent des charges bactériennes plus élevées dans le sang et les reins comparées aux souris sauvages [272,274]. Wardenburg et al (2006) ont montré que des souches de *S. aureus* dépourvues de lipoprotéines échappent à la reconnaissance par les cellules de l'immunité et sont responsables d'infections létales [275]. La reconnaissance des lipoprotéines par TLR2 joue ainsi un rôle crucial dans les mécanismes de défense de l'hôte. En transmettant le signal pro-inflammatoire en réponse aux composants de *S. aureus*, TLR2 participe au contrôle précoce de la dissémination de la bactérie.

En plus de la signalisation initiée par les TLRs, les récepteurs NOD sont aussi importants pour la réactivité des macrophages vis à vis de *S. aureus* [265,273]. Des souris déficientes pour NOD2 présentent un défaut de clairance bactérienne après une infection sous-cutanée ou intrapéritonéale par *S. aureus*, associée à des lésions ulcéraives exacerbées [273,276].

L'activation des récepteurs TLR et NLR par les composants de surface de *S. aureus* participe également au recrutement leucocytaire associé à l'infection [262]. Il a été montré qu'en réponse au PGN ou à *S. aureus*, le recrutement de neutrophiles dans la cavité péritonéale est partiellement dépendant de TLR2 [277]. De même, le LTA et le PGN agissent de manière synergique pour induire le recrutement de neutrophiles dans les poumons [42]. Le PGN peut aussi entraîner la formation du C5a permettant le recrutement additionnel de leucocytes au site infectieux [264].

La reconnaissance de ces ligands bactériens par les macrophages induit l'activation de facteurs de transcription et la synthèse de cytokines impliquées dans l'initiation de la réponse

inflammatoire. Il ne faut cependant pas exclure que d'autres mécanismes entrent en jeu dans l'induction de la réponse inflammatoire contre *S. aureus* (Figure 28). Bien que TLR2 et NOD2 soient des acteurs majeurs dans la reconnaissance de *S. aureus*, cette bactérie possède aussi de nombreuses toxines ciblant les macrophages et capables de moduler la mise en place des réponses de l'hôte. Le rôle de ces toxines sera détaillé plus loin dans le manuscrit.

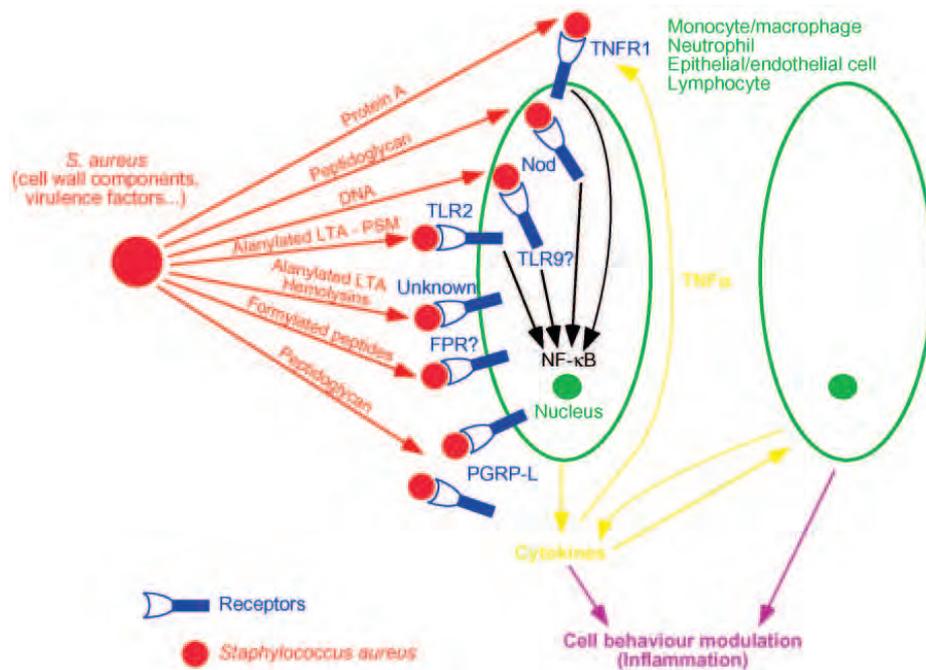


Figure 28 : Interaction des composants staphylococciques avec les récepteurs des cellules immunitaires permettant d'induire une réponse immunitaire. [43]

(fpr : formylated peptide receptor ; PGRP-L : peptidoglycan recognition protein L)

2- la phagocytose

La phagocytose de *S. aureus* induite par la liaison du CD36, un récepteur scavenger de classe B, joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection [278]. En effet, chez des souris déficientes en CD36, on observe une bactériémie sévère et la formation d'abcès tissulaires, associées à un défaut de réponse cytokinique et de phagocytose. Ces souris ont une survie diminuée suite à l'infection i.v. par *S. aureus* comparées aux souris sauvages. En revanche, le récepteur scavenger de classe A ne semble pas impliqué dans la phagocytose de *S. aureus* [279]. Par ailleurs, la phagocytose de *S. aureus* et la dégradation de la paroi cellulaire par le lysozyme sont fonctionnellement couplées à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la sécrétion d'IL-1 β qui joue un rôle crucial dans les infections par *S. aureus* [280]. L'activation

de l'inflammasome NLRP3 par *S. aureus* conduit à l'activation de la caspase-1 et entraîne son accumulation dans le phagosome. Ce mécanisme contribue à l'acidification du phagosome en régulant la NADPH oxydase [281]. La phagocytose et la détection intracellulaire contribuent ainsi à l'initiation de la réponse contre *S. aureus* [265,278]. En effet, l'inhibition de la phagocytose par la cytochalasine D dans des macrophages péritonéaux murins TLR2-/- diminue la sécrétion des cytokines TNF α , IL-10 et IL-6 suite à une stimulation par *S. aureus* tuée par la chaleur, comparés aux macrophages TLR2-/- sans cytochalasine D [265]. *S. aureus* est également capable de former des biofilms qui limitent la phagocytose et atténuent les réponses pro-inflammatoires de l'hôte, permettant sa persistance [282]. *S. aureus* possède d'autres nombreuses stratégies pour inhiber sa phagocytose qui seront détaillées plus bas.

3- La réponse inflammatoire

La reconnaissance des différents ligands de *S. aureus* mène à la production d'une cascade de cytokines, de chimiokines et d'alarmines permettant l'activation, la mobilisation et le recrutement des cellules inflammatoires.

Les réponses de l'hôte lors d'une infection par *S. aureus* ou suite à une stimulation par ses composants impliquent la sécrétion d'une grande variété de cytokines pro-inflammatoires. Quelque soit le site d'inoculation, sous-cutané [283–287], intraveineux [248,251,288], intra-péritonéal [273,289,290] ou intranasal [48], on observe une augmentation de l'expression de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α , de chimiokines telles que CXCL1, CXCL2 (ou IL-8) et de facteurs de croissance tels que G-CSF [43,262]. Ces médiateurs pro-inflammatoires sont les acteurs de l'orchestration de la réponse à l'infection.

Le TNF α améliore l'activité bactéricide des neutrophiles permettant l'élimination de *S. aureus* [291]. Il permet d'augmenter les récepteurs CR3 et CR4 favorisant la reconnaissance de la bactérie opsonisée et augmente la production de HOCl par les neutrophiles [291,292]. L'injection d'anticorps anti-TNF α entraîne la mort des souris suite à une infection i.v. par *S. aureus* normalement non létale dans les souris non traitées, suggérant un rôle protecteur du TNF α [293].

Dans un modèle de kératite induite par *S. aureus*, des souris déficientes en IL-6 développent une pathologie sévère et une augmentation du nombre de neutrophiles et de bactéries [294]. Cette étude suggère ainsi un rôle régulateur important de l'IL-6 dans la modulation des réponses inflammatoires excessives et dans le contrôle de la prolifération bactérienne.

Cependant, si ces 2 cytokines sont sécrétées en quantité trop élevée, elles peuvent participer à une issue fatale dans les infections à *S. aureus* [293,295].

Le G-CSF favorise la production des neutrophiles, permet de mobiliser les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse vers le sang et prolonge la survie des neutrophiles [296]. Le traitement par du G-CSF semble améliorer la résolution des infections des plaies à *S. aureus* en favorisant le recrutement neutrophilique dans des souris âgées qui présentent une faible accumulation de neutrophiles comparées aux souris jeunes plus résistantes [297]. Ces souris traitées au G-CSF présentent une charge bactérienne plus faible et une diminution de la taille des plaies comparées aux souris non traitées.

Il semblerait que les principaux producteurs de ces médiateurs pro-inflammatoires soient les macrophages [48,96,257,265,275,284,298,299]. En effet, Abtin et al. (2014) montrent *in vivo*, dans un modèle d'infection sous-cutanée par *S. aureus*, que les macrophages sont la source majeure des chimiokines CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL4 et de la cytokine IL-1 β impliquées directement ou indirectement dans le recrutement des leucocytes [284]. De même, Perret et al. (2012) montrent que l'activation du macrophage alvéolaire humains par des toxines de *S. aureus* conduit à la libération d'IL-1 β [96]. Celle-ci stimule la production par les cellules épithéliales d'IL-8 et de CCL2, impliquées dans le recrutement leucocytaire. De plus, plusieurs études ont montré que l'IL-1 β , sécrétée initialement par les macrophages, est une cytokine pro-inflammatoire centrale dans l'initiation de la réponse contre *S. aureus* et indirectement dans le recrutement neutrophilique [96,274,287,299–301]. Ces résultats démontrent ainsi que les macrophages activés sont les orchestrateurs clés de la réponse inflammatoire.

En plus de l'ensemble de ces cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, les réponses de l'hôte à l'infection par *S. aureus* impliquent la production d'alarmines. En effet, dans un modèle murin d'infection intra-articulaire, l'injection de *S. aureus* déclenche l'expression des défensines β (MBD), telles que MBD-2, -3 et -4 [302]. Les analogues humains HBD-1, -2 et -3 sont sécrétés par les kératinocytes humains stimulés par *S. aureus* [303]. HBD-1 et -2 semblent moins bactéricides que HBD-3 contre *S. aureus* [303,304]. De même, les défensines α et les cathélicidines LL-37 et ALL-38 humaines ont une activité antimicrobienne sur *S. aureus* [304]. De plus, la stimulation avec des toxines de *S. aureus* induit la production de l'alarmine HMGB1 (High motility group box 1) dans des lignées cellulaires humaines et dans les macrophages péritonéaux murins [298]. Cette alarmine a une activité chimiotactique sur les leucocytes. Ces alarmines produites lors de l'infection par *S. aureus* semblent ainsi participer aux défenses de l'hôte.

Ainsi, lors des étapes précoces de l'infection par *S. aureus*, les macrophages activés libèrent de nombreuses alarmines, des cytokines telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β , mais aussi de nombreuses chimiokines CXC et CC permettant le recrutement des leucocytes qui est amplifié par le G-CSF qui stimulent les cellules précurseurs de la moelle osseuse [182,228,230,262,305].

III- Le recrutement leucocytaire

1- Les neutrophiles

Parmi les acteurs clés de l'immunité innée, les neutrophiles semblent également jouer un rôle fondamental dans le contrôle des infections à *S. aureus* [306]. Les neutrophiles ont une fonction primordiale dans l'élimination de la bactérie. Ils possèdent en effet une forte activité de phagocytose couplée à la libération de nombreux peptides anti-microbiens dans les vacuoles phagocytaires. Le rôle des neutrophiles dans le contrôle de *S. aureus* est mis en évidence chez les patients souffrant d'une neutropénie chronique qui présentent une plus grande sensibilité à l'infection [252]. De même, les maladies qui impactent la fonction normale des PMN, telles que la maladie granulomateuse chronique et le déficit d'adhésion des leucocytes, prédisposent l'individu à de sévères infections par *S. aureus* [307,308].

En effet, suite à une stimulation par *S. aureus* ou ses composés, les neutrophiles sont rapidement recrutés au site infectieux via les chimiokines produites par les cellules résidentes [48,248,262,284–287,300,309–311]. La reconnaissance de *S. aureus* par les neutrophiles recrutés se fait principalement par le biais des opsonines. Cette reconnaissance permet la phagocytose rapide et l'élimination de la bactérie [291]. Les récepteurs majoritairement impliqués sont donc les CR et FcR. Cependant, la signalisation via TLR2, bien qu'elle n'induisse pas la phagocytose, est aussi nécessaire pour une élimination efficace de *S. aureus* car elle entraîne l'augmentation de l'activité NADPH oxydase [312]. La stimulation des neutrophiles murins et humains par *S. aureus* ou ses composants induit la libération de chimiokines et cytokines telles que IL-1 β , TNF α , IL6, CXCL1, CXCL2 (ou IL8), CCL2 et CCL3 [286,313,314].

Plusieurs études dans des modèles animaux confirment l'importance des neutrophiles dans les infections par *S. aureus* [250,288]. La déplétion totale ou l'inhibition du recrutement des neutrophiles augmente fortement la mortalité des animaux infectés par voie intraveineuse ou intra-péritonéale [248,310]. Cependant, même si il est classiquement admis que les

neutrophiles jouent un rôle prépondérant lors d'une infection par *S. aureus*, leur contribution reste paradoxale. Une déplétion partielle des neutrophiles ou une altération de leur recrutement améliore à la fois la clairance bactérienne et la survie des animaux infectés, que l'infection soit par voie intra-péritonéale ou cutanée [285,310]. Par ailleurs, une augmentation du recrutement des neutrophiles augmente la sensibilité à l'infection par voie i.p. ou cutanée par *S. aureus* [285,310]. En effet, les neutrophiles peuvent aussi causer des dommages tissulaires en libérant les produits toxiques contenus dans leurs granules, et contribuer à l'inflammation [306]. Gresham et ses collaborateurs (2000) ont aussi montré que les neutrophiles isolés au site infectieux contiennent des bactéries intracellulaires viables et que ces neutrophiles infectés sont suffisants pour infecter un animal naïf [310]. La survie de *S. aureus* à l'intérieur des neutrophiles contribue donc aussi à l'infection. Ces études suggèrent ainsi qu'un recrutement excessif ou incontrôlé de neutrophiles peut faciliter l'infection et la persistance de l'inflammation. La contribution des neutrophiles est donc délicate à appréhender. D'un côté, ils peuvent jouer un rôle protecteur en éliminant la bactérie et en participant au contrôle de l'infection. A l'opposé, ils peuvent jouer un rôle délétère suite à un recrutement inapproprié en favorisant la survie intracellulaire de *S. aureus*, et en provoquant des dommages tissulaires par la libération de produits toxiques.

2- Les monocytes

Lors d'une infection par *S. aureus*, l'influx des granulocytes est ensuite suivi par le recrutement de monocytes inflammatoires [277,286,315]. Des patients avec une infection invasive par *S. aureus* montrent une expansion significative des monocytes circulants et inflammatoires dans le sang [311]. Lors d'une stimulation de cellules humaines par *S. aureus*, les auteurs montrent que ce recrutement de monocytes est principalement dépendent de CCL2 (MCP-1) [315]. La stimulation de cellules endothéliales humaines par *S. aureus*, de même que par l'IL-1 β , induit la production de CCL2 qui déclenche le recrutement de monocytes. Ce recrutement est inhibé avec des anticorps bloquant le CCL2. Cependant, peu d'études ont caractérisé le rôle des monocytes dans les infections par *S. aureus*. Il a été montré que la reconnaissance de *S. aureus* par les monocytes sanguins humains induit la sécrétion d'un panel de chimiokines telles que IL-8, CCL2, CCL3 et CCL4, permettant le recrutement de nouveaux leucocytes [41]. En plus de ces chimiokines, la stimulation de monocytes sanguins humains avec *S. aureus*, du LTA ou du PGN induit la production de TNF α , IL-1b, IL-6, IL-10 et IL-12 [41,43,316]. Par ailleurs, les PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) de patients

avec une infection à *S. aureus* sur-expriment les gènes de l'immunité innée et régulent négativement les gènes de l'immunité adaptative [311]. Il semblerait que les monocytes inflammatoires soient responsables de la régulation positive de l'expression des gènes des neutrophiles, tels que ceux induisant les défensines, les lactoferrines et l'élastase. En parallèle, l'infection par *S. aureus* augmente les molécules d'adhésion sur l'endothélium permettant une adhésion forte des monocytes et leur extravasation dans le tissu infecté [317,318]. Une fois sur le site infectieux, les monocytes inflammatoires vont se différencier en macrophages [182], et vont coopérer avec les neutrophiles pour éliminer la bactérie.

3- Coopération entre les neutrophiles et les macrophages

L'élimination de la bactérie nécessite une étroite collaboration entre les macrophages et les neutrophiles. Cette coopération est un système complexe impliquant une interaction bilatérale entre les neutrophiles et les macrophages. D'une part, ces deux populations cellulaires vont coopérer pour induire l'amplification du recrutement leucocytaire, entraînant une accumulation de macrophages et de neutrophiles au site infectieux [300,306,319]. D'autre part, les neutrophiles vont avoir la capacité de modifier le phénotype des macrophages selon les produits solubles qu'ils sécrètent [309,319–324]. Ses produits solubles vont entraîner la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1 ou anti-inflammatoire M2. L'état de polarisation du macrophage semble avoir une influence majeure sur la résolution de l'inflammation ou la persistance de l'infection à *S. aureus* [249,309,325]. Ces études montrent que, lors d'une infection par voie intraveineuse ou intradermique par SARM, une polarisation des macrophages vers le phénotype M1 permet d'augmenter les défenses immunitaires de l'hôte. L'orientation directe vers un phénotype M2 ne permet pas aux macrophages de contrôler l'infection. La résolution de l'inflammation s'opère lorsque les neutrophiles rentrent en apoptose et sont ensuite dégradés par les macrophages [245,306]. L'efferocytose des neutrophiles permet d'éviter la nécrose secondaire et la libération des granules toxiques des neutrophiles [243,319,326]. De plus, cette efferocytose oriente le macrophages vers un phénotype M2 [241,245,306]. Ces macrophages polarisés M2 vont sécrétés des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF β qui participe à la résolution de l'inflammation et qui favorise la réparation tissulaire. Cependant, dans certains cas, 15-50% de l'inoculum initial de *S. aureus* ingéré par les neutrophiles ont la capacité de survivre dans le phagosome [310,324]. La survie de la bactérie dans les neutrophiles semble associée à une inhibition de l'efferocytose par les macrophages et favorise la lyse des

neutrophiles par un programme de mort cellulaire proche de la nécrose [324]. De plus, ces neutrophiles, en limitant l'efferocytose, altèrent le phénotype des macrophages et semblent participer à la pathogenèse de *S. aureus*.

Ainsi, le contrôle de l'infection serait dépendant de l'étroite collaboration entre les cellules de l'immunité avec une régulation adéquate du phénotype des macrophages par les neutrophiles dans le temps.

IV- Le détournement de l'immunité innée par *S. aureus*

Lors de son arrivée dans l'organisme, la bactérie est confrontée à un arsenal de mécanismes de défenses innées de l'hôte. Pour pouvoir persister, *S. aureus* a du développer de nombreuses stratégies pour moduler les réponses immunitaires innées de l'hôte et limiter ainsi la clairance bactérienne. Cette bactérie utilise une variété de protéines pour détourner les effets antimicrobiens de l'immunité innée. Ces protéines agissent sur le système du complément, sur des récepteurs cellulaires exprimés par les cellules monocytaires ou granulocytaires et sur les alarmines [264].

1- Inhibition du système du complément

Les bactéries à Gram positif, incluant *S. aureus*, sont généralement résistantes au complexe d'attaque membranaire induit par le C5b grâce à leur épaisse paroi de peptidoglycane. De plus, plusieurs protéines de *S. aureus* sont capables d'inhiber les différentes voies d'activation du complément selon plusieurs mécanismes. Lee et al. (2004) ont montré que la protéine de liaison au fibrinogène (Efb) sécrétée par *S. aureus* est un inhibiteur de plusieurs voies d'activation du complément [327]. Cette protéine se lie au C3 qui est un composant crucial de la cascade du complément : C3 joue non seulement un rôle d'opsonine, mais est aussi le lien commun des trois voies d'activation du complément (voie classique, voie alterne et voie des lectines). La liaison de Efb avec C3 bloque l'activation des voies classiques et alternes inhibant ainsi la phagocytose associée à l'opsonisation de la bactérie et l'activité du complément. Par ailleurs, une autre protéine sécrétée par *S. aureus* est aussi capable d'inhiber le complément: SCIN (Staphylococcal complement inhibitor). SCIN bloque l'activité C3b convertase, réduisant le dépôt d'opsonine C3b sur *S. aureus*, diminuant l'ingestion et l'élimination par les neutrophiles, et inhibant la production de C5a [328]. De

plus, le plasmine, formé par la conversion du plasminogène par la staphylokinase (SAK) de *S. aureus*, induit le clivage de C3b, diminuant aussi la phagocytose par les neutrophiles [329].

2- Induction de la mort des cellules

En plus des protéines inhibant les voies d'activation du complément, *S. aureus* sécrète de nombreux facteurs permettant d'échapper aux phagocytes. *S. aureus* produit de nombreuses toxines ciblant les macrophages résidents. Parmi ces exotoxines, on retrouve les toxines formant des pores (PFT : α -hémolysine et leucocidines à 2 composants : γ -hémolysine, PVL, LukED et lukAB), la β -hémolysine et la moduline phénol soluble (PSM) (Staal, 1998 ; Vandenesch, 2012 ; Yoong, 2013). L' α -hémolysine, qui joue un rôle majeur dans les infections à *S. aureus*, a été bien décrite. Elle induit la lyse d'une variété de cellules de l'hôte incluant les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les kératinocytes, les érythrocytes et les lymphocytes T [330]. Il est bien établi que l' α -hémolysine induit une mort cellulaire nécrotique pro-inflammatoire des macrophages et des kératinocytes [87,284,298,331–334]. Ce ciblage spécifique se fait grâce à la fixation de l' α -hémolysine sur le récepteur ADAM-10, présent principalement sur les cellules épithéliales et les macrophages [284,335]. L'interaction de la toxine avec son récepteur entraîne la formation de pores dans la membrane plasmique et modifie les flux de protons [81,82]. Cette perturbation des flux, en combinaison avec la reconnaissance des PAMPs de *S. aureus* ou de signaux de danger, induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 (nucleotide-binding domain adn leucine-rich repeat protein 3), un complexe multiprotéique cytoplasmique [298,332]. L'inflammasome NLRP3 est constitué d'une protéine NLR (NLRP3, aussi connu sous le nom de cryopyrine ou NALP3), d'au moins une protéine adaptatrice (ASC : apoptosis-associated speck protein with a caspase activation and recruitment domain) et de pro-caspase-1 [203]. L'assemblage de l'inflammasome conduit à l'activation de la caspase-1 qui permet le clivage de la pro-IL1 β et de la pro-IL18 et la libération des cytokines matures correspondantes (Figure 29).

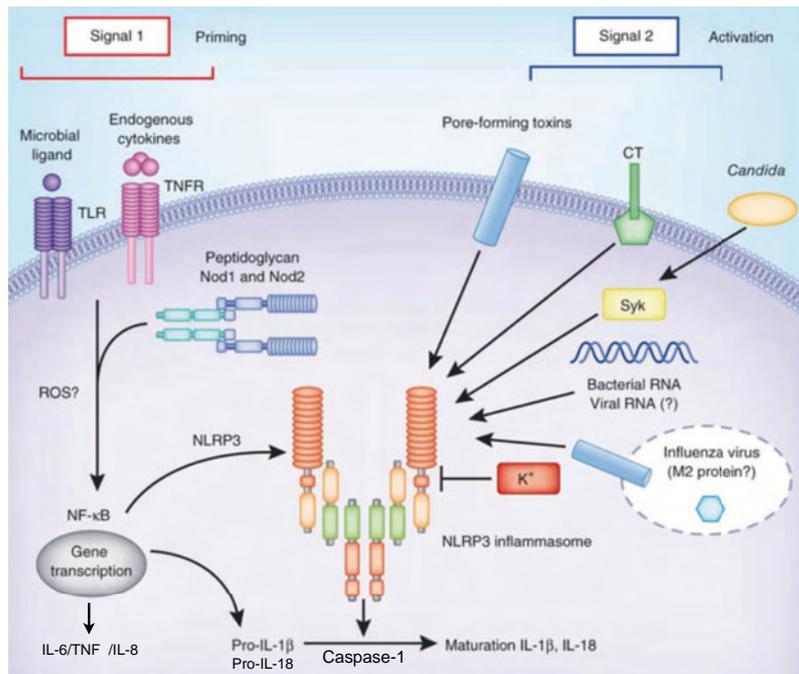


Figure 29 : Les voies d'activation de l'inflammasome NLRP3. [336]

L'activation de la caspase-1 requiert deux signaux. Le signal 1 est représenté par des produits microbiens ou des cytokines endogènes et est requis pour la régulation positive de NLRP3 et de pro-IL1 β . Le signal 2 active l'inflammasome NLRP3. L'activation par *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et *Vibrio cholere* est médiée par les toxines formant des pores. De plus, d'autres toxines bactériennes peuvent induire l'activation de l'inflammasome NLRP3, telle que la toxine du Cholera (CT) ; *Candida albicans* induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 via la kinase Syk. Le virus Influenza peut induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 via des mécanismes encore controversés. L'ARN bactérien cytosolique a été reporté à induire l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Il a été montré que l'activation de la caspase-1, directement liée à l'assemblage de l'inflammasome, est capable d'induire une forme de mort cellulaire programmée pro-inflammatoire appelé pyroptose [95,281,298,332,337,338]. La caspase-1 induit le clivage de l'ADN chromosomique et la lyse cellulaire avec la libération du contenu cytoplasmique, riche en facteurs pro-inflammatoires [298,339](Figure 30).

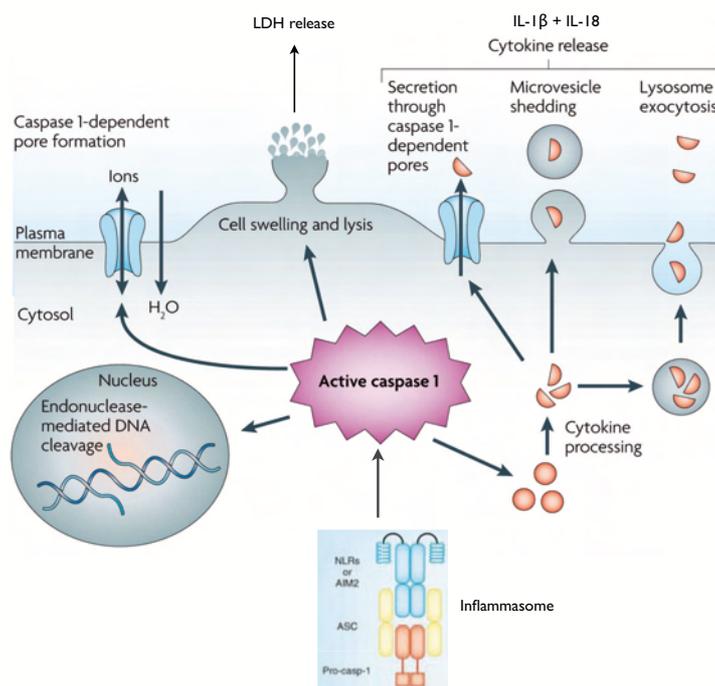


Figure 30 : Les mécanismes de la pyroptose. Adapté de [339].

La caspase-1 est clivée et activée en réponse à de nombreux stimuli, et notamment par l'inflammasome. Une fois activée, la caspase-1 résulte en un programme de mort cellulaire conservé appelé pyroptose. L'activation de la caspase-1 mène à la formation rapide de pores dans la membrane plasmique avec un diamètre de 1,1 à 2,4 nm. Ces pores perturbent les gradients ioniques cellulaires, permettant l'influx d'eau, le gonflement de la cellule et la lyse osmotique. Les formes pro-IL-1 β et IL-18 sont clivées par la caspase-1 et libérées lors de la pyroptose, bien que le mécanisme de sécrétion reste controversé. La sécrétion ne requiert pas la lyse et est temporellement associée avec la formation de pores dépendante de la caspase-1, ce qui suggère que ces pores facilitent la libération de cytokines. D'autres études suggèrent que les mécanismes de sécrétion incluent l'exocytose des lysosomes indépendamment de la caspase-1 et la perte des microvésicules. L'activité de la caspase-1 résulte en un clivage de l'ADN chromosomal par une endonucléase. Le clivage de l'ADN ne résulte pas en des fragments oligonucléosomiaux comme observé lors de l'apoptose. La condensation nucléaire est alors observée mais l'intégrité nucléaire est maintenue, à l'inverse de la fragmentation nucléaire observée lors de l'apoptose.

En plus de l' α -hémolysine, les cellules immunitaires peuvent aussi être lysées par d'autres toxines de *S. aureus* [95,306,340,341]. Les monocytes/macrophages sont aussi sensibles à la PVL [342], par un mécanisme proche de l' α -hémolysine, aux PSMs [343] et aux leucotoxines lukAB [100]. Les toxines de *S. aureus* entraînant la lyse des neutrophiles regroupent la PVL [342,344], les PSM [343], la leucotoxine lukED [98,99] et la leucotoxines lukAB [100]. La PVL semble induire la mort des neutrophiles par apoptose ou par nécrose selon la concentration en PVL [344]. Cependant, les mécanismes de mort cellulaire via ces toxines ne sont pas encore parfaitement décrits.

Ainsi, la sécrétion de ces toxines permet à *S. aureus* d'éliminer les cellules requises pour la mise en place d'une réponse immunitaire, et la majorité d'entre elles contribuent à la pathogenèse de l'infection à *S. aureus* [95,112,345].

3- Inhibition du recrutement leucocytaire

Lors de son arrivée dans l'organisme, la bactérie développe très rapidement des stratégies pour limiter la chimiotaxie induite par la réponse inflammatoire. Les leucocytes sont attirés au site de l'inflammation via des facteurs chimiotactiques produits localement. Les premiers facteurs chimiotactiques identifiés sont les peptides formylés [346]. Parmi ces peptides, le tripeptide formyl-Met-Leu-Phe formylé (fMLP) est libéré par les mitochondries en réponse au dommage tissulaire, mais peut aussi être d'origine exogène, dérivé des protéines bactériennes [347]. Le fMLP dérivé de *S. aureus* est un puissant chimioattractant des neutrophiles et induit la production de superoxyde par ces cellules [348]. Ce peptide formylé réagit avec des récepteurs spécifiques sur les phagocytes. Veldkamp et ses collaborateurs (2000) ont mis en évidence que le surnageant de *S. aureus* régule négativement les récepteurs fMLP sur les neutrophiles, altérant ainsi la chimiotaxie des neutrophiles au site infectieux [349]. En 2004, De haas et ses collaborateurs identifient la protéine CHIPS (Chemotaxy inhibitory protein of *S. aureus*) sécrétée par *S. aureus* qui altère spécifiquement la réponse des neutrophiles et des monocytes aux peptides formylés [350]. De plus, la protéine CHIPS se fixe aussi sur le récepteur C5a, inhibant la chimiotaxie des neutrophiles dépendante de C5a [349,350]. La liaison de CHIPS sur les récepteurs neutrophiliques empêche ainsi la liaison du ligand et la transduction du signal. Ces mécanismes, parfois redondants, permettant ainsi de limiter le recrutement des neutrophiles et la destruction de la bactérie.

4- Echappement à l'élimination par les phagocytes et survie intracellulaire

En plus de l'ensemble de ces détournements, cette bactérie est aussi capable de résister au processus d'élimination par les phagocytes. La plupart des isolats cliniques de *S. aureus* possèdent une capsule polysaccharidique qui permet la protection contre la clairance via les phagocytes [34]. La composition de la paroi permet aussi à *S. aureus* d'éviter les attaques de l'immunité innée en lui conférant une résistance vis-à-vis des peptides antimicrobiens et des enzymes antibactériennes [210,351–353]. En effet, l'alanylation de l'acide teichoïque de la

paroi de *S. aureus* permet à la bactérie de résister à l'attaque des peptides antimicrobiens cationiques contribuant à la virulence de *S. aureus* [351,354]. De plus, l'auréolysine de *S. aureus* clive et inactive la cathelicidine LL-37, un puissant peptide antimicrobien humain [72]. La O-acyltransferase du PGN de *S. aureus* est aussi responsable de la grande résistance de la bactérie aux lysosymes [352]. Par ailleurs, toutes les espèces de *S. aureus* possèdent une catalase. La catalase inactive le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres produits dans les cellules phagocytaires suite à l'ingestion de la bactérie. De plus, les pigments caroténoïdes responsables de l'apparence dorée de *S. aureus* semblent impliqués dans la résistance aux oxydants et dans la survie de la bactérie à l'intérieur des neutrophiles [355]. En effet, plusieurs études ont montré que *S. aureus* était capable de survivre dans la cellule hôte et d'empêcher la lyse cellulaire [356]. *S. aureus* survit non seulement à la phagocytose des macrophages et des neutrophiles, mais est aussi capable de persister à l'intérieur de ces cellules [310,340,357] en s'échappant du phagosome et en se répliquant dans le cytoplasme [114,357]. Cette bactérie a ainsi la capacité d'envahir les cellules normalement responsables de sa destruction. *S. aureus* préserve l'intégrité du macrophage en l'utilisant comme une niche intracellulaire : il manipule les processus de signalisation et de transcription cellulaire du macrophage pour favoriser la survie des phagocytes infectés sans destruction de la bactérie [358,359]. Ces études ont ainsi montré que la phagocytose de *S. aureus* par les macrophages exerce un effet cytoprotecteur, qui se manifeste par la régulation positive de facteurs antiapoptotiques, tels que Bcl-2 et Mcl-1. La lyse du macrophage survient alors seulement 5 jours après infection, suite à la réplication de la bactérie dans le cytoplasme [357].

Ces études suggèrent que le détournement de l'apoptose par *S. aureus* empêche l'élimination des cellules infectées, permettant ainsi une persistance intracellulaire du pathogène, sa dissémination par les cellules infectées, et la progression de l'infection.

S. aureus possède ainsi un arsenal de protéines et de toxines permettant d'échapper aux réponses de l'hôte. CHIPS, SCIN, SAK et Efb semblent neutraliser les réponses aiguës cruciales du système immunitaire telles que l'activation du complément, la chimiotaxie et l'activation des neutrophiles. De plus, *S. aureus* a la capacité d'induire la mort des cellules hôtes précocement [356,360], mais aussi, à l'inverse, de favoriser l'expression de facteurs anti-apoptotiques permettant la survie des cellules afin de les utiliser comme niche intracellulaire. Ces mécanismes contradictoires sont probablement le reflet d'interactions fines entre *S. aureus* et le système immunitaire. La nature et le nombre de facteurs de virulence bactériens et le niveau d'activation des effecteurs immunitaires impliqués jouent

probablement un rôle majeur dans l'évolution de l'infection et la capacité de l'organisme infecté à éliminer la bactérie (Schéma bilan : Figure 31 et 32).

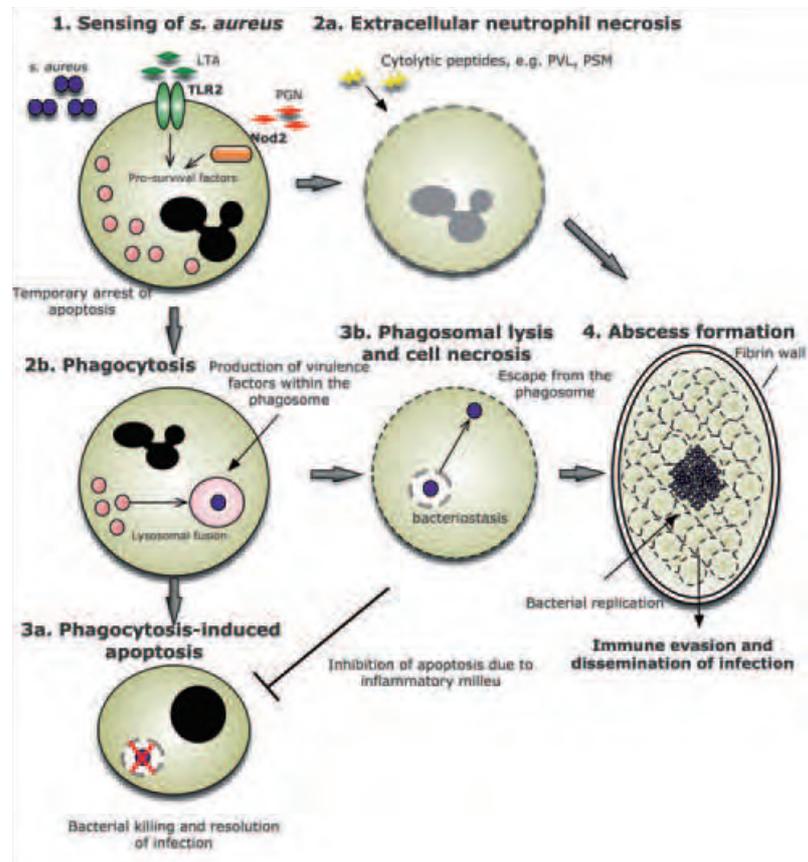


Figure 31 : Mécanismes par lesquels l'interaction entre *S. aureus* et les leucocytes peut modifier l'issue de l'infection [341]. La reconnaissance initiale de *S. aureus* est effectuée principalement par les PRRs (pattern recognition receptor), TLR-2 et NOD2. La signalisation subséquente mène à la génération de molécule de pro-survie qui permettent d'activer le neutrophile et de retarder temporairement l'apoptose (1). Les facteurs extracellulaires bactériens, incluant la PVL et les PSM, ont un effet direct sur le neutrophile, menant à la nécrose cellulaire (2a). Les neutrophiles intacts phagocytent *S. aureus*, qui devient confiné dans le phagosome (2b). Le résultat souhaitable est la mort bactérienne à l'intérieur du phagosome résultant de l'activation des protéases antimicrobiennes et la génération de stress oxydatif, suivi par l'apoptose de la cellule et la clairance par les macrophages tissulaires (3a). *S. aureus* peut détourné ce mécanisme en synthétisant des facteurs de virulence incluant des protéines lytiques à l'intérieur du phagosome, ce qui cause la rupture à la fois de la membrane phagosomale et de la membrane plasmique (3b). La bactérie s'échappe alors de la cellule et utilise potentiellement le contenu cellulaire pour stimuler la réplication. L'accumulation des corps cellulaire contribue à la formation d'abcès et à l'inflammation, fournissant une niche qui est relativement caché des cellules immunitaires infiltrantes, permettant la réplication bactérienne et en fin de compte à la dissémination systémique (4).

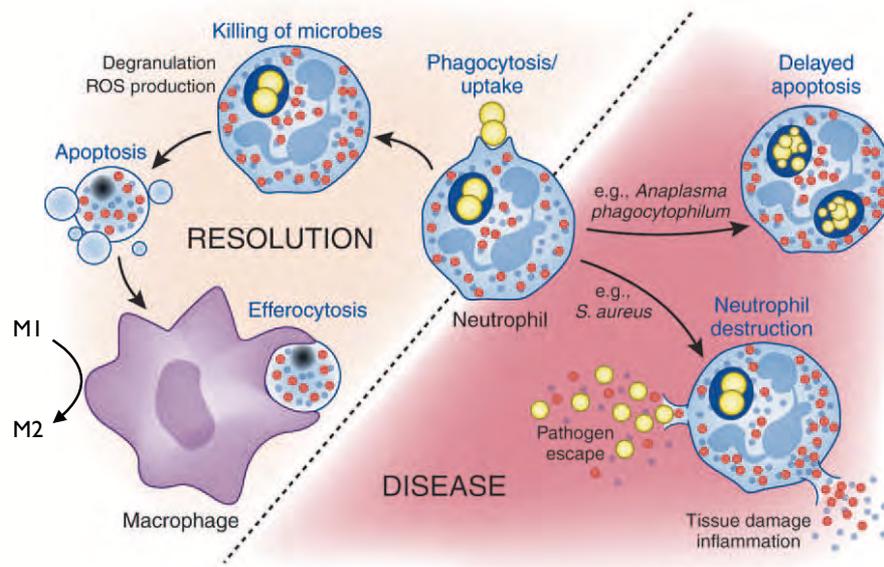


Figure 32 : Schéma bilan des mécanismes possibles de résolution ou de développement de l'infection par *S. aureus*. Adapté de [306]. La phagocytose de la bactérie déclenche la production de ROS et la dégranulation, agissant collectivement pour tuer la bactérie ingérée, suivi par l'apoptose du neutrophile et la clairance par les macrophage. Cette efferocytose permet la polarisation des macrophages initialement M1 vers un phénotype M2 permettant la résolution de l'infection. Alternativement, les pathogènes bactériens peuvent altérer le neutrophile, favorisant soit un retard dans l'apoptose du neutrophile ou une lyse du neutrophile accélérée. L'altération du neutrophile facilite la survie du pathogène et favorise l'infection.

D- Problématique

S. aureus est un pathogène bactérien majeur de l'homme et des animaux, responsable d'une grande variété d'infections. Sa capacité à développer des résistances multiples aux antibiotiques pose un sérieux problème de santé publique et limite de plus en plus fréquemment les possibilités thérapeutiques. Chez l'Homme, il existe plusieurs facteurs de prédisposition à l'infection par *S. aureus* : le portage du staphylocoque, les chirurgies, les cathétérisations sur de longues durées, certains désordres métaboliques (diabète) ou encore immunitaires (neutropénie etc.). Certains de ces facteurs sont explicatifs de l'acquisition d'infections à l'hôpital et s'associent souvent à un état de faiblesse transitoire ou non du patient. L'étiologie des infections acquises dans la communauté est un sujet encore plus complexe. En effet, ces infections surviennent chez des individus a priori en bonne santé, dotés d'un système immunitaire efficace et ne présentant pas de facteurs de prédisposition évidents. Il est alors envisageable que les variations quantitatives ou qualitatives de réponse immunitaire entre individus contribuent significativement à ces différences de sensibilité. L'utilisation de différentes lignées de souris consanguines de fonds génétiques différents a permis de modéliser cette prédisposition génétique à l'infection par *S. aureus* [248,283,299]. Lors d'infection par voies intraveineuses ou intrapéritonéales, les souris de fond génétique C57BL/6 sont plus résistantes que les souris de fond génétique A/J, DBA/2 ou BALB/c qui succombent lors des premiers jours de l'infection et qui présentent des charges bactériennes plus élevées [248,299]. A l'inverse, les souris BALB/c et DBA/2 sont plus résistantes aux infections par voie sous-cutanée. Elles présentent des lésions de plus faible extension et une charge bactérienne moindre que les souris C57BL/6 [283]. Ainsi, la sensibilité à l'infection par *S. aureus* varie ainsi selon la génétique de l'hôte mais aussi selon le site d'infection. Par ailleurs, la découverte dans la souris A/J de facteurs génétiques associés à la sensibilité à l'infection par *S. aureus* a permis de mettre en évidence l'implication de 2 gènes qui semblent associés à l'altération de la production de cytokines par les macrophages des souris C57BL/6 et A/J [299]. En effet, par substitutions chromosomiques entre souris DBA/2 et souris C57BL/6, Ahn et al. ont montré que des loci situés sur les chromosomes 8, 11 et 18 influençaient la sensibilité au sepsis par *S. aureus* dans les souris A/J [299]. Dans ces loci, 2 gènes apparaissent exprimés de façon différentielle entre les souris C57BL/6 et A/J infectées. Bien que la fonction exacte de ces gènes reste inconnue pour l'instant, Ahn et al. ont montré que l'inactivation de ces gènes dans les macrophages diminuait la sécrétion d'IL-1 β . Dans une étude récemment publiée, les auteurs ont identifiés de nouveaux gènes associés à la sensibilité à l'infection par *S. aureus*. La régulation négative de ces gènes dans les macrophages des souris sensibles est associée à une production cytokinique exacerbée [361].

Cette variation de sensibilité à *S. aureus* pourrait donc être liée à des différences dans la nature de l'immunité innée mise en place et des cellules qui la compose. En effet, comme nous l'avons vu, la déplétion des cellules de l'immunité adaptative ne modifie pas le cours de l'infection alors que les cellules de l'immunité innée apparaissent indispensables [248–250,288]. Les réponses immunitaires innées mises en jeu, dépendantes de la génétique de l'hôte et du site d'infection, pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de ces infections. De fait, l'analyse approfondie de ces réponses pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes associés à cette différence de sensibilité à *S. aureus*.

Les macrophages résidents, qui sont les premières cellules à interagir avec la bactérie, jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse inflammatoire. La distribution tissulaire et la capacité à répondre aux signaux du microenvironnement influencent l'activation et la fonction des macrophages. Ceux-ci, en fonction de leur phénotype, induisent des programmes pro-inflammatoires (M1) ou anti-inflammatoires (M2) qui modulent l'ensemble de la réponse immunitaire [215]. Bien que des progrès considérables aient été réalisés via des approches *in vitro* sur la polarisation des macrophages dans le cadre des infections bactériennes [168], l'influence du/des phénotype(s) basal des macrophages résidents sur la nature et l'intensité de la réponse inflammatoire *in vivo* lors de ces infections reste à démontrer et à analyser. Plusieurs études ont analysé l'état de polarisation des macrophages suite à une infection par *S. aureus*, *in vivo* ou *in vitro* [249,309,325]. Elles montrent qu'un contexte inflammatoire favorisant une activation alternative des macrophages(M2) est associé à la sensibilité de l'hôte à l'infection par SARM. Cependant, les modèles utilisés sont très artificiels car reposant sur l'utilisation de souris immunodéficientes (SCIDbg) [249,309] présentant un défaut fonctionnel en cellules T, B et NK, ou des souris BALB/c [325], qui ont subi un traumatisme thermique. Certes, l'induction de brûlures de second et troisième degré modifie le phénotype basal des macrophages ce qui semble entraîner d'importantes répercussions sur la sensibilité intrinsèque de ces souris à une infection par *S. aureus*. Néanmoins, ce modèle ne permet pas d'étudier la dimension génétique de la prédisposition à l'infection

Ainsi, dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse qu'en lien avec la génétique de l'hôte, le phénotype basal des macrophages résidents pouvait modifier la nature de la réponse innée induite par l'infection. L'objectif de ce travail est donc d'évaluer l'impact du fond génétique de lignées de souris congéniques sur le phénotype des macrophages résidents et les conséquences fonctionnelles d'une infection par *S. aureus*. Pour cela, nous utiliserons deux lignées de souris, ne présentant pas de défauts avérés des compartiments

monocytaire et granulocytaire, et naturellement sensibles (DBA/2) ou résistantes (C57BL/6) à l'infection par *S. aureus*.

Parallèlement à ce premier axe de recherche, il nous semble important d'approfondir la caractérisation du phénotype basal des populations de macrophages résidents. En raison des choix méthodologiques réalisés dans ce premier axe de recherche, à savoir une administration intrapéritonéale de *S. aureus*, il est logique de s'intéresser à la population de macrophages résidents de cette cavité. Les méthodes et outils utilisés jusqu'à présent ne permettent pas d'évaluer la diversité des populations de macrophages résidents au sein d'un même tissu ni leur contribution dans le maintien de l'homéostasie tissulaire ou la réponse aux infections. Dans cette perspective, nous avons développé une méthodologie analytique basée sur l'isolement des macrophages par cytométrie de flux et couplée à une technologie microfluidique permettant d'analyser à l'échelle de la cellule unique l'expression d'un panel de gènes associé aux différents états phénotypiques des macrophages résidents et à leur profil d'activation. Au-delà de la caractérisation des phénotypes, cette approche a également pour objectif de mettre en évidence les différences et les possible biais entre l'analyse d'expression de gènes à l'échelle de la population cellulaire ou de la cellule unique. Notre hypothèse était que ces méthodes classiques occultent une part importante de la diversité des sous – populations des macrophages tissulaires.

Les objectifs de ce travail sont donc :

1- Evaluer le rôle du macrophage résident lors d'une infection par *S. aureus*.

1-1- Caractériser la réponse inflammatoire mise en place selon la sensibilité de l'individu.

1-2- Déterminer l'influence du phénotype du macrophage résident sur l'orchestration de la réponse inflammatoire.

1-3- Evaluer l'impact du phénotype du macrophage sur le devenir de l'infection.

2- Caractériser avec précision le phénotype basal des macrophages résidents :

2-1- Développer une méthode analytique permettant l'étude de l'expression génique d'une seule cellule, le macrophage résident.

2-2- Définir et comparer les phénotypes de chaque sous population de macrophages résidents de la cavité péritonéale

2-3- Evaluer les risques de biais analytique associés à l'étude de l'expression à l'échelle d'une population en comparant les profils d'expression obtenus sur cellules poolées ou cellules uniques.

PARTIE 2 :

Travaux de recherche

A- Article 1

1- Présentation du travail

Les infections par *S. aureus* représentent un problème de santé publique majeur exacerbé par l'augmentation du nombre de souches résistantes aux antibiotiques. Les mécanismes immunitaires exacts permettant de contrôler l'infection sont encore peu connus, bien qu'un consensus existe pour admettre que l'immunité innée joue un rôle majeur. Les infections acquises dans la communauté sont difficilement compréhensibles car elles touchent des individus à priori immunocompétents. Par ailleurs, la variabilité de réponse immunitaire entre individus lors d'une exposition à *S. aureus* est probablement associée à un certain nombre de facteurs génétiques influant sur la prédisposition à l'infection. Afin de modéliser cette situation et d'en étudier les mécanismes immunologiques sous-jacents, nous avons utilisé deux lignées de souris présentant une sensibilité différente à l'infection par *S. aureus*. L'administration intrapéritonéale d'une dose sub létale de bactéries pour les souris C57BL/6 provoque la mort des souris DBA/2 par sepsis. Cette réponse immunitaire exacerbée des souris DBA/2 suggère l'existence de défauts d'initiation et/ou de régulation de la réaction inflammatoire. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons comparé la réponse des macrophages résidents péritonéaux (PerMF) entre ces deux lignées de souris, par une analyse phénotypique en cytométrie de flux, une analyse génétique par RT-QPCR moyen débit et une analyse fonctionnelle basée sur la mesure de la sécrétion de cytokines (ELISA Multiplex). Nos analyses montrent que précocement après l'infection, les PerMF enclenchent un programme de mort cellulaire présentant toutes les caractéristiques de la pyroptose. De façon surprenante, la pyroptose survient plus tardivement chez les souris sensibles et cette mort retardée des PerMF est associée à un moindre contrôle de la charge bactérienne. Pour explorer les causes de ce phénomène, nous avons étudié le phénotype des PerMF résidents à l'état sain par une analyse d'expression génique. L'analyse de marqueurs spécifiques des macrophages classiquement (M1) ou alternativement (M2) activés révèle différents phénotypes entre souris résistantes et sensibles. Les macrophages des souris DBA/2 semblent polarisés au phénotype extrême M2, alors que les macrophages des souris C57BL/6 semblent moins orientés vers l'extrémité de ce continuum d'activation. Suite à l'infection par *S. aureus*, le programme d'activation M1 est induit précocement dans les souris C57BL/6 permettant l'induction de la pyroptose, alors qu'il est plus tardif dans la DBA/2. Ces différentes cinétiques de pyroptose provoquent une altération majeure du profil de la réponse inflammatoire tant du point de vue de la sécrétion de cytokines que de la cinétique du recrutement cellulaire et du phénotype des cellules recrutées. La prise en charge de la bactérie est ainsi modifiée selon les cellules

présentes au site infectieux. Afin de déterminer l'influence de la cinétique de pyroptose sur le devenir de l'infection, nous avons traité les souris DBA/2 avec différents inducteurs de l'inflammasome simultanément à l'infection bactérienne. Le traitement des souris sensibles par l'ATP ou la Nigéricine augmente artificiellement la pyroptose, diminue le nombre de médiateurs pro-inflammatoires présents dans la cavité péritonéale, modifie le phénotype des neutrophiles recrutés et améliore la survie des souris à l'infection par *S. aureus*. Cette étude démontre ainsi que, en association avec la génétique de l'hôte, l'état basal de polarisation des macrophages résidents influence directement, via la pyroptose, la réponse inflammatoire précoce induite par l'infection à *S. aureus*.

Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice

Solène Accarias^{1,2}, Geanncarlo Lugo-Villarino^{*3,4}, Gilles Foucras^{*1,2}, Olivier Neyrolles^{3,4}, Séverine Boullier^{1,2} and Guillaume Tabouret^{1,2}

¹ Université de Toulouse, INP, ENVT, Toulouse, France

² INRA, IHAP, Toulouse, France

³ Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

⁴ Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

The relationship between *Staphylococcus aureus* and innate immunity is highly complex and requires further investigation to be deciphered. i.p. challenge of C57BL/6 and DBA/2 mice, resistant and susceptible to the infection, respectively, resulted in different patterns of cytokine production and neutrophil recruitment. *Staphylococcus aureus* infection induced macrophage pyroptosis, an inflammasome-dependent cell death program, whose rates significantly differed between C57BL/6 and DBA/2 mice. Fast rate pyroptosis of C57BL/6 macrophages released high levels of IL-1 β but limited the synthesis of other cytokines such as TNF- α , IL-6, CXCL1, and CXCL2. Conversely, the extended survival of DBA/2 macrophages allowed substantial production of these NF- κ B-related cytokines. Phenotyping of resting macrophages in different mouse strains revealed differential predisposition toward specific macrophage phenotypes that modulate *S. aureus*-mediated inflammasome activation. Treatment of DBA/2 susceptible mice with inflammasome inducers (i.e. nigericin and ATP) artificially increased pyroptosis and lowered the levels of NF- κ B-related inflammatory cytokines, but restored IL-1 β to levels similar to those in C57BL/6 mice. Collectively, this study promotes the concept that, in association with host genetics, the basal phenotype of resident macrophages influences the early inflammatory response and possibly participates in *S. aureus* infection outcome via the inflammasome pathway and subsequent pyroptosis.

Keywords: Inflammatory response · Macrophages · Pyroptosis · *Staphylococcus aureus*



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Staphylococcus aureus, a Gram-positive bacterium, is a human pathogen that causes a wide spectrum of diseases ranging from

mild cutaneous infections to severe pneumonia or sepsis [1]. *Staphylococcus aureus* is a leading agent of nosocomial and community acquired infections, and the emergence of strains resistant to several antibiotics is considered a great public health concern

Correspondence: Dr. Guillaume Tabouret
e-mail: g.tabouret@envt.fr

*These authors contributed equally to this work.

[2]. While hospital-acquired infections can be explained by a transitory state of immunosuppression in patients, the mechanisms of community-acquired infections are difficult to understand since they occur in otherwise healthy people [3–5].

The difference in susceptibility to staphylococcal infections possibly results from immune variations between individuals. According to this hypothesis, the innate immune response seems to play a central role in this process as RAG2-IL2R γ ^{-/-} and WT C57BL/6 mice are equally resistant to *S. aureus* infection [6]. The relationship between host genetics and predisposition to bacterial infections, including *S. aureus* infections [6, 7], has been established using inbred mouse strains from different genetic backgrounds. Upon systemic injection, whether intravenous or i.p., C57BL/6 mice appear more resistant compared with A/J, DBA/2 or, to a lesser extent, BALB/c mice, which succumb during the first days of infection or mount a less robust and efficient immune response. Furthermore, using chromosome substitution between resistant and susceptible mouse strains, it was shown that loci on chromosomes 8, 11, and 18 influenced the susceptibility to *S. aureus* sepsis in A/J mice. In these loci, two genes, *tnfaip8* and *seh11*, were differentially expressed in C57BL/6 and A/J mice upon infection. Their exclusive knockdown in macrophages resulted in altered secretion of IL-1 β [7], a central proinflammatory cytokine for *S. aureus* clearance [8].

Resident macrophages are key sentinels and orchestrators of the inflammatory response against invading pathogens. Tissue distribution and capacity to respond to microenvironment signals can influence the activation and function of macrophages, directing them into pro- (M1) or anti-inflammatory (M2) polarization programs that ultimately shape the immune response [9]. How the phenotype of resident macrophages influences the *in vivo* inflammatory response against bacterial challenge remains to be elucidated. In macrophages, the activation of NLRP3 inflammasome by *S. aureus* leads to proinflammatory cytokines secretion like IL-1 β and finely-tuned recruitment of PMNs to the site of infection. PMNs are central effector cells of host defense against many bacterial infections, and complete PMN deficiency leads to high susceptibility to *S. aureus* infections [10]. On the other hand, excessive PMN recruitment to the site of infection reduces mice survival and correlates with elevated bacterial burden and tissue damage [11, 12].

In this study, we compared the cellular mechanisms involved in immunity against *S. aureus* upon i.p. challenge of C57BL/6 and DBA/2 mice. We identified a difference in early inflammasome activation and macrophage survival between the two mouse strains that may contribute to different outcomes of infection.

Results

Differential susceptibility of C57BL/6 and DBA/2 mice to i.p. *S. aureus* infection

In order to characterize the inflammatory response induced by i.p. *S. aureus* infection, we first analyzed and compared the local

cellular composition in C57BL/6 and DBA/2 mice during the steady state. Quantitative assessments of peritoneal cells (PerCs) with flow cytometry did not reveal any significant differences in terms of mean total PerC numbers, or frequency of lymphocyte, granulocyte, or macrophage populations (Fig. 1A).

As previously reported [6], i.p. administration of a lethal dose of *S. aureus* (HG001 strain) resulted in the death of DBA/2 mice, whereas C57BL/6 did not succumb (Fig. 1B).

CFU determination in peritoneal exudates revealed a difference in local bacterial clearance. Bacterial load at 2 h p.i. was higher in DBA/2 mice compared with C57BL/6 (Fig. 1C). Interestingly, in C57BL/6, the strong decrease (2 logs) in CFU numbers observed 2 h p.i. was concomitant with a faster and enhanced local recruitment of PMNs (Fig. 1D). However, the peak of PMN recruitment was reached in both mouse strains by 4 h p.i. and to a similar intensity between resistant and susceptible mice (Fig. 1D). Taken together, these data confirmed the reported differential susceptibility of these two mouse strains and suggested a difference in orchestration of early inflammatory response in these mice.

Distinct patterns of inflammatory cytokines production between resistant and susceptible mice

The different kinetics of PMN recruitment suggested possible discrepancies in the production of inflammatory cytokines/chemokines between the two mouse strains. Multiplexed ELISA quantifications revealed two highly different patterns of secretion induced by *S. aureus* infection (Fig. 2A). In C57BL/6, IL-1 β release was detected earlier and reached higher levels ($p < 0.05$) than in DBA/2 at 4 h p.i. In contrast, production of NF- κ B-related cytokines/chemokines, including TNF- α , IL-6, CXCL1, and CXCL2, was significantly increased in DBA/2 mice compared with C57BL/6 mice. Of note, a peak in IL-10 levels was detected in DBA/2 mice 4 h p.i. (Fig. 2A). The enhanced recruitment of C57BL/6 PMNs was not consistent with the low levels of CXC chemokines measured from peritoneal exudates at that time. Yet, *in vitro* chemotaxis assay performed with naïve PMNs from both strains confirmed that peritoneal exudates collected from C57BL/6 30 min p.i. possessed higher chemotactic activity compared with those collected from DBA/2 (Fig. 2B; $p < 0.05$). However, this difference no longer existed at later time points, i.e. at 2 h p.i. This result was in line with increased secretion of CXCL1 or CXCL2 in DBA/2 mice (Fig. 2A). Collectively, the different dynamics of PMN recruitment and contrasting secretion patterns of proinflammatory cytokines prompted us to investigate the activity of resident peritoneal macrophages (PerMFs).

Staphylococcus aureus triggers pyroptosis of PerMFs at different rates according to genetic background

As resident macrophages are sentinel cells dedicated to the sensing of invading microbes and orchestration of the inflammatory

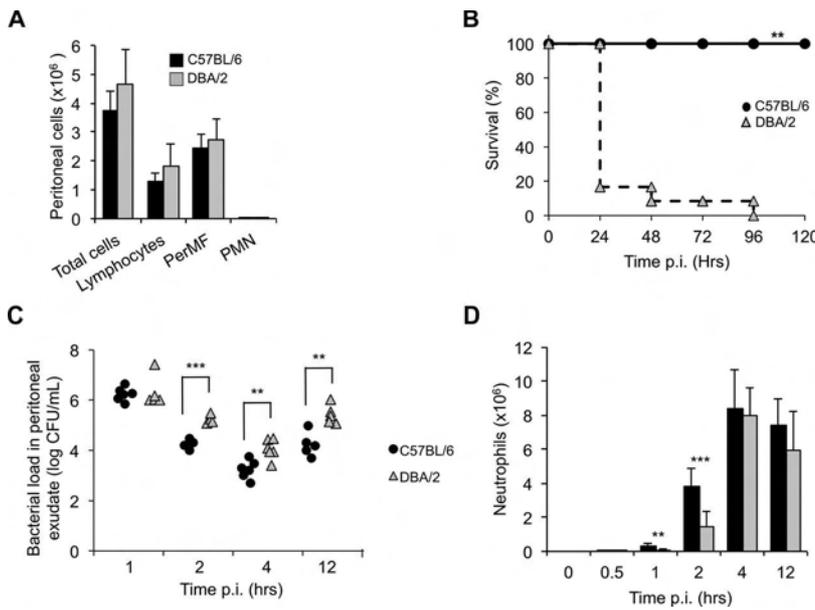


Figure 1. DBA/2 mice are susceptible to *S. aureus* infection. (A) Comparative flow cytometry analysis of the numbers of peritoneal cells populations between C57BL/6 and DBA/2 at steady state (lymphocytes: CD45R/B220⁺CD3⁺CD49b⁺; macrophages: CD115⁺F4/80⁺CD11b⁺; PMN: Ly6G⁺CD11b⁺). Data are shown as mean + SD, n = 6 mice per strain, pooled from two independent experiments. (**p < 0.01 (log rank test)). (B) Survival curve of C57BL/6 and DBA/2 mice upon i.p. infection with 2 × 10⁸ CFU/mouse of *S. aureus*. Data are shown as mean survival, n = 12 mice per strain, pooled from three independent experiments. (**p < 0.01 (log rank test)). (C and D) C57BL/6 and DBA/2 mice were i.p. infected with 10⁸ CFU/mouse of *S. aureus*. (C) Bacterial loads in peritoneal exudates were determined by CFU method at 1, 2, 4, and 12 h after inoculation. Each symbol represents a single animal, n = 5 mice per strain at 1 and 12 h p.i., n = 4 mice per strain at 2 h p.i. and n = 6 mice per strain at 4 h p.i. (**p < 0.01; ***p < 0.001 (Student's t-test)). (D) PMN (Ly6G⁺CD11b⁺) numbers isolated from the peritoneal cavity were quantified by flow cytometry at 0, 0.5, 1, 2, 4, and 12 h p.i. Data are shown as mean + SD, n = 6 mice per time point and per mouse strain, pooled from two independent experiments. ***p < 0.001 (Student's t-test).

response [13], we investigated their fate in the two mouse strains following *S. aureus* inoculation.

Shortly after i.p. challenge, flow cytometry analysis revealed a time-dependent decrease in F4/80^{high}CD11b^{high} PerMFs (Fig. 3A and B). Surprisingly, PerMF numbers dramatically declined in C57BL/6 compared with DBA/2 mice. As early as 30 min p.i., we observed a 70% decrease in the number of PerMFs in C57BL/6 mice compared with the unchanged levels in DBA/2 mice (p < 0.001). A complete drop in the number of PerMFs was observed in both mouse strains from 2 h p.i. (Fig. 3B). PerMFs from

C57BL/6 mice died early on upon *S. aureus* challenge (Fig. 3C and D) as more than 22% of PerMFs were positive for Annexin-V and ethidium bromide (EtBr) by 30 min p.i., reaching 52% 1 h p.i. By contrast, we observed a delay in the death of PerMFs in DBA/2 mice, in which less than 12% were AnnexinV^{Pos}EtBr^{Pos} at 30 min p.i. (Fig. 3D, p < 0.05). Importantly, the AnnexinV^{Pos}EtBr^{Pos} PerMFs were not permeable to 7-AAD, indicating the absence of large pores in the cell membrane (Supporting Information Fig. 2A). Consistent with the earlier death of resident PerMFs, peritoneal exudates collected from C57BL/6 presented higher levels

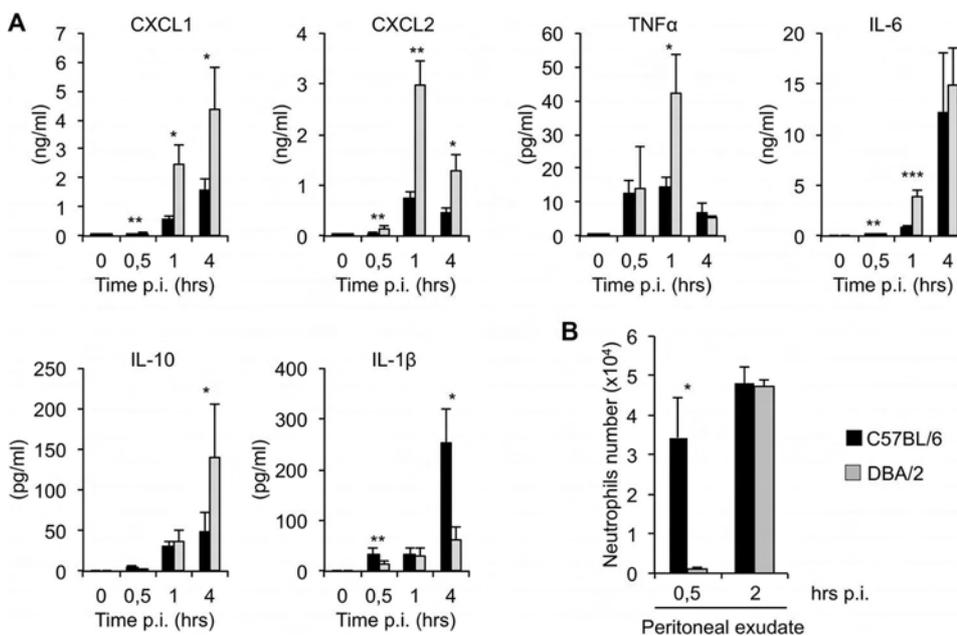


Figure 2. Genetic background modulates local secretion of inflammatory cytokines induced by *S. aureus* infection. (A) Cytokines CXCL1, CXCL2, TNF- α , IL-6, IL-10, and IL-1 β were quantified by multiplex ELISA at 0, 0.5, 1, and 4 h p.i. in peritoneal exudates collected from C57BL/6 and DBA/2 mice i.p. infected with 10⁸ CFU/mice of *S. aureus*. Data are shown as mean + SD, n = 6 per time point and per strain, pooled from two independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 (Student's t-test). (B) Chemotactic activity of peritoneal exudates collected from C57BL/6 and DBA/2 mice at 0.5 and 2 h p.i. Naïve autologous PMN was isolated from BM and assayed in a transwell chemotaxis assay. Total numbers of PMN migrating in the lower chamber (after 30-min incubation) were determined with flow cytometry absolute counting system. Data are shown as mean + SD, n = 3 exudates per time point and per strain from a single experiment representative of two independent chemotaxis assays. *p < 0.05 (Student's t-test).

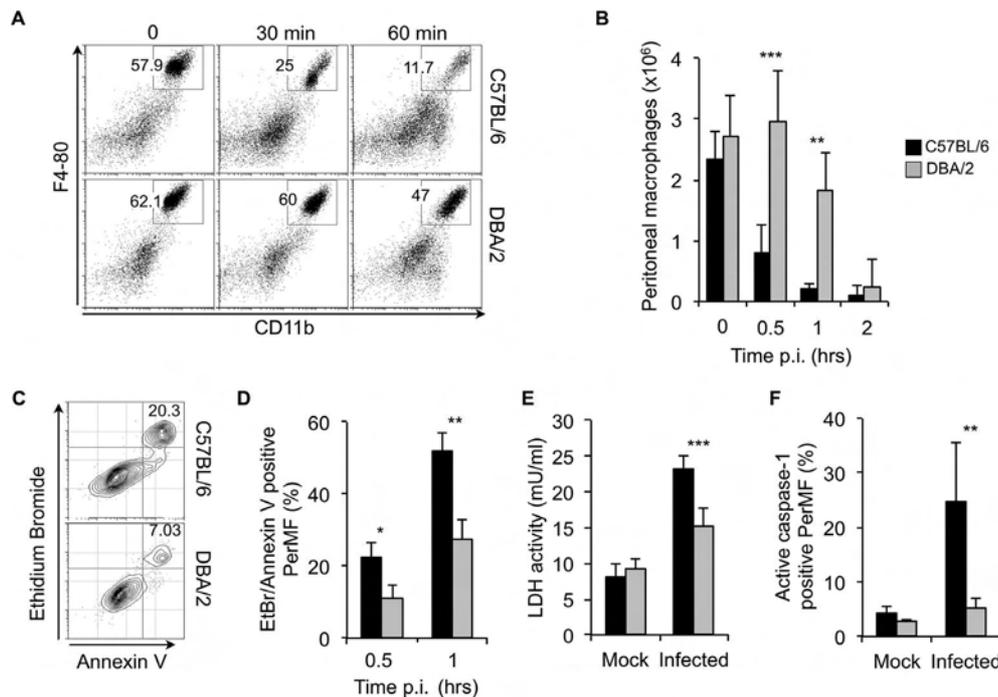


Figure 3. *Staphylococcus aureus* infection triggers pyroptosis of resident macrophages. (A) The proportion of PerMFs (F4/80^{high}CD11b^{high}) among peritoneal cells of C57BL/6 and DBA/2 mice was determined by flow cytometry, 0, 30, and 60 min after i.p. injection with 10⁸ CFU/mice of *S. aureus*. Numbers in squares indicate the proportion of macrophages among total peritoneal cells. One dot plot representative of three independent experiments, each with *n* = 3 mice per time point and per strain, is shown. (B) PerMF numbers, characterized as in (A), were determined at 0, 0.5, 1, and 2 h p.i. with flow cytometry absolute counting system. Data are shown as mean + SD, *n* = 10 mice per time point and per strain, pooled from three independent experiments. (C and D) The proportion of dying PerMF among total macrophages (F4/80⁺) was determined by labeling peritoneal cells with EtBr and Annexin-V and analyzed by flow cytometry, 0.5 and 1 h p.i. with 10⁸ CFU/mice of *S. aureus*. (C) Representative labeling experiment of dying PerMF (EtBr⁺Annexin-V⁺). Numbers in upper right quadrant indicate the proportion of EtBr⁺Annexin-V⁺ PerMF at 0.5 h p.i. One dot plot representative of two independent experiments, each with *n* = 3 mice per strain, is shown. (D) Mean proportion of EtBr⁺Annexin-V⁺ PerMF at 0.5 and 1 h p.i. Data are shown as mean + SD, *n* = 6 mice per time point and per strain, pooled from two independent experiments. (E) LDH activity was measured in peritoneal exudates 30 min after saline injection (mock) or after i.p. infection with 10⁸ CFU/mice of *S. aureus* (infected). Data are shown as mean + SD, *n* = 6 mice per group, pooled from two independent experiments. (F) PerMF with caspase-1 activity (FAM-YVAD-FMK⁺) among total PerMF (F4/80⁺) was quantified by flow cytometry 30 min in mock or infected mice as above. Data are shown as mean + SD, *n* = 5 mice per group, pooled from two independent experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 (Student's *t*-test).

of lactate dehydrogenase (LDH) activity at 30 min p.i. compared with those collected from DBA/2 mice (*p* < 0.001; Fig. 3E).

Pyroptosis is an extremely fast cell death process characterized by the caspase-1 activation following the inflammasome assembly, resulting in the release of LDH and IL-1 β , and in the formation of small pores in the membrane before cell lysis [14]. Using flow cytometry, we detected caspase-1 activity in 25% of the remaining PerMFs 30 min p.i. in C57BL/6 mice compared with only 5% of PerMFs in DBA/2 mice (Fig. 3F, *p* < 0.01). This finding was consistent with the significantly increased levels of IL-1 β measured in peritoneal exudates collected from C57BL/6 compared with DBA/2 mice (Fig. 2A). Collectively, these data demonstrated that following *S. aureus* infection, the PerMFs of the two mouse strains underwent pyroptosis but with significantly different kinetics.

It was previously reported that *S. aureus* can induce macrophages lysis through the production of a pore-forming toxin, the α -hemolysin or α -toxin [15]. α -Toxin exerts its activity through the binding to ADAM10 [16], a cell surface desintegrin, and leads to the assembly of NLRP3 inflammasome and cell death [15, 17]. However, ADAM10 expression between C57BL/6 and

DBA/2 PerMFs was similar (Supporting Information Fig. 2B), excluding a role for ADAM10 and α -toxin in the different kinetics of macrophage pyroptosis between the two genetic backgrounds.

Different kinetics of pyroptosis modulate C57BL/6 and DBA/2 PerMF inflammatory activity

PerMFs from both mouse strains were isolated at steady state and stimulated *in vitro* with *S. aureus* in an attempt to confirm our *in vivo* observations and to look for an association between pyroptosis kinetics, PerMF inflammatory cytokines secretion patterns and PMN chemotaxis.

As observed *in vivo*, *S. aureus* stimulation induced caspase-1 activity in PerMFs from both mouse strains but this activity was significantly higher in C57BL/6 PerMFs after 1 and 2 h of stimulation (*p* < 0.001 and *p* < 0.01, respectively; Fig. 4A). Consistent with this result, C57BL/6 PerMFs released more IL-1 β (*p* < 0.001; Fig. 4B).

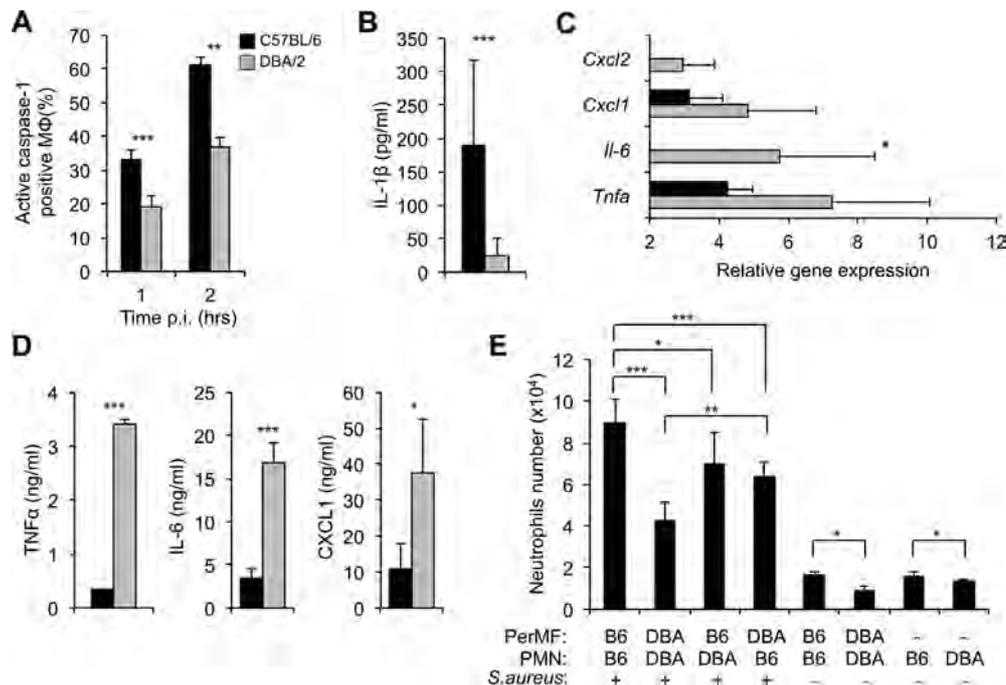


Figure 4. Pyroptosis kinetics of peritoneal macrophages differ between the two genetic backgrounds and modulate the profile of secreted cytokines. PerMF from C57BL/6 and DBA/2 mice were stimulated *in vitro* with *S. aureus* (MOI 25:1). (A) Caspase-1 activity was determined at 1 and 2 h post stimulation by flow cytometry after staining with FAM-YVAD-FMK. (B) The concentration of IL-1 β in supernatants at 2 h post stimulation was measured by ELISA. (C) Gene expression analysis of PerMF was performed by RT-QPCR. Relative gene expression of *Cxcl2*, *Cxcl1*, *Il-6*, and *Tnfa* at 30 min post stimulation was compared to unstimulated PerMF and normalized to housekeeping genes *Hprt1*, *Rpl9*, *Sdha*, and *Ywhaz*. Genes with a fold change ratio greater than 2 upon stimulation are shown. (D) The concentration of TNF- α , IL-6, and CXCL1 in supernatants at 4 h post stimulation was measured by ELISA. (E) Chemotactic activity of PerMF-conditioned supernatants collected after 2 h of incubation with or without *S. aureus* on freshly isolated naïve BM PMN was evaluated in transwell migration assays according to their genetic origin. Numbers of migrating PMN were determined in the lower chamber of the transwell using flow cytometry absolute counting system. (A–E) Data are shown as mean \pm SD, $n = 6$ samples per group each performed in triplicate pooled from two independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Student's *t*-test).

RT-QPCR analysis of *S. aureus*-stimulated PerMFs showed that, compared with C57BL/6, DBA/2 cells upregulated expression of several proinflammatory genes including *Tnfa*, *Il-6*, *Cxcl1*, and *Cxcl2* (Fig. 4C). This result was confirmed at the protein level by ELISA analysis that evidenced a dramatic increase in TNF- α , IL-6 ($p < 0.001$), and CXCL1 ($p < 0.05$) secretion in DBA/2 PerMF culture supernatants (Fig. 4D). Two hours after *S. aureus* stimulation, we collected the PerMF-conditioned culture supernatants and evaluated their chemotactic activity on PMNs. Supernatants from *S. aureus*-stimulated PerMFs induced stronger chemotactic activity compared with mock controls (Fig. 4E). However, supernatants from C57BL/6 PerMFs had a greater capacity to attract PMNs compared with their DBA/2 counterparts, regardless of the genetic origin of PMNs (Fig. 4E). Our results also suggested an intrinsic defect in the migratory activity of DBA/2 PMNs. Indeed, for a similar chemotactic stimulus (i.e. *S. aureus*-stimulated C57BL/6 PerMF-conditioned supernatant), the migration levels were significantly lower ($p < 0.05$) if DBA/2 PMNs were used (Fig. 4E).

These *in vitro* experiments confirmed that, when infected with *S. aureus*, C57BL/6 PerMFs undergo a faster pyroptosis compared with DBA/2 macrophage leading to distinct inflammatory contexts that influence PMN recruitment.

The phenotype of resident macrophages influences inflammasome triggering by *S. aureus*

To investigate the cause of different kinetics of pyroptosis, we studied the phenotype of cell-sorted resident macrophages at steady state using medium throughput RT-QPCR. To determine the genes differentially expressed between PerMFs isolated from the two genetic backgrounds, we compared the relative mRNA concentrations and presented the results as an expression ratio between C57BL/6 and DBA/2 (Supporting Information Table 2). Hierarchical ascendant clustering analysis of gene expression ratios efficiently discriminated the two genetic backgrounds (Fig. 5A). We focused our analysis on genes for which the expression ratio was higher than 2 with a p -value < 0.05 . First, we observed that three genes that are bona fide markers of the M2 polarization program (e.g. *Fizz1*, *Arginase-1*, and *Signr3*) had increased basal levels in PerMFs from DBA/2 mice (Fig. 5A and B) [18–20]. Second, PerMFs from C57BL/6 mice had increased levels of genes associated with the M1 polarization program (Fig. 5A and B). The commonly held view is that, at steady state, resident macrophages maintain an M2-like phenotype to afford tissue homeostasis and integrity [21]. Our observation suggested that

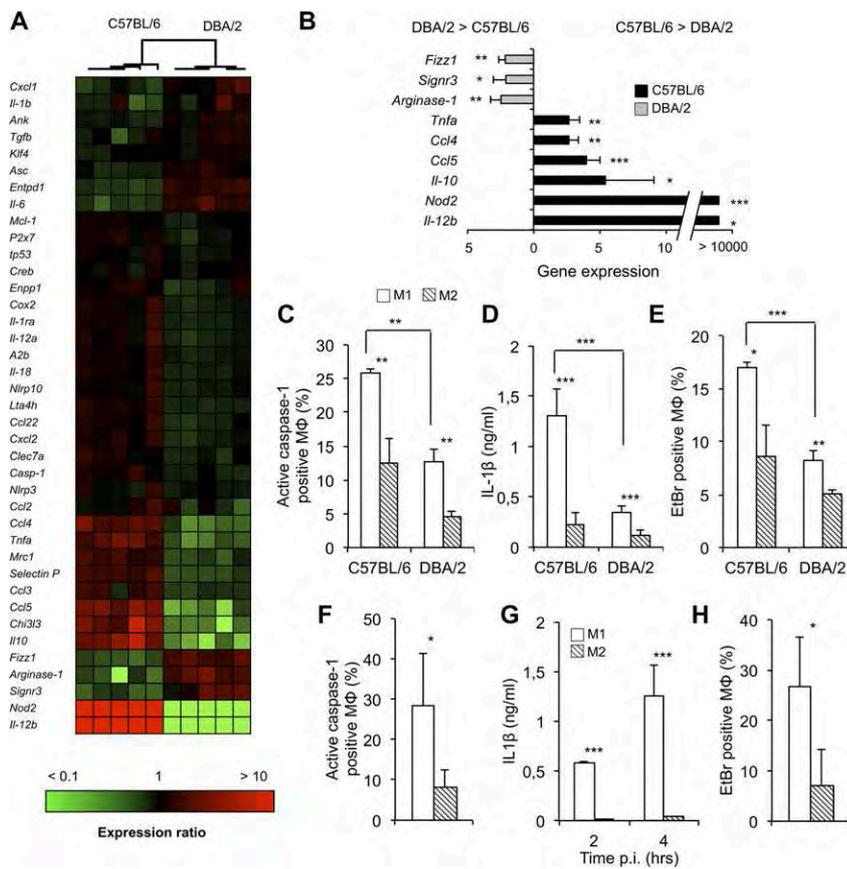


Figure 5. The resting phenotype of peritoneal macrophages influences kinetics of pyroptosis. (A and B) The steady state phenotype of flow cytometry cell-sorted PerMFs (CD115⁺F4/80⁺CD11b⁺) from C57BL/6 or DBA/2 mice was studied using RT-QPCR analysis. (A) Expression ratios of target genes between C57BL/6 and DBA/2 PerMFs were subjected to a hierarchical ascendant clustering analysis and are presented as a heat map. (B) Genes differentially expressed between C57BL/6 and DBA/2 mice with a ratio greater than 2 and with a p value < 0.05 are summarized. Data are shown as mean \pm SD, $n = 5$ mice per strain, from a single experiment. C57BL/6 and DBA/2 BMDMs polarized to (C–E) the M1 or M2 phenotype or (F–H) M1- or M2-polarized human MDMs were stimulated with *S. aureus* (MOI 25:1). (C and F) Caspase-1 activity was determined at 2 h post stimulation by flow cytometry analysis after staining with FAM-YVAD-FMK. (D and G) The concentration of IL-1 β in supernatants at (D) 2 h or (G) 2 and 4 h post stimulation was measured by ELISA. (E and H) Cell death of M1- or M2-polarized macrophages was evaluated using flow cytometry by measuring EtBr uptake after 2 h of infection. (C–E) Data are shown as mean \pm SD, $n = 6$ samples per group, pooled from two independent experiments. (F–H) Data are shown as mean \pm SD, pooled from four individual experiments ($n = 4$ donors) each performed in duplicates with a single independent donor. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Student's t -test).

this homeostatic phenotype is more pronounced in DBA/2 than in C57BL/6 PerMFs, which tended to be skewed toward M1. We thus verified that a more pronounced M1 polarization program leads to accelerated inflammasome assembly in response to *S. aureus* infection. Mirroring our findings in PerMFs, the caspase-1 activity ($p < 0.01$), IL-1 β secretion ($p < 0.001$), and numbers of EtBr positive cells ($p < 0.05$) were rapidly upregulated in M1 compared with M2 BM-derived macrophages (BMDMs), independent of the genetic background of origin (Fig. 5C–E). However, when the M1 program is exclusively compared in BMDMs between genetic backgrounds, C57BL/6 PerMFs displayed higher levels of caspase-1 activity ($p < 0.01$), IL-1 β secretion ($p < 0.001$) and EtBr^{Pos} BMDMs ($p < 0.001$) compared with those observed in DBA/2. Expression analysis of M1 (e.g. *Il-12b*, *inos*) and M2 (e.g. *Fizz-1*, *Arg-1*) canonical genes in polarized BMDMs from both genetic backgrounds, before *S. aureus* stimulation, revealed that M1-polarized BMDMs from DBA/2 mice failed to reach levels of classical activation (M1) similar to those of C57BL/6 cells (Supporting Information Fig. 3). This could possibly explain their lower inflammasome activity and pyroptosis rates in response to *S. aureus* stimulation.

Finally, to extend these observations in the human context, we used human monocyte-derived macrophages (MDMs) to assess their ability to respond to *S. aureus* according to their polarization program. In vitro challenge of M1 MDM with *S. aureus* strongly activated the inflammasome pathway as reflected by the higher

levels of caspase-1 ($p < 0.05$), IL-1 β secretion ($p < 0.001$), and cell death ($p < 0.05$; Fig. 5F–H). These results were consistent with our previous findings and ultimately suggested that our observations in the murine model are applicable in humans.

Treatment of DBA/2 mice with inflammasome inducers promotes a C57BL/6-like inflammatory response

To establish a direct link between the different kinetics of pyroptosis observed in these mouse strains and their respective inflammatory responses, we treated susceptible DBA/2 mice with NLRP3 inflammasome inducers, nigericin, and adenosine triphosphate (ATP) [22]. Infected DBA/2 mice treated with nigericin or ATP showed a significant decrease of PerMF numbers compared with saline injected DBA/2 control mice, both at 30 and 60 min p.i. (Fig. 6A), reducing the number of resident macrophages down to that observed in C57BL/6 mice. As expected, the level of IL-1 β measured in nigericin and ATP-treated DBA/2 mice was similar to that observed in C57BL/6 mice injected with saline, and significantly increased ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) compared with that detected in untreated DBA/2 mice (Fig. 6B). Likewise, NF- κ B-related cytokines (i.e. TNF- α and IL-6; Fig. 6B) and chemokine (i.e. CXCL1) were dramatically decreased in DBA/2

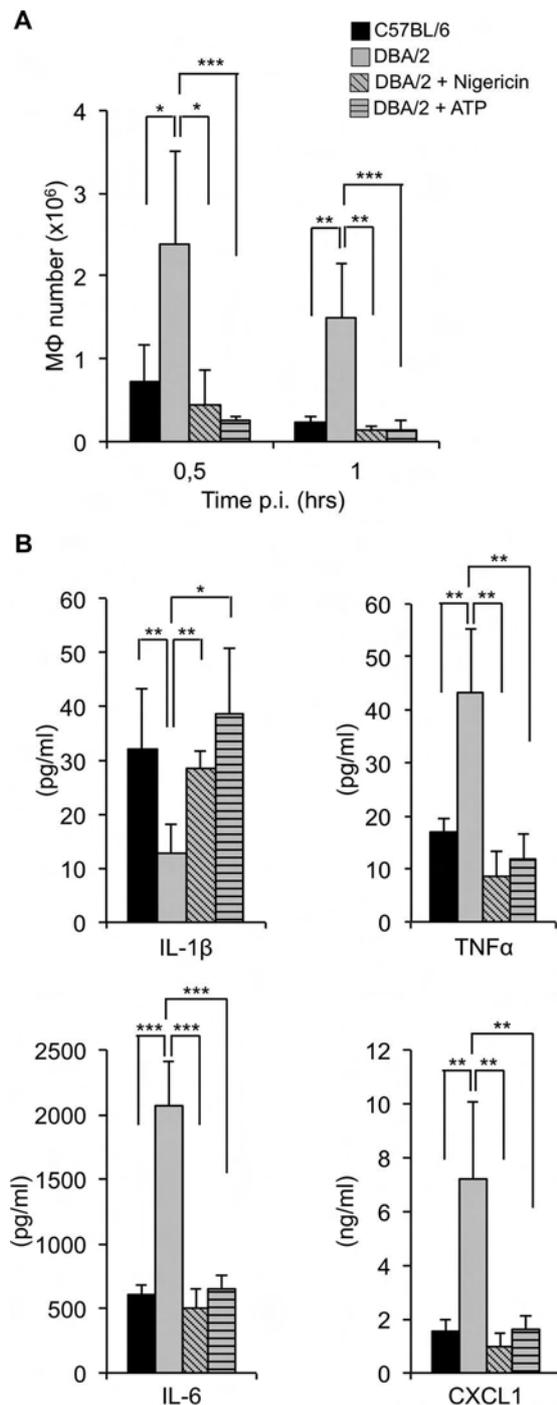


Figure 6. Inflammation stimulation in DBA/2 mice increases pyroptosis rates and modulates cytokine secretion by resident macrophages. DBA/2 mice were treated with nigericin (5 mg/kg) or ATP (25 mg/kg) 10 min after *S. aureus* i.p. infection (10^8 CFU/mice) and compared to vehicle (saline) injected and infected C57BL/6 and DBA/2 mice. ($n = 6$ mice per group for nigericin and $n = 3$ mice per group for ATP.) (A) Macrophages (F4/80^{high}CD11b^{high}) numbers in peritoneal exudates were determined by flow cytometry absolute counting system at 0.5 and 1 h p.i. (B) Cytokine secretion in peritoneal exudates was analyzed by ELISA. IL-1 β was quantified 30 min p.i., and TNF- α , IL-6, and CXCL1 were quantified at 60 min p.i. (A and B) Data are shown as mean \pm SD, $n = 6$ mice per group, pooled from two independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Student's *t*-test).

mice under treatment with either nigericin or ATP. These results confirmed that kinetics of PerMFs pyroptosis influence the inflammatory pattern of response against *S. aureus* infection. Following i.p. administration of a lethal dose of *S. aureus*, we compared survival of DBA/2 mice treated with nigericin or ATP with C57BL/6 and DBA/2 mice injected with saline. The administration of nigericin significantly improved the resistance of DBA/2 mice to *S. aureus* challenge compared to saline-injected DBA/2 animals (Supporting Information Fig. 4). However, nigericin treatment of DBA/2 susceptible mice did not restore a resistance level comparable to C57BL/6. Moreover, although a tendency was observed, ATP treatment did not statistically ameliorate the survival of DBA/2-infected mice (data not shown).

C57BL/6 and DBA/2 PMN exert similar bactericidal activity but have distinct cytokine production

In order to determine how the PMNs could differ between resistant and susceptible mice, we first evaluated their bactericidal activity prompted by the distinct efficiencies in local bacterial clearance between the two mouse strains. The bactericidal activity of BM-isolated naïve PMNs was not different (30% of dead bacteria) between the two genetic backgrounds (Fig. 7A). The preincubation of naïve PMNs with peritoneal exudates collected from C57BL/6 or DBA/2 mice 2 and 4 h after *S. aureus* challenge steadily improved the overall bactericidal activity up to 60% of dead bacteria (Fig. 7A). However, no difference was found in bactericidal activity of these PMNs. This demonstrated that the distinct inflammatory contexts we described in C57BL/6 and DBA/2 mice did not differentially alter the bactericidal activity of PMNs. In contrast, PMNs from C57BL/6 and DBA/2 mice greatly differed in terms of cytokines production. Indeed, PMNs isolated from C57BL/6 mice 4 h after *S. aureus* challenge produced higher amounts of IL-1 β compared with those from DBA/2 (Fig. 7B). Conversely, the proportion of IL-10-producing PMNs was significantly increased in DBA/2 mice (35.2%) compared with C57BL/6 (16.6%; $p < 0.01$; Fig. 7C). As the PMN numbers were similar between the two mouse strains at 4 h p.i., these results were highly consistent with the respective levels of these two antagonistic cytokines in peritoneal exudates (Fig. 2A).

Discussion

Here, we showed that *S. aureus* challenge induced a succession of early events resulting in distinct orchestrations of the inflammatory response in C57BL/6 and DBA/2 mice. Several clues support the hypothesis that these cellular and molecular events may participate to the regulation and issue of the disease.

First, our results demonstrate that, in response to *S. aureus* infection, resident PerMFs undergo an inflammasome-dependent necrotic proinflammatory cell death program presenting all features of pyroptosis [14, 23]. This result is in line with previous findings evidencing the triggering of inflammasome activity medi-

ated by *S. aureus* α -toxin in host macrophages [15, 22, 24]. Interestingly, pyroptosis of PerMFs occurred faster in C57BL/6 mice. Yet, the expression of ADAM10, the cell membrane receptor of *S. aureus* α -toxin, does not differ between the C57BL/6 or DBA/2 backgrounds and is not responsible for the differences in kinetics of macrophage necrosis [16, 25].

By measuring a set of genes informative on the M1/2 phenotype, we showed that, at steady state, C57BL/6 PerMFs have a higher basal expression of genes usually associated with the M1 phenotype [9, 20] than resident DBA/2 PerMFs. Conversely, the DBA/2 PerMFs displayed an increased expression of *Fizz1* and *Arginase-1* that are *bona fide* markers of M2 polarization [20]. Associated with PerMF reciprocal levels of caspase-1 activity, IL-1 β release and loss of cell membrane integrity, these data suggested that *S. aureus*-induced inflammasome activity and subsequent pyroptosis were possibly linked with macrophage basal phenotype. Indeed, differences in inflammasome activation and induction of inflammasome-mediated cell death between M1 and M2 macrophages in response to purogenic stimulation have been reported [26]. In line with this finding, our study showed that, upon *S. aureus* stimulation, M1-polarized murine BMDMs or human MDMs had increased caspase-1 activity together with a higher release of IL-1 β and loss of cell membrane integrity compared with the M2 program. Taken together, these data demonstrate that the ability of *S. aureus* to trigger the activation of the inflammasome complex and pyroptosis is linked with the basal profile of resident macrophages, which appears intrinsically different in the two genetic backgrounds.

Second, we correlate the molecular and cellular components of the early inflammatory response to *S. aureus*-induced pyroptosis in resident macrophages. Our results demonstrate that, beyond the early release of IL-1 β , a major consequence of *S. aureus*-induced pyroptosis is to diminish the secretion of NF κ B signal-dependent proinflammatory cytokines by C57BL/6 PerMFs. By contrast, the extended survival of DBA/2 PerMFs allowed the production of substantial amounts of proinflammatory cytokines such as CXCL1, CXCL2, IL-6, and TNF- α , which are associated with *S. aureus*-induced sepsis and are considered as negative predictive biomarkers for sepsis outcome [27]. Using nigericin and ATP [22] concomitantly with *S. aureus* challenge to stimulate inflammasome pathway in DBA/2 mice, we brought further evidence that kinetics of pyroptosis influence the pattern of inflammatory cytokines secreted by peritoneal resident macrophages. Moreover, these pyroptosis-driven microenvironments could modulate differently the kinetics of PMN recruitment to the site of infection. During the early steps of inflammatory response, PMN recruitment was enhanced in C57BL/6 compared to DBA/2 mice. This was confirmed by *in vitro* chemotaxis assay using peritoneal exudates as chemoattractant. Surprisingly, despite lower amounts of CXC chemokines, peritoneal exudates from C57BL/6 showed higher chemotactic activity. However, macrophages lysis by pyroptosis releases a large amount of damage-associated molecular patterns that exert activating and chemotactic activities on other immune cells including PMNs [28]. Consequently, the earlier lysis of C57BL/6 PerMFs might explain the rapid and high PMN recruit-

ment in these mice. In the other hand, this discrepancy between C57BL/6 and DBA/2 mice was nullified at later time points of infection as the levels of CXC chemokines massively increased in DBA/2 mice. Notably, overproduction of CXC chemokines can have deleterious consequences for the host, including increased mortality, and impaired bacterial clearance [12, 29, 30]. However, the exact mechanism of how CXCL1 and CXCL2 act as deleterious factors during *S. aureus* infection remains to be elucidated. Importantly, the CFU determination along the kinetics of infection revealed an improved bacterial clearance in C57BL/6 mice. Our experiments demonstrated that C57BL/6 and DBA/2 naive PMNs had no intrinsic difference in bactericidal activity, at least in our *in vitro* conditions. Moreover, the priming of PMN with peritoneal exudates collected either from C57BL/6 or DBA/2 infected mice improved overall bactericidal activity of PMNs but in a similar extent between the two strains. These results are consistent with previous findings [6, 31] indicating that PMN from resistant and susceptible mice strains or models have similar killing activities against *S. aureus*. Rather, the early and enhanced PMN recruitment in C57BL/6 could efficiently dampen local bacterial multiplication as observed in other models of peritonitis-induced sepsis [32]. Beyond the magnitude of PMN recruitment into the infection site, our data also suggest that the pyroptosis-associated microenvironment could alter the phenotype of the recruited PMNs. While PMNs recruited into the peritoneal cavity of C57BL/6 mice had higher capacity to contribute to the local IL-1 β production, PMNs from DBA/2 mice became a significant source of IL-10. This is an important observation given that the role played by IL-1 β -producing neutrophils was demonstrated recently in abscess formation and host defense during *S. aureus* cutaneous infection [33]. By contrast, IL-10-producing PMNs are known to suppress inflammatory monocyte activities in polymicrobial sepsis, leading to impaired bacterial clearance and fatal outcome [34]. From our results, a striking parallel can be established with the study of Tsuda et al. [31] in which, phenotypically different PMN subsets were recruited according to the severity of systemic inflammatory response syndrome induced by burn injuries. PMNs recruited under a highly inflammatory context (severe systemic inflammatory response syndrome) secreted IL-10 and conferred susceptibility to *S. aureus* infection.

Finally, the treatment of DBA/2 mice with inflammasome inducers partially improved their survival to *S. aureus* infection but failed to restore resistance levels comparable with C57BL/6 mice. This result indicates that a delayed pyroptosis of resident macrophages is not the unique mechanism affecting the susceptibility of DBA/2 mice to *S. aureus* *i.p.* challenge. Rather, it promotes the creation of an exacerbated, and possibly unfavorable, inflammatory context that in conjunction with other immune defects affecting bacterial clearance in DBA/2 mice may lead to sepsis. Indeed, it was shown that deficiency in C5a complement component was likely participating in DBA/2 susceptibility to *S. aureus* infection [35]. However, the fact that C5a KO C57BL/6 remain as resistant as WT C57BL/6 mice upon intravenous or *i.p.* challenge with *S. aureus* [7] raises question about the precise contribution of this deficiency. Furthermore, our *in vitro* chemotaxis

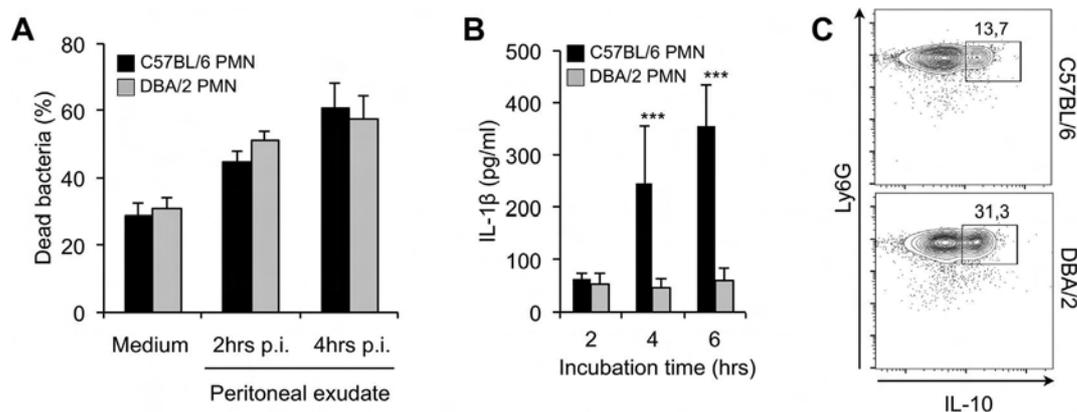


Figure 7. PMNs from C57BL/6 and DBA/2 mice share similar bactericidal activity but differ in cytokine production. (A) Bactericidal activity of naïve or primed, PMNs on *S. aureus* after 1 h of incubation (MOI 1:25). PMNs were isolated from BM of naïve mice. Priming was achieved by 1 h preincubation with peritoneal exudates collected from C57BL/6 or DBA/2 mice after 2 and 4 h of infection. Data are shown as mean + SD, $n = 6$ samples per time point and per strain, assayed in duplicate and pooled from two independent experiments. (B and C) PMNs (Ly6G^{Pos}) were isolated from the peritoneal cavity of C57BL/6 or DBA/2 mice 4 h after *S. aureus* i.p. challenge. (B) Ex vivo production of IL-1 β by isolated PMNs. Data are shown as mean + SD, $n = 3$ mice per strain from a single experiment representative of two independent experiments. *** $p < 0.001$ (Student's *t*-test). (C) Intracellular detection of IL-10 in isolated PMNs by flow cytometry. Proportions of IL-10-producing PMNs are indicated in squares. One dot plot representative of two independent experiments, each with $n = 3$ mice per strain, is shown.

assay suggested a possible defect in DBA/2 PMN motility but this result need further investigations to be fully established. Inversely, in C57BL/6, it remains to determine which part of the mechanism grants protection. On the one hand, IL-1 β secretion is known to play a crucial role during staphylococcal infection, especially in the cutaneous infection model, as evidenced by the striking susceptibility of IL-1 β - or IL-1R-deficient mice characterized by a severe impairment of PMN recruitment [8, 33]. Similarly, the high susceptibility of ASC (inflammasome component apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) deficient mice to *S. aureus* infection was attributed to the inability of these mice to secrete active IL-1 β resulting in a PMN recruitment defect [8, 36, 37]. Yet, *nlrp3*^{-/-} mice, presenting the same defects as ASC^{-/-} mice, showed improved survival to severe *S. aureus*-induced pneumonia. Consequently, according to the infected tissue site, the α -toxin-inflammasome axis may lead to different outcomes [38].

In conclusion, this study promotes the concept that, in relation with host genetics, the steady state phenotype of resident macrophages influences the early orchestration of inflammatory response induced by *S. aureus* infection via the inflammasome pathway and subsequent pyroptosis. Undoubtedly, understanding of the crosstalk between resident macrophages, recruited PMN and inflammatory monocytes and the way these cells synergize or antagonize to regulate inflammation during bacterial infections, should open new avenues on the prevention of immunopathology associated with *S. aureus* infection.

Materials and methods

Ethics statement

All animal experiments were performed in accordance with Federation of European Laboratory Animal Science Association

(FELASA) guidelines. These experiments were performed by FELASA accredited investigators (no. 311155580). Mice were housed in an accredited research animal facility of the National Veterinary College (Toulouse, France) that is fully staffed with trained husbandry, technical, and veterinary personnel. Every effort was made to minimize animal suffering and distress. Human monocytes were obtained from blood donors (Etablissement Français de Sang, EFS, Toulouse). For this report, written informed consents were obtained from the donors under EFS contract no. 21/PVNT/TOU/IPBS01/2009–0052. Following articles L1243–4 and R1243–61 of the French Public Health Code, the contract was approved by the French Ministry of Science and Technology (agreement no. AC 2009–921).

Preparation of bacterial cells

Staphylococcus aureus HG001 strain or a *gfp*-expressing mutant was grown overnight in TSB at 37°C with orbital shaking (200 rpm). This culture was further diluted 1:100 in TSB and grown to mid log phase (O.D. 600 nm ~ 1). Bacterial cells were pelleted (4000 rpm, 10 min, 4°C), washed two times in PBS, and resuspended in physiological serum. Bacterial concentration was estimated by measuring the absorbance at 600 nm ($OD_{600} = 1$ for $\sim 5 \times 10^8$ CFU/mL) and confirmed by serial dilution in PBS-Tween 20 (0.05%) plated on Chapman-Agar for CFU determination. Bacterial colonies were numbered after 24-h incubation at 37°C. Bacteria were prepared freshly before each experiment and adjusted to the desired concentration.

Mouse strains and infection model

Naïve C57BL/6J and DBA/2J, specific pathogen-free (SPF status), 8- to 12-week-old female mice were purchased from Janvier Labs

(St Berthevin, France). Age matched mice were inoculated via i.p. route with a lethal dose of 2×10^8 CFU/mouse or sublethal dose of 1×10^8 CFU/mouse of freshly prepared bacteria. On the age period used for this study, C57BL/6 and DBA/2 mice did not present any significant difference in body weight. In vivo stimulation of inflammasome in DBA/2 mice was performed by i.p. injection of Nigericin (Invivogen, Cayla, France) at 5 mg/kg or ATP (Invivogen) at 25 mg/kg, in physiological serum, 10 min after *S. aureus* i.p. challenge. Untreated C57BL/6 and DBA/2 mice received physiological serum alone. After infection, mice were monitored for assessing pain/distress and severity of clinical signs including rough hair coat, irregular ambulation/immobility, abnormal posture, dyspnea, closed/semiclosed eyes, and abdominal constrictions. The recording of four clinical signs among those culminated in the early euthanasia of the animal. Otherwise mice were sacrificed at indicated time points by cervical dislocation.

PerCs collection, macrophage flow cytometry analysis, and cell sorting

The peritoneal cavity was washed by the injection of 5 mL of PBS, heat-inactivated FBS 0.2%, EDTA 5 mM buffer. After recovery, peritoneal washes were centrifuged (300g, 5 min) and supernatants filtrated, added with complete protease inhibitor cocktail (Roche, France) and stored at -80°C for further analysis. PerCs numbers were determined by flow cytometry absolute counting system (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec). Cells were preincubated with anti-CD16/CD32 (Biolegend, Ozyme, France) to block Fc γ RII/III receptors and then incubated with mAbs (see below). Cellular viability was assessed with 7-AAD (Biolegend) labeling. The acquisition was done with FACSCalibur (Becton Dickinson, France) or MACSQuant (Miltenyi Biotec, Germany) flow cytometers under CellQuest or MACSQuantify software, respectively. For every analysis, $1\text{--}2 \times 10^4$ cells were acquired. Data were analyzed with FlowJo (Tree Star, USA) software.

The following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies were used: anti-Ly6C (HK1.4), Ly6G (1A8), CD45R/B220 (RA3-6B2), CD49b (DX5), CD3 ϵ (145-2C11), CD11b (M1/70), Adam10 (139712), CD115 (CSF-1R), F4-80 (CI: A3-1). Antibodies were purchased from Biolegend, AbD serotec (for anti-F4-80), or R&D Systems (for anti-Adam10). Macrophage isolation was performed using a FACS Aria III cell sorter (BD Biosciences, USA) with a gating on F4-80^{Pos}, Ly6C^{Low}, CD115^{Pos}, CD11b^{Pos} cells. A fraction of collected cells was kept for assessment of cell purity and viability. The gating strategy for acquisition, analysis, and sorting of resident PerMF and PMN is presented in Supporting Information Figure 1.

Macrophages culture and stimulation with live *S. aureus*

Resident PerCs were collected as described above and plated at a density of 5×10^5 cells/mL in 24-well tissue culture plate at 37°C

and 5% CO₂. After 24 h in culture, contaminating nonadherent cells are eliminated.

BMDMs were differentiated from BM precursors of C57BL/6 and DBA/2 mice and polarized to M1 or M2 as described elsewhere [26, 39]. In brief, BMDMs were primed with fresh medium supplemented with IFN- γ (Peprotech, Tebu, France; 20 ng/mL) and ultrapure LPS (*Escherichia coli* O111:B4, InvivoGen, France; 1 $\mu\text{g/mL}$) for 4 h to polarize toward M1 program. IL-4 (Peprotech; 20 ng/mL) was used for 4 h to differentiate to M2 phenotype.

Human monocytes were prepared following a previously published procedure [40]. Isolated monocytes were cultured for 5 days RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS (Pan-Biotech, Germany), 1% sodium pyruvate, and 0.1% β -mercaptoethanol (Invitrogen, Gibco), and human M-CSF (Miltenyi Biotec) at 20 ng/mL. To induce the alternative (M2) polarization program, the medium was supplemented at day 5 with human M-CSF at 10 ng/mL and IL-4 (Miltenyi Biotec) at 20 ng/mL. To induce the classic (M1) polarization program, the old medium was replaced with fresh medium containing human GM-CSF (Miltenyi Biotec) at 20 ng/mL, and then supplemented 24 h later with IFN- γ (Miltenyi Biotec) at 2.5 ng/mL and LPS (*E. coli* O55:B5, Sigma) at 1 $\mu\text{g/mL}$. All MDMs were used for experiments at day 7.

Macrophages were stimulated with HG001 *S. aureus* at a multiplicity of infection (MOI) of bacteria to macrophages of 25:1 and culture supernatants were harvested, filtrated, added with complete protease inhibitor cocktail (Roche), and stored at -80°C . When needed, cells were lysed in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -80°C for further gene expression analysis or harvested with Cell Dissociation Solution Non-enzymatic (Sigma-Aldrich, France) and further processed for flow cytometry analysis.

Assessment of macrophage cell death

Analysis of macrophages cell death was conducted as follows. LDH activity was detected in freshly collected peritoneal exudates (2.5 mL) using the LDH cytotoxicity assay Kit (Cayman Chemical, USA) as directed by the manufacturer's instructions. Cell viability and pore formation in the plasma membrane of macrophages were investigated by monitoring the cell permeability to EtBr 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich), 7-AAD, and Annexin V (Biolegend). Finally, the caspase-1 activity was detected in macrophages using the FAM-FLICA Caspase 1 assay kit (Immunochemistry, A&DSerotec, UK) as recommended by manufacturer and analyzed with flow cytometry.

Detection of gene expression by RT-PCR analysis

Total RNA was purified from PerMF cell sorted from healthy mice or from cultured macrophages using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. The yield and the purity were estimated spectrophotometrically at 260 and 280 nm. Total RNA (200 ng) was used for the generation of cDNA with SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix Kit (Invitrogen). For polarized macrophages, PCR amplification reaction was

performed with ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) and Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for *inos* and *Il-12* genes (M1) and *Arginase-1* and *Fizz1* genes (M2; RPL9 as housekeeping gene). For PerMF, PCR amplification reaction was performed with Biomark HD System (Fluidigm, France) at the genotyping service platform GeT-PlaGe (INRA, Toulouse, France) and as recommended by manufacturer. The primers used were designed with Primer3plus software (Supporting Information Table 1). Most stable housekeeping genes (*Hprt1*, *Rpl9*, *Sdha*, and *Ywhaz*) were determined using GenNorm software and used to normalize expression of target genes. For gene expression analysis of PerMF collected at steady state from healthy mice, we used normalized relative mRNA concentrations of target genes to calculate an expression ratio as follows: mRNA relative concentration of target gene in individual C57BL/6/mRNA relative concentration of target gene in mean DBA/2, and inversely. Otherwise, the relative expression of target genes was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and the fold increase in expression was relative to untreated macrophages of each mouse strains.

Measurement of cytokine/chemokines production

Quantification of cytokine production was achieved using customized multiplex (Milliplex-MAP, Merck Millipore, France) assay kit and Luminex 100 IS instrument (Luminex, USA) available at the phenotyping service platform Anexplo (CHU Rangueil, Toulouse, France). Twelve cytokines were systematically assayed in peritoneal exudates: G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-10, IL-6, CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, and TNF- α . Individual cytokine detection kits were also used to quantify mouse IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Biolegend), mouse CXCL-1 (R&D, France), and human IL-1 β (Affimetrix, eBioscience, France).

Neutrophils isolation and functional assessment

BM or peritoneal PMNs were isolated from C57BL/6 or DBA/2 mice by positive selection using anti-Ly6G MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, France) and the purity and viability were assessed by flow cytometry (>85% and >95%, respectively).

Chemotaxis assay were performed using 96-transwell plate with 3 μ m pore size polycarbonate membrane (Corning, life-science, USA). PMNs (5×10^6 per mL) were seeded in the upper chamber of the transwell. Supernatants of PerMF culture, sterile or infected with *S. aureus* (MOI 25:1), or peritoneal exudates from C57BL/6 or DBA/2 infected mice were placed into the lower compartment. Random migration was assessed using medium (RPMI1640 supplemented with 10% FCS) in place of supernatants. After 30 min, absolute numbers of migrated neutrophils were determined by flow cytometry using MACSQuant Analyzer. For bactericidal activity assessment, BM naïve PMN was preincubated with culture medium alone or conditioned with 20% peritoneal exudates collected at indicated time points from C57BL/6 or DBA/2 mice challenged with *S. aureus*. Bacteria (HG001-gfp)

were added in the culture at an MOI of 25 to 1 PMN and incubated for a supplemental hour. PMNs were lysed by addition of Triton-x100 (0.1% final) in the culture. Dead bacteria were labeled with propidium iodide and live/dead bacteria proportions estimated by flow cytometry.

Peritoneal PMNs were isolated 4 h after i.p. challenge with *S. aureus* and cultured in RPMI1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS for 2, 4, or 6 h without further stimulus. IL-1 β production was determined by ELISA. For cytometrical assessment of IL-10 production, isolated peritoneal PMNs were incubated for 4 h with GolgiPlug (1 μ L/1 $\times 10^6$ cells; BD Biosciences), fixed, permeabilized using Cytofix/cytoperm Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions and stained with the A647 anti-mouse IL-10 or A647 Rat IgG2b isotype control (Biolegend).

Statistical analysis

Data were analyzed by using XLStat2013 (Addinsoft, France). Unless otherwise specified, all data are presented as mean \pm SD. Comparison between groups was made by use of a variance analysis and Student's *t*-test. Comparison of survival curves was performed by use of log rank test. *p* Values < 0.05 were considered as significant (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). To compute the hierarchical (Euclidian distances) ascendant clustering, algorithm XLStat2013 was used.

Acknowledgments: We thank the Genotoul technical platform (Toulouse, France) and specifically Dr. Fatima-Ezzahara L'Faqihi-Olive (INSERM, U563-CPTP, CHU Purpan) for her expertise with cell sorting at Imagerie-Tri platform, Dr. Y. Lippy for determining ARN quality at Trix platform (INRA, Toxalim), Drs. C. Donnadieu and C. Genthon (INRA, Plateforme Genomique) for genes expression analysis using Biomark HD system (Fluidigm), and Dr. Laurent Monbrun for cytokines and chemokines production measurement using Luminex technology at the phenotyping service of Anexplo platform. We thank Dr. T. Msadek (Institut Pasteur, Biology of Gram Positive Pathogens Unit, Paris France) for his kind gift of *S. aureus* strains used in this study. S. Accarias was founded by the French ministry of Agriculture and National Institute for Agricultural Research.

Conflict of interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

References

- Lowy, F. D., *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998. 339: 520–532.

- 2 Lowy, F. D., Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 2003. 111: 1265–1273.
- 3 Herold, B. C., Immergluck, L. C., Maranan, M. C., Lauderdale, D. S., Gaskin, R. E., Boyle-Vavra, S., Leitch, C. D. et al., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 1998. 279: 593–598.
- 4 Maree, C. L., Eells, S. J., Tan, J., Bancroft, E. A., Malek, M., Harawa, N. T., Lewis, M. J. et al., Risk factors for infection and colonization with community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Los Angeles County Jail: a case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 2010. 51: 1248–1257.
- 5 Pate, K. R., Nolan, R. L., Bannerman, T. L. and Feldman, S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *Lancet* 1995. 346: 978.
- 6 Von Köckritz-Blickwede, M., Rohde, M., Oehmcke, S., Miller, L. S., Cheung, A. L., Herwald, H., Foster, S. et al., Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe *Staphylococcus aureus* infection in the mouse model. *Am. J. Pathol.* 2008. 173: 1657–1668.
- 7 Ahn, S. H., Deshmukh, H., Johnson, N., Cowell, L. G., Rude, T. H., Scott, W. K., Nelson, C. L. et al., Two genes on A/J chromosome 18 are associated with susceptibility to *Staphylococcus aureus* infection by combined microarray and QTL analyses Wessels MR, ed. *PLoS Pathog.* 2010. 6: e1001088.
- 8 Miller, L. S., Pietras, E. M., Uricchio, L. H., Hirano, K., Rao, S., Lin, H., O'Connell, R. M. et al., Inflammasome-mediated production of IL-1 β is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J. Immunol.* 2007. 179: 6933–6942.
- 9 Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A and Locati, M., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004. 25: 677–686.
- 10 Lekstrom-Himes, J. A. and Gallin, J. I., Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 2000. 343: 1703–1714.
- 11 Lowrance, J. H., O'Sullivan, F. X., Caver, T. E., Waegell, W. and Gresham, H. D., Spontaneous elaboration of transforming growth factor beta suppresses host defense against bacterial infection in autoimmune MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* 1994. 180: 1693–1703.
- 12 Gresham, H. D., Lowrance, J. H., Caver, T. E., Wilson, B. S., Cheung, A. L. and Lindberg, F. P., Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* 2000. 164: 3713–3722.
- 13 Schiwon, M., Weisheit, C., Franken, L., Gutweiler, S., Dixit, A., Meyer-Schwesinger, C., Pohl, J. M. et al., Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell* 2014. 156: 456–468.
- 14 Bergsbaken, T., Fink, S. L. and Cookson, B. T., Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. 7: 99–109.
- 15 Craven, R. R., Gao, X., Allen, I. C., Gris, D., Wardenburg, J. B., McElvania-TeKippe, E., Ting, J. P. et al., *Staphylococcus aureus α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells Ratner AJ, ed. *PLoS ONE* 2009. 4: e7446.*
- 16 Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G. A., Powers, M. E., Frank, K. M., Wang, Y. and Bubeck Wardenburg, J. A., *Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat. Med.* 2011. 17: 1310–1314.*
- 17 Kebaier, C., Chamberland, R. R., Allen, I. C., Gao, X., Broglie, P. M., Hall, J. D., Jania, C. et al., *Staphylococcus aureus α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J. Infect. Dis.* 2012. 205: 807–817.*
- 18 Lopez-Castejón, G., Baroja-Mazo, A. and Pelegrín, P., Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010. 68: 3095–3107.
- 19 Lefèvre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olganier, D., Authier, H., Duval, C. et al., The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 2013. 38: 1038–1049.
- 20 Sica, A. and Mantovani, A., Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 2012. 122: 787–795.
- 21 Wynn, T. A., Chawla, A. and Pollard, J. W., Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013. 496: 445–455.
- 22 Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P. et al., Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006. 440: 228–232.
- 23 Miao, E. A., Leaf, I. A., Treuting, P. M., Mao, D. P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S. E. et al., Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.* 2010. 11: 1136–1142.
- 24 Munoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L. S. and Nunez, G. A., Critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol.* 2009. 183: 3942–3948.*
- 25 Abtin, A., Jain, R., Mitchell, A. J., Roediger, B., Brzoska, A. J., Tikoo, S., Cheng, Q. et al., Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat. Immunol.* 2014. 15: 45–53.
- 26 Pelegrin, P. and Surprenant, A., Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *EMBO J.* 2009. 28: 2114–2127.
- 27 Van den Berg, S., Laman, J. D., Boon, L., ten Kate, M. T., de Knegt, G. J., Verdijk, R. M., Verbrugh, H. A. et al., Distinctive cytokines as biomarkers predicting fatal outcome of severe *Staphylococcus aureus* bacteremia in mice Cormier SA, ed. *PLoS ONE* 2013. 8: e59107.
- 28 LaRock, C. N. and Cookson, B. T., Burning down the house: cellular actions during pyroptosis. *PLoS Pathog.* 2013. 9: e1003793.
- 29 McLoughlin, R. M., Solinga, R. M., Rich, J., Zaleski, K. J., Cocchiari, J. L., Risley, A., Tzianabos, A. O. et al., CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. 103: 10408–10413.
- 30 Anwar, S., Prince, L. R., Foster, S. J., Whyte, M. K. B. and Sabroe, I., The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 2009. 157: 216–224.
- 31 Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N. and Suzuki, F., Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 2004. 21: 215–226.
- 32 Craciun, F. L., Schuller, E. R. and Remick, D. G., Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *J. Immunol.* 2010. 185: 6930–6938.
- 33 Cho, J. S., Guo, Y., Ramos, R. I., Hebroni, F., Plaisier, S. B., Xuan, C., Granick, J. L. et al., Neutrophil-derived IL-1 β is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice DeLeo FR, ed. *PLoS Pathog.* 2012. 8: e1003047.
- 34 Ocuin, L. M., Bamboat, Z. M., Balachandran, V. P., Cavnar, M. J., Obaid, H., Plitas, G. and DeMatteo, R. P., Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 2010. 89: 423–432.
- 35 Von Köckritz-Blickwede, M., Konrad, S., Foster, S., Gessner, J. E. and Medina, E., Protective role of complement C5a in an experimental

- model of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Innate Immun.* 2010. **2**: 87–92.
- 36 Miller, L. S., O'Connell, R. M., Gutierrez, M. A., Pietras, E. M., Shahangian, A., Gross, C. E., Thirumala, A. et al., MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 2006. **24**: 79–91.
- 37 Hultgren, O. H., Svensson, L. and Tarkowski, A., Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 2002. **168**: 5207–5212.
- 38 Becker, R. E. N., Berube, B. J., Sampedro, G. R., DeDent, A. C. and Bubeck Wardenburg, J., Tissue-specific patterning of host innate immune responses by *Staphylococcus aureus* α -toxin. *J. Innate Immun.* 2014. **6**: 619–631.
- 39 Mosser, D. M. and Zhang, X., Activation of Murine Macrophages. In Coligan, J. E., Bierer, B. E., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. (Eds.), *Current protocols in immunology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA 2008. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1402s83> [Accessed April 2, 2013].
- 40 Tailleux, L., Gicquel, B. and Neyrolles, O., DC-SIGN, a key receptor of *Mycobacterium tuberculosis*?. *Méd. Sci.* 2003. **19**: 658–660.

Abbreviations: ATP: adenosine-5'-triphosphate · BMDM: BM-derived macrophage · EtBr: ethidium bromide · LDH: lactate dehydrogenase · MDM: monocytes derived macrophage · MOI: multiplicity of infection · PerCs: peritoneal cells · PerMF: peritoneal macrophage

Full correspondence: Dr. Guillaume Tabouret, National veterinary College, Joint Unit 1225 – 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France
Fax: +(33) 05.61.19.39.75
e-mail: g.tabouret@envt.fr

Additional correspondence: Dr. Séverine Boullier, National veterinary College, Joint Unit 1225 – 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France
e-mail: s.boullier@envt.fr

Received: 4/8/2014

Revised: 6/11/2014

Accepted: 28/11/2014

Accepted article online: 4/12/2014

2- Résultats complémentaires

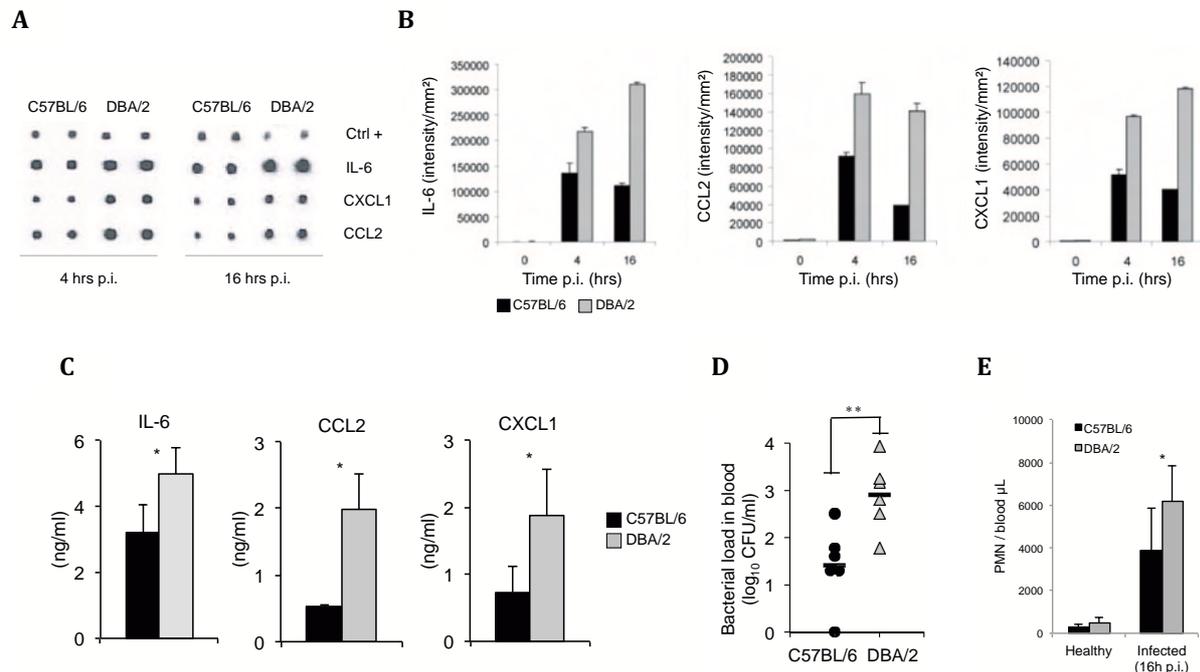


Figure 1

1- Les souris DBA/2 présentent toutes les caractéristiques du choc septique.

Les infections non résolutes à *S. aureus* résultent généralement en la formation d'abcès disséminés ou en un choc septique léthal. Nous avons donc déterminé, suite à l'infection i.p. avec 10^7 CFU/g de *S. aureus* HG001, si les souris DBA/2, comparées aux souris C57BL/6, présentent les paramètres communs du choc septique, tels que des niveaux élevés de cytokines (IL-6) et de chimiokines (CXCL1), une charge bactérienne élevée et une abondance de neutrophiles dans le sang. Par une approche de criblage d'anticorps semi quantitative, nous avons analysé la sécrétion cytokinique dans les exsudats péritonéaux à 4hrs et 16hrs p.i. et la densité des spots a été normalisés par un contrôle interne positif pour chaque membrane (Fig 1A et B)(n=5 souris par groupe). Les résultats indiquent que les niveaux d'IL-6, CXCL-1 et CCL2 sont plus élevés dans les souris DBA/2 que dans les souris C57BL/6, à 4hrs et 16hrs p.i.. Cette différence de production de cytokines pro-sepsis entre ces 2 lignées de souris a aussi été confirmée par un ELISA quantitatif à 16hrs p.i. (Fig 1C) (Les barres représentent la moyenne \pm SD, n=6 souris par groupe ; * p<0,05). Nous avons ensuite quantifié la charge bactérienne dans le sang après une série de dilution des échantillons sanguins à 16hrs p.i., étalés sur gélose Chapman (Fig 1D). Les souris DBA/2 ont un niveau significativement (**p<

0,01) plus élevé de CFU à 16hrs p.i. comparé aux souris es. Finalement, nous avons déterminé par cytométrie de flux la proportion de neutrophiles sanguins (caractérisés par l'expression de CD11b et Ly6G), et une granulocytose plus importante a été confirmée dans les souris DBA/2 à 16hrs p.i. (Fig 1E) (*p<0,05). L'ensemble de ces résultats démontre clairement que les souris DBA/2 sont incapables de contrôler la bactériémie et développent un choc septique léthal suite à l'infection i.p. avec 10^7 CFU/g de *S. aureus* HG001.

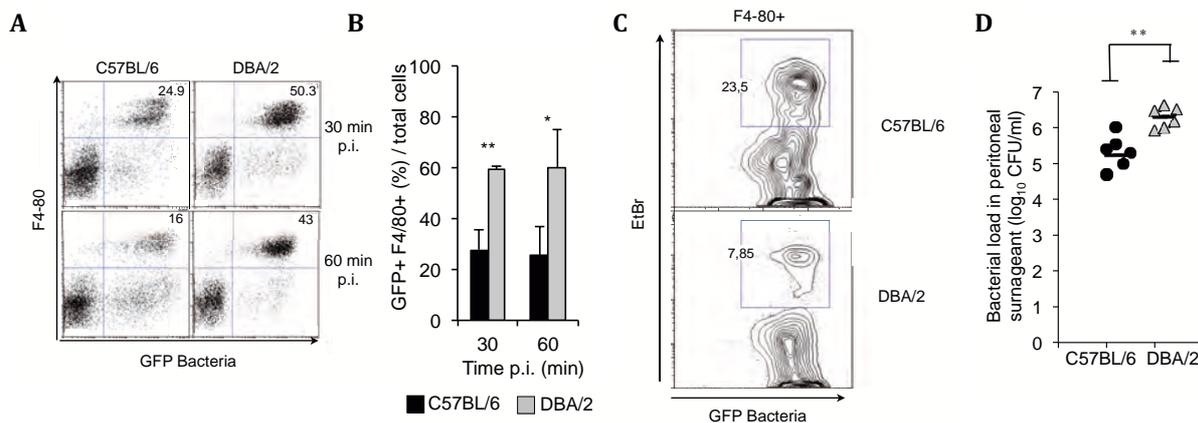


Figure 2

2- La clairance bactérienne diffère significativement entre les souris DBA/2 et C57BL/6.

Les résultats observés à 16 hrs p.i. suggèrent un contrôle précoce de la charge bactérienne dans les souris C57BL/6 comparée aux souris DBA/2. En utilisant une souche HG001 produisant la GFP, nous avons suivi en premier lieu l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux (PerMF) dans les temps précoces après une infection i.p. avec 10^7 CFU/g de *S. aureus*. L'analyse par cytométrie de flux montre que, dès 30 min p.i., la totalité des PerMF (F4-80^{Pos}) sont GFP^{Pos} (Fig 2A) (n=3 souris par groupe), suggérant que leur activité phagocytaire est similaire entre les 2 lignées de souris. Pourtant, le nombre total de F4-80^{Pos} GFP^{Pos} est significativement plus faible dans les souris C57BL/6 (Fig 2B) (Les barres représentent la moyenne \pm SD ; n=6 souris à 30 min p.i., n=3 souris à 1hrs p.i., par lignée ; *p<0,05 ; **p<0,01). Cette différence s'explique par la proportion significativement plus élevée de ces cellules (F4-80+) en état de mort cellulaire (EtBr+) dans les souris C57BL/6 (Fig 2C) (n=3 souris par groupe). En fait, non seulement la proportion de F4-80^{Pos} GFP^{Pos} est significativement plus élevée dans les souris DBA/2, mais ils séquestrent aussi la bactérie plus longtemps comparé aux PerMF des souris C57BL/6 (Fig 2B). En parallèle, le nombre plus faible de PerMF avec des bactéries intracellulaires est associé à une charge bactérienne extracellulaire moindre dans les souris C57BL/6, comme démontré par la quantification des CFU bactériens dans les exsudats péritonéaux 30 min p.i. (Fig 2D) (n=6 souris par groupe ; **p<0,01). Ces résultats soulignent l'effet bactéricide de la pyroptose précédemment reporté [1–3].

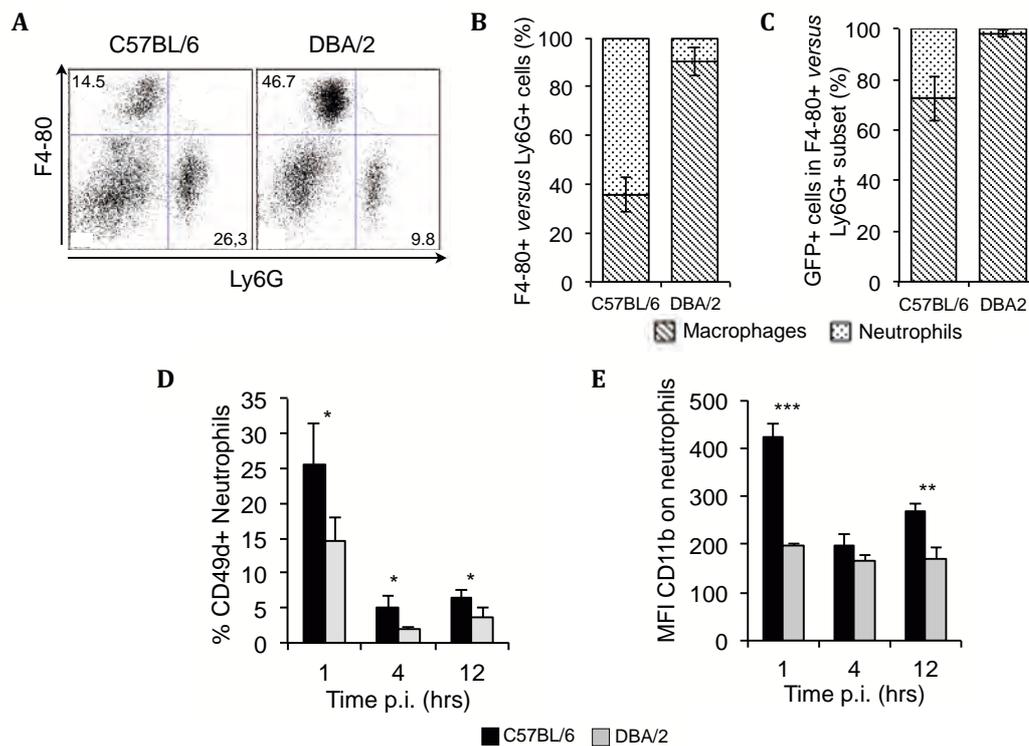


Figure 3

3- La prise en charge de *S. aureus* et le phénotype des neutrophiles recrutés sont différents selon la lignée de souris

Les neutrophiles sont des effecteurs centraux dans les infections par *S. aureus*. Après activation, ils présentent une forte capacité phagocytaire et de destruction des pathogènes [4]. Nous avons donc dans un premier temps évalué la prise en charge de la bactérie par les cellules de la cavité péritonéale dans les temps précoces, après une infection i.p. avec 10^7 CFU/g de *S. aureus* HG001 produisant la GFP (n=6 souris par groupe). Comme l'indiquent les résultats obtenus par cytométrie de flux (Fig 3A), le recrutement neutrophilique ($Ly6G^{Pos}F4-80^{Neg}$) est plus précoce (1hrs p.i.) dans la souris C57BL/6 comparé à la souris DBA/2. A 1 hrs p.i., les neutrophiles ($CD11b^{Pos}Ly6G^{Pos}$) représentent environ 64% des cellules phagocytaires ($CD11b^{Pos}, Gr-1^{Pos}$) dans les exsudats péritonéaux des souris C57BL/6, alors qu'ils représentent moins de 10% dans les souris DBA/2 (Fig 3B). Par ailleurs, dès que les neutrophiles sont recrutés, on observe une modification de la répartition des bactéries intracellulaires entre les cellules phagocytaires. A 1hrs p.i., les neutrophiles des souris C57BL/6 ont déjà commencé à phagocyter *S. aureus*, lesquels représentent environ 25% des cellules GFP^{Pos} (Fig 3C). En revanche, la majorité des cellules phagocytaires dans les souris DBA/2 sont toujours des macrophages péritonéaux ($F4-80^{Pos}Ly6G^{Neg}GFP^{Pos}$) (plus de 98%). Ces résultats indiquent que, précocement après l'infection, le recrutement rapide de

neutrophiles observé dans les souris C57BL/6 participe au contrôle de la croissance locale de la bactérie en association avec la pyroptose des PerMF.

Récemment, il a été reporté que différents sous-ensembles de neutrophiles, distingués par la présence ou l'absence de l'expression de CD49d (VLA-4), influençaient le devenir de l'infection par *S. aureus* dans un modèle murin de syndrome de réponse inflammatoire sévère [5]. Dans ce modèle animal, les neutrophiles CD49d^{Pos} étaient associés à la résistance à l'infection par *S. aureus*. Pour évaluer si les différents sous-ensemble de neutrophiles jouent un rôle dans notre modèle d'infection, nous avons dans un second temps analysé plus précisément le phénotype des neutrophiles recrutés dans les souris C57BL/6 et DBA/2 après une infection i.p. avec 10⁷ CFU/g de *S. aureus* HG001. L'analyse par cytométrie de flux révèle le recrutement de 2 sous-ensembles de neutrophiles discriminés par l'expression de CD49d. De façon intéressante, parmi la totalité des neutrophiles présents dans la cavité péritonéale, une plus grande proportion de neutrophiles exprime CD49d à leur surface dans les souris C57BL/6 (Fig 3D) (Les barres représentent la moyenne ± SD, n=6 souris par groupe ; * p<0,05). Cette différence est statistiquement significative durant toute la phase de recrutement. Dans un contexte similaire, la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) de l'expression de CD11b est aussi significativement plus élevée sur les neutrophiles des souris C57BL/6 (Fig 3E) (Les barres représentent la moyenne ± SD, n=6 souris par groupe ; ** p<0,01 ; *** p<0,001). Ces différences phénotypiques suggèrent que le niveau d'activation de ces cellules n'est pas similaire entre les 2 lignées de souris.

L'ensemble de ces résultats démontre ainsi que la phase aigue de l'inflammation diffère significativement entre souris C57BL/6 et DBA/2 en termes de prise en charge de la bactérie, de la cinétique et du phénotype des neutrophiles recrutés.

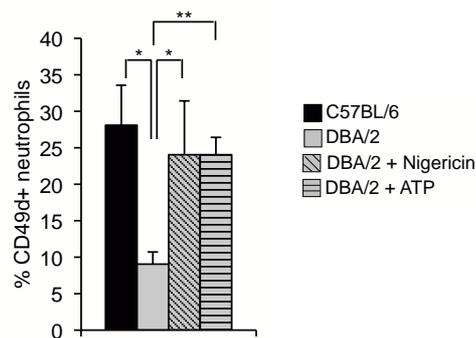


Figure 4

4- La cinétique de la pyroptose des PerMF suite à l'infection par *S. aureus* contrôle le phénotype des neutrophiles recrutés.

Pour établir un lien entre le phénotype des neutrophiles recrutés et les différentes cinétiques de pyroptose des PerMF des 2 lignées de souris, les souris DBA/2 ont été traitées avec des inducteurs de pyroptose, l'ATP ou la nigéricine, qui stimulent et augmentent l'activité de l'inflammasome [6], en combinaison avec 10^7 CFU/g de *S. aureus* HG001 en i.p.. L'analyse par cytométrie de flux montre que le recrutement de neutrophiles CD49d^{Pos} est significativement amélioré dans les souris DBA/2 traitées à la nigéricine ou à l'ATP, et que la proportion de ces cellules est comparable à celle observé dans les souris C57BL/6 (n=3 souris par groupe, *p<0,05 ; **p<0,01). Ainsi, l'induction précoce de la pyroptose des PerMF est un mécanisme crucial qui influence le recrutement de sous-ensembles spécifiques de neutrophiles.

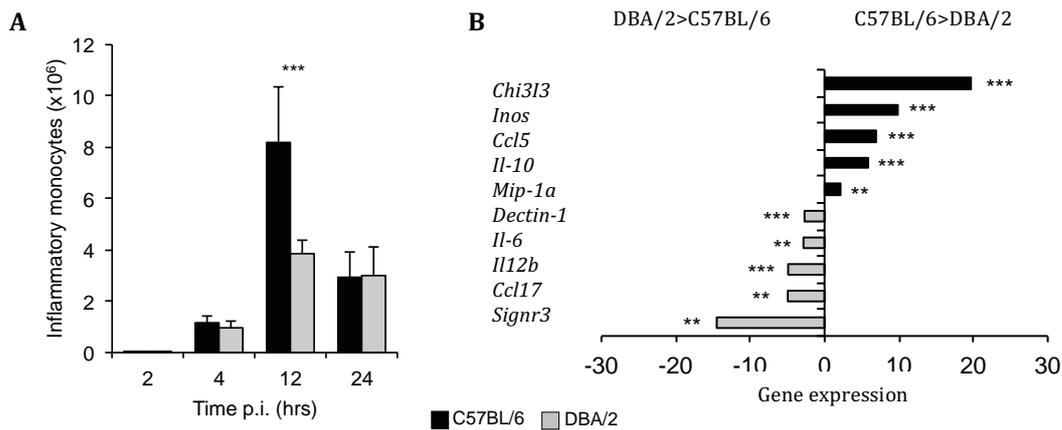


Figure 5

5- La cinétique de recrutement des monocytes et leur phénotype sont différents selon les 2 lignées de souris suite à l'infection par *S. aureus*.

Afin de compléter l'analyse du recrutement cellulaire suite à l'infection par *S. aureus* et au vu de l'importance des macrophages dérivés des monocytes dans la résolution de l'infection, nous avons analysé le recrutement monocytaire et leur expression génique suite à une infection i.p. avec 10^7 CFU/g de *S. aureus* HG001 (Les barres représentent la moyenne \pm SD, n = 5 souris par groupe). Les résultats obtenus par cytométrie de flux montrent un recrutement de monocytes (Ly6C^{high}, F4-80^{low}) dans les 2 lignées de souris dès 4hrs p.i. (Fig 4A) (**p<0,001). La quantité de monocytes augmente à 12 hrs p.i., cependant leur recrutement est doublé dans les souris C57BL/6 comparé aux souris DBA/2. Le nombre de monocytes dans la cavité péritonéale diminue ensuite à 24hrs p.i.. Afin de déterminer si on observe aussi des différences génétiques, nous avons ensuite analysé l'expression génique de ces monocytes recrutés à 16hrs p.i. par RT-QPCR à moyen débit (Biomark) après isolement au trieur de cellules. Les résultats indiquent que les monocytes recrutés sont différents en terme de gènes exprimés entre les 2 lignées de souris. La comparaison des gènes entre monocytes des souris C57BL/6 et DBA/2 montre 10 gènes différemment exprimés avec au moins un facteur 2 (Fig 4B). Les monocytes des souris C57BL/6 expriment de manière significativement plus élevée les gènes *Chi3l3*, *inos*, *ccl5*, *il-10* et *mip-1a* comparés aux monocytes des souris DBA/2, dont l'expression des gènes *Dectin-1*, *il-6*, *il-12b*, *ccl17* et *signr3* est significativement supérieure à celle des monocytes des souris C57BL/6 (**p<0,01 ; ***p<0,001). Ces résultats suggèrent que cette différence quantitative et génétique des monocytes recrutés est probablement liée aux différences de réponses observées dans la phase aigüe de l'inflammation qui vont conditionner le recrutement ultérieur et le phénotype des cellules mononucléées.

Références :

1. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT (2009) Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7: 99–109. doi:10.1038/nrmicro2070.
2. Bergsbaken T, Fink SL, den Hartigh AB, Loomis WP, Cookson BT (2011) Coordinated Host Responses during Pyroptosis: Caspase-1-Dependent Lysosome Exocytosis and Inflammatory Cytokine Maturation. *J Immunol* 187: 2748–2754. doi:10.4049/jimmunol.1100477.
3. Sokolovska A, Becker CE, Ip WKE, Rathinam VAK, Brudner M, et al. (2013) Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. *Nat Immunol* 14: 543–553. doi:10.1038/ni.2595.
4. Mayer-Scholl A (2004) How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* 7: 62–66. doi:10.1016/j.mib.2003.12.004.
5. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, et al. (2004) Three Different Neutrophil Subsets Exhibited in Mice with Different Susceptibilities to Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 21: 215–226.
6. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228–232. doi:10.1038/nature04515.

B- Article 2

1- Présentation du travail

Les macrophages représentent une population cellulaire hétérogène qui réside dans tous les tissus du corps où ils sont capables d'assumer une grande variété de fonctions immunitaires. Ils ont un rôle dans le développement, l'homéostasie, l'initiation et la résolution de l'inflammation. Les macrophages peuvent être classifiés selon un spectre de fonctions dépendant de leurs localisations tissulaires et des signaux du microenvironnement. Les phénotypes de polarisation des macrophages sont représentés par les macrophages pro-inflammatoires (M1) et les macrophages anti-inflammatoires (M2) qui représentent les extrémités d'un continuum d'activation. Selon leur profil d'activation, ces cellules ont été impliquées dans le contrôle des pathogènes et dans l'initiation des processus inflammatoires, ou, à l'inverse, dans la régulation de ces processus suivie de la restauration de l'homéostasie tissulaire. Les macrophages jouent également un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des tissus à l'état basal.

Au cours de nos précédents travaux nous avons utilisé les macrophages péritonéaux résidents afin de modéliser *in vivo* les interactions entre macrophage et *Staphylococcus aureus*. Au cours de cette étude nous avons tenté de définir le phénotype de macrophages résidents de la cavité péritonéale car nous suspicions l'existence de différences entre cellules selon leur origine génétique (lignée de souris C57BL/6 ou DBA/2). Très rapidement, nous nous sommes aperçus que malgré l'utilisation de la cavité péritonéale en tant que site de prédilection pour modéliser certaines infections ou certains processus inflammatoires, il était relativement difficile de trouver une caractérisation précise des macrophages résidents à l'état basal. En effet, au-delà du très largement répandu protocole d'induction au thioglycolate, peu de données étaient disponibles sur ce phénotype. Par ailleurs, les quelques études réalisées laissaient à penser que ce type de protocole visant à induire le recrutement des macrophages afin d'en récolter de grands nombres n'était pas sans conséquences sur leur phénotype.

De plus, de récents travaux ont permis de mettre en évidence au sein de cette population de macrophage une hétérogénéité jusqu'alors insoupçonnée. Deux sous-populations de macrophages résidents (Large ou Small Peritoneal Macrophages, LPM et SPM) se distinguent selon des critères de taille et d'expression de marqueurs caractéristiques des macrophages (F4-80 et CD11b essentiellement) mais aussi du CMH-II. A l'issue de ces quelques études [1,2], plusieurs questions subsistaient quant au phénotype précis, la fonction et l'origine de ces deux sous-populations. Ainsi, dans une tentative de clarifier certains de ces points, nous avons opté une méthodologie basée sur l'analyse de l'expression de gènes par RT-

QPCR mais, contrairement à la grande majorité des études déjà publiées, réalisée à l'échelle de la cellule unique et non pas de la population entière.

Notre stratégie a donc consisté à trier ces deux sous-populations de macrophages résidents de la cavité péritonéale de souris sur la base des marqueurs décrits comme discriminants. Puis, les cellules triées ont été déposées sur une puce microfluidique (C1 single cell auto-prep system) afin d'assurer leur séparation pour poursuivre l'analyse d'expression des gènes à l'échelle d'une seule cellule. Ce processus (vérification du remplissage des chambres réactionnelles, vérification de viabilité cellulaire etc.) de capture a permis de conserver une quarantaine de cellules de chaque sous population. La mesure d'expression a été effectuée par RT-QPCR moyen débit avec le système standardisé Biomark (Cf. Figure) et analysée avec le logiciel R-Singular.

A l'issue des différentes approches statistiques conduites, classification hiérarchique ascendante ou encore analyse en composante principale, il est clairement établi que sur la base des profils d'expression les deux sous-populations sont parfaitement distinctes. De cette façon nous avons pu définir une signature moléculaire spécifique de chacune d'entre elles. Ces gènes hautement discriminants confirment dans les deux cas l'existence d'un phénotype homéostatique comparable à un phénotype M2 (activation alternative). Comparée aux SPM, la signature des LPM se traduit par une expression exclusive de *cxcl13* (chémokine homéostatique du compartiment lymphocytaire B1) et *ifngr1* (récepteur 1 de l'IFN γ) et une expression supérieure de *Sr-a* (récepteur scavenger) et de *ccl24* (eotaxin 2, chemokine assurant entre autre le recrutement des éosinophiles). L'expression de ces gènes confirme la participation des LPM dans l'homéostasie cellulaire de la cavité péritonéale mais aussi dans sa surveillance immunitaire. De leur côté les SPM présentent une expression marquée de *Fizz-1* et *Mrc1* (codant le récepteur au mannose, CD206). Les fonctions de ces gènes et de leur produits seront discutées plus tard dans ce manuscrit, mais tout indique que, tout comme les LPM, les SPM assurent des fonctions homéostatiques de la cavité péritonéale mais en faisant appel à d'autres processus biologiques. Après avoir pris soin d'éliminer l'hypothèse d'une contamination avec d'autres cellules immunitaires lors de l'isolement des SPM nous sommes arrivés à la conclusion qu'il existait deux sous populations se distinguant par l'expression de *Fizz-1* ou *Mrc1*. Pour autant, la population SPM négative pour ces deux marqueurs ne présente pas une signature évocatrice du compartiment LPM. Ce résultat souligne donc la pertinence de notre approche méthodologique dans l'investigation de la diversité des populations macrophagiques.

Enfin, comme nous le suspicions, la comparaison des gènes exprimés par l'ensemble des SPM résidents ou par les macrophages recrutés suite à l'administration de thioglycolate dans la cavité péritonéale révèle d'importantes différences. Au sein des macrophages recrutés, l'expression de gènes associés à une polarisation M1 est augmentée et inversement, les gènes signant la polarisation M2 sont réprimés. Ces résultats indiquent une perte du phénotype M2 homéostatique par les macrophages recrutés. Paradoxalement, ces cellules expriment certains des gènes signature du profil LPM ce qui suppose qu'une partie de ces cellules nouvellement recrutées pourrait contribuer au repeuplement du compartiment LPM dans certains contextes infectieux ou inflammatoires. L'origine hématopoïétique de ces différentes populations de macrophages sera plus amplement abordée et discutée au terme de ce manuscrit.

En conclusion cette étude a permis de valider l'approche « single-cell » dans l'analyse de la diversité et de la plasticité des macrophages résidents et recrutés mais aussi d'en évaluer le potentiel. En effet, l'implémentation du répertoire des signatures moléculaires associées aux macrophages de différents tissus et dans différentes conditions physiologiques ou non pourrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs ou de nouvelles cibles diagnostiques ou thérapeutiques permettant de moduler l'activité de ces cellules centrales de l'immunité innée.

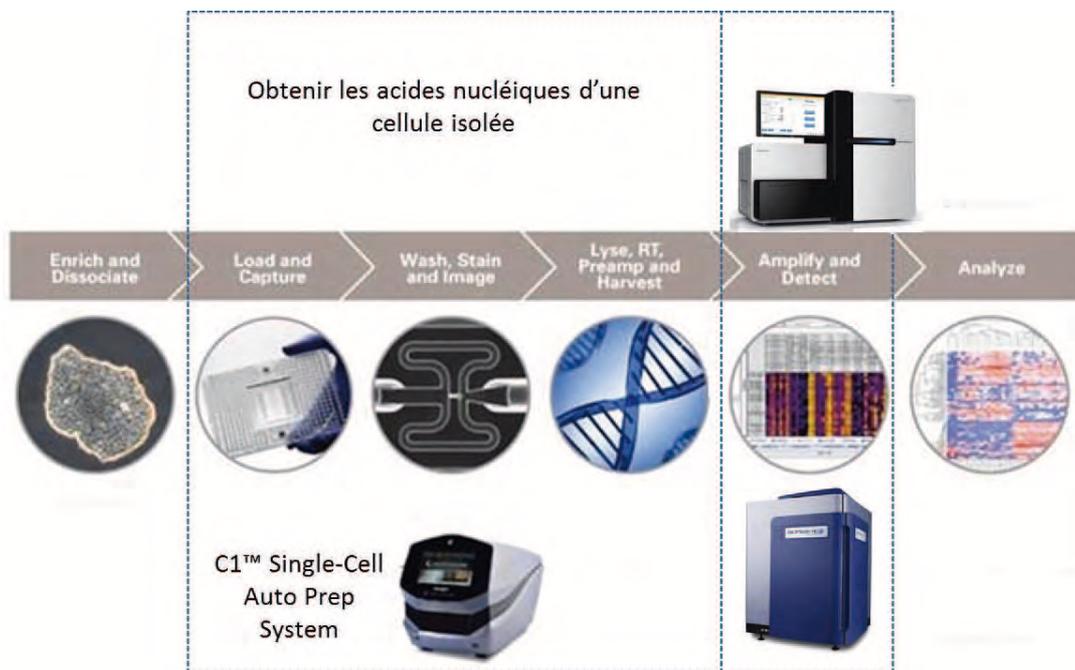


Figure : Système de séparation et d'analyse d'une seule cellule

<http://www.biorigami.com/?paged=2>

Références

1. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, et al. (2010) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci* 107: 2568–2573. doi:10.1073/pnas.0915000107.
2. Cain DW, O’Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, et al. (2013) Identification of a Tissue-Specific, C/EBP β -Dependent Pathway of Differentiation for Murine Peritoneal Macrophages. *J Immunol* 191: 4665–4675. doi:10.4049/jimmunol.1300581.

**Single cell profiling reveals specific gene signatures of murine peritoneal macrophages
subsets at steady state**

Solène Accarias^{1,2}, Clémence Genthon^{3,4}, David Rengel^{5,6}, Séverine Boullier^{1,2}, Gilles
Foucras^{1,2*}, Guillaume Tabouret^{2,1*}

Author affiliations:

1 : Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

2 : INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

3 : INRA, UAR1209 Département de Génétique Animale, INRA, Castanet-tolosan, France

4 : GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzeville F31326, Castanet-tolosan, FRANCE

5 : INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, Castanet-
Tolosan, France

6 : CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594,
Castanet-Tolosan, France

* : corresponding authors

Guillaume Tabouret

Ecole Nationale Vétérinaire, UMR1225 IHAP –Bat. 10.3
23 chemin des Capelles – 31076 Toulouse, France
Tel : +33 (0)5 61 19 23 48
email : g.tabouret@envt.fr

Gilles Foucras

Ecole Nationale Vétérinaire, UMR1225 IHAP –Bat. 10.3
23 chemin des Capelles – 31076 Toulouse, France
Tel : +33 (0)5 61 19 39 02
email : g.foucras@envt.fr

Keywords:

Macrophage, Single cell, Peritoneal cavity, Polarization, Homeostasis

Abbreviations:

PerMF: peritoneal macrophages

MF-thio: Thioglycolate Broth-elicited macrophages

BMDM: bone marrow derived macrophages

Abstract:

To investigate the steady-state phenotype of resident peritoneal macrophages, we used an innovative approach based on single-cell gene expression analysis and studied the two main subsets of large (LPM) and small (SPM) peritoneal macrophages. Here, we show that both subsets express *bona fide* genes of alternative activation (M2) although gene signature of each subset is specific. These data suggest that both LPM and SPM participate in the homeostasis and immune surveillance of the peritoneal cavity but through different biological processes. On the contrary, macrophages recruited upon thioglycolate injection have an M1 phenotype with repression of M2 homeostatic genes. In conclusion, our results shed new light on the ground phenotype of resident peritoneal macrophages and propose a new strategy based on single-cell analysis to uncover macrophage diversity and plasticity in various tissues or physiological contexts.

Introduction

Macrophages (MF) are central to the development, progression and resolution of inflammation. They act as sentinel cells and first line of defense by sensing the presence of pathogens in their neighboring microenvironment. Through the production of inflammatory mediators, including cytokines and chemokines, resident MFs orchestrate the recruitment and activation of other effector cells. However, tissue resident MFs are also considered as gatekeepers of tissue integrity and homeostasis [1]. MF can undergo different polarization programs in response to environmental cues. The classical activation (M1) drives MF toward a pro-inflammatory phenotype, whereas the alternative activation (M2) confers anti-inflammatory, regulatory or wound healing properties of MFs [2]. Recent studies have unveiled an unsuspected heterogeneity in MF subsets playing highly dedicated functions [3]. Based on cell size and expression levels of several canonical surface markers, two MF subsets were evidenced as resident MF of the mouse peritoneal cavity [4]. Large peritoneal macrophages (LPM) which are defined as $F4-80^{\text{high}} CD11b^{\text{high}} MHC II^{\text{neg}}$ cells, account for the main proportion of total PerMF ($\pm 90\%$), but small peritoneal macrophages (SPM), which are $F4-80^{\text{int}} CD11b^{\text{high}}$, were characterized by strong MHC II expression. Despite substantial cues indicating that these cells are phenotypically and functionally different, accurate definition of their gene expression profile is still lacking. Yet, mouse peritoneal macrophages (PerMF) have been extensively used in conventional models to study macrophage-associated functions and paradoxically their basal phenotype is ill-defined. Furthermore, in most studies, in order to improve cell yield, the numbers of PerMF were artificially increased through the injection of thioglycolate or casein that are known to induce a sterile peritonitis [5]. However, it is now established that MF collected using such protocols are originating from newly recruited inflammatory blood monocytes and are consequently no longer relevant of resident PerMF [4]. It is thus very likely that macrophages collected during sterile peritonitis have

undergone a polarization program that remains to be clearly established and compared to the basal phenotype of resident PerMF. Few surface markers are available to assess the polarization of MF by flow cytometry, especially at steady state, and analysis at the transcriptional levels is often needed to properly address this question. Indeed, genes like *nos2* and inflammatory cytokines (*tnfa*, *il12b*, etc.) are *bona fide* markers of M1 activation whereas *arginase-1*, *retmla* (or *fizz-1*), *chi3l3* (or *Ym-1*) reflect more an M2 polarization. However, more markers are needed to fully characterize the many facets of the intermediary states of polarization. Moreover, QPCR requires a large number of target cells (on the order of 10^6) that are generally analyzed as a pool only reflecting the mean gene expression, and thus occulting the underlying diversity. Importantly, information is lost about coordinate regulation of genes within a single cell. Here, we used a combination of fluorescence acquired cell sorting and the C1 Single-Cell Auto Prep and BioMark nanoscale quantitative PCR (FluidigmTM) to examine the expression of M1/M2 polarization hallmarks in each subset of peritoneal MF, across the single-cell level. Thanks to this approach, our study reveals unique gene signatures of resident peritoneal MF and, in comparison, highlights the profound molecular alterations induced by thioglycolate-elicitation in recruited macrophages.

Material and methods

Flow cytometry

All experiments were performed with SPF C57BL/6 female mice 8 weeks old (Janvier Labs) following institutional animal care and use committee approval. Peritoneal cells were harvested by injecting 5 mL of HBSS-SVF (5%) 2.5 mM EDTA buffer, incubated with anti-CD16/CD32 mAb to block FcRII/III receptors and further stained with fluorochrome conjugated mAb. Dead cells were excluded using 7-AAD labeling. Samples were acquired on

a MACSQuant (Miltenyi Biotec) cytometer or FACS Aria for cell sorting experiments (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo (TreeStar) software.

Macrophage isolation by FACS

Resident PerMF subsets were sorted based on CD115, F4-80 and Ly6C expression after gating out unwanted cells. From each mice (n=10) 1×10^5 LPM or SPM subsets were collected for SC suspension preparation (see below). Pools of 1×10^6 LPM or SPM were also prepared. Thioglycolate Broth (4%)-elicited macrophages (MF-Thio) were prepared as previously described [4,6]. After 4 days of incubation, MF-Thio were sorted and a pool of MF-Thio (1×10^6 cells) was constituted (n=5 mice). Finally, pools (1×10^6) of classically or alternatively activated bone marrow derived macrophages (BMDM) were prepared as previously described: [7] through stimulation (4hr) with IFN γ (20 ng/mL) and LPS (100 ng/mL) or IL-4 (20 ng/mL) to induce M1 or M2 polarization programs. For all cell preparations, MF purity and viability were superior to 95%. Isolation of mRNA from cell pools was performed with RNAeasy kit (Qiagen).

Single-Cell Capture and gene expression qPCR

A suspension of about 600 single cells were introduced in the cell input well of the C1 Array IFC (10-17 μ m). Viability of single cells captured on the C1 Array was assessed (Live/dead Cell viability/Cytotoxicity kit; Invitrogen). Reverse transcription and Specific-Target - Amplification were performed using components from the Cells-to-Ct™ kit (Ambion), C1 Single-Cell Auto Prep Modules Kit (Fluidigm) and pooled primers (500nM). Primers were designed using Primer3Plus software. Next, single cells samples were analyzed by qPCR using 48.48 Dynamic Array™ IFCs and the BioMark™ System (Fluidigm). Processing of the IFCs and operation of the instruments were performed according to the manufacturer's procedures. Briefly, prior to loading into the IFC, 2 μ L of preamplified cDNA sample were

mixed with adequately diluted 2x TaqMan Master Mix (Applied), 20× DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm), 20X Evagreen (Biotium) and Tris low EDTA buffer. Five microliters of the cDNA sample + reagent mix and 5 μL of primers (5 μM) were dispensed into the dedicated inlets of the IFC. The loading was achieved in the IFC Controller MX and IFC was next transferred to the BioMark for 35 PCR cycles. Bulk cell suspension samples (pools of LPM, SPM, M1-BMDM and M2-BMDM) as well as a positive and negative control were performed in parallel. Ct values were calculated from the system's software (BioMark Real-time PCR Analysis; Fluidigm).

Single-Cell Data Processing and visualization / Statistical analysis

Statistical analyses were performed with R v3.0.2 under RStudio environment, using the Singular Analysis Toolset 3.0 from Biomark as well as the [R] “stats” and “randomForest” packages [8,9]. PCA and hierarchical clustering analysis were carried out using scaled data. Hierarchical clustering was based on Euclidian distances; groups were merged according to Ward's criterion.

Results & Discussion

Accounting for the majority of resident PerMF ($\pm 90\%$), the LPM subset was CD115^{pos} F4-80^{high} CD11b^{high} Ly6C^{neg} and MHC II^{neg}. Strikingly, the SPM subset (CD115^{pos} F4-80^{int} CD11b^{high} Ly6C^{neg}) was MHC II^{pos} (Figure 1A). These results are in agreement with previously published studies [4,10]. Following the capture process we retained 37 viable cells from each subset for further analysis. Based on the gene expression profile of single cells, a principal component analysis (PCA) sharply distinguished LPM from SPM (Figure 2A). Moreover, first principal component, representing 16% of the variance, indicates that LPM

and SPM subsets share more similarities with M2- than with M1-BMDM (Figure 2A) suggesting that both subsets are more similar to the M2 phenotype. This was confirmed by increased expression of *bona fide* M2 marker genes including *Klf4*, *Stat6*, *Stat3*, *Socs2*, *Fizz1* (*retnla*) or *Mrc1* in the two subsets. Yet, *Arg1* or *Ym1* (*chi3l3*), two relevant markers of M2 polarization, were detected neither in LPM nor in SPM. Nevertheless, their expression is highly dependent on the presence of IL-4 or IL-13 in type 2-related environment [11], which is different from the case of the peritoneal cavity at steady state. The frequency of individual cells expressing canonical genes of classical activation (M1) like *Nos2*, that was undetectable, or *Tnfa*, *Il12b* and *Ccl2*, was low in both LPM and SPM subsets (Figure 2B). However, for cells expressing those genes, expression levels were high. This observation highlighted the possible misinterpretation of the polarization when gene expression is determined in a cellular pool or at the population scale. Hierarchical clustering analysis of the genes allowed a perfect discrimination of the two subsets since all cells, but one LPM clusterized according to their sorting phenotype (Figure 2B). As determined by Random Forest analysis, three genes enable us to discriminate between the LPMs and the SPMs (Figure 2C and D). Among those three genes, *cxcl13* appears as the most discriminant gene, due to its exclusive expression in LPM. Mice lacking the CXCL13 chemokine are B1 cell-deficient in pleural and peritoneal cavities but not in the spleen [12]. CXCL13 is produced by mesothelial cells in the omentum and PerMF, and drives B1-cell homing in these tissues. Here, we show that LPMs, but not SPMs, are unambiguously involved in the production of this chemokine (Figure 2B and D). Moreover, CXCL13 is considered as an M2 polarization marker [11], and more precisely that it is associated with an M2c regulatory phenotype [13]. These findings indicate that LPMs are involved in homeostasis of the peritoneal cavity. Similarly, *IFNGR1* expression was mainly (27 over 37 cells) LPM-related, whereas not a single SPM expressed this gene (Figure 2B and D). This observation suggest that LPM, in a Type 1 context (IFN γ plus LPS), will rapidly

undergo a classical activation program leading to increased anti-viral and bactericidal functions, making this subset an important player in defense mechanisms. In the same way, LPM could be defined by an increased expression of SRA (Figure 2B and D), a scavenger receptor involved in numerous functions of macrophages including binding and phagocytosis of pathogens, but also clearance of apoptotic bodies. Again, this highlights a possible dual function of LPMs to ensure homeostasis and immune surveillance of the peritoneal cavity. On the other hand, SPMs presented a more frequent expression of *Fizz1* (23 over 37 SPMs) and *Mrc1* (22 over 37 SPMs) compared to LPMs. Interestingly the expression of these genes was highly correlated among SPM subset. First, this argues for an M2 basal phenotype of SPMs but different from that of LPMs. The expression of *Fizz1* (*retnla* or RELM- α) was previously evidenced in Type 2 evoked contexts, like infections by nematodes, but little is known about its precise function. The production of Fizz1 by alternatively activated macrophage participates in limiting the pathogenesis of Type 2 cytokines-mediated pulmonary inflammation after challenge with *Schistosoma mansoni* eggs [14]. These findings are consistent with the reported association between *Fizz1* expression and wound healing macrophage phenotype [15] suggesting that SPMs may also play a role in peritoneal cavity homeostasis. Similarly, SPMs showed an increased expression of *Mrc1* (Figure 2B and D), a gene coding the mannose receptor (MR or CD206) which constitutes another M2 phenotype hallmark [2]. Beyond the recognition of terminal mannose, N-acetylglucosamine and fucose residues on glycans attached to proteins found on the surface of some microorganisms [16], MR is endowed with homeostatic functions including clearance of glycoproteins, including sulphated hormones and glycoproteins released in response to a pathological event [17,18]. Interestingly, the violin plots presentation of gene expression in single cells, as well as HAC heatmap (Figure 2B and D), strongly suggest that SPM population could be further divided into two subsets. This was even more evident when considering the expression of *Fizz1* and

Mrc1 genes. We thus compared the gene expression between single cells and pooled MF subsets. For most of the genes analyzed in the LPM subset, gene expression was comparable between single cells and the pool (Figure 3A). However, *Fizz1* expression was strikingly different. Indeed, only 6 over 37 individual cells expressed this gene, and yet, analysis of pooled LPMs indicated a robust mean expression (Figure 3A). Similarly, analysis of SPMs as a pool distorted the analysis of expression of several genes. Moreover, as expected, it completely biased the analysis of *Fizz1* or *Mrc1*, whose expression is not uniform within the SPM subset (Figure 3B). Flow cytometry analysis of MR expression at the surface of SPMs showed that around 55 % of SPMs expressed significant levels of MR, thus confirming gene expression data (Figure 3C). Undoubtedly, phenotype analysis of monocyte/macrophage populations at the single cell levels using the highly standardized Fluidigm system will help in extending knowledge on macrophage signatures according to tissue, pathological conditions, inflammatory status or even species. Our study sheds a new light on mouse PerMF phenotype at steady state where LPMs appeared as a rather homogenous population characterized by the exclusive expression of *Cxcl13* and *IFNGR1*, and increased expression levels of *SRA* and *Ccl24* in a lesser extent. Inversely, SPMs seemed to be divided into two subsets according to *Fizz1* and *Mrc1* expression. A contamination of the SPM subset by non yet-identified cells remains possible although our sorting strategy excluded the most evident hypothesis including eosinophils or dendritic cells. Indeed, both these cell populations express low levels of F4-80. Post-sorting analysis of the SPM subset in forward and side scatter was not consistent with a contamination by eosinophils (data not shown). Moreover, high expression of Kruppel-like factor 4, *Klf4* (Figure 2B), which is restricted to the monocytic lineage [19], definitely rules out this hypothesis. Next, contamination by dendritic cells is also unlikely as F4-80 is not expressed on peritoneal dendritic cells [4, 20] and sorted SPM were CD11c^{neg}. It is thus difficult to figure out if these PerMF are independent populations or, in contrast, are

interconnected as intermediates of differentiation in which SPM would be a transitory stage to the LPM final stage. Previous experiment performed to track cell fate evidenced that LPM do not differentiate into SPM, but the contrary was not determined [4]. Using BrdU uptake and cell tracking experiments, it was demonstrated that LPMs (F4-80^{high}) are long-lived and require little hematopoietic input for steady state maintenance [10]. Moreover, Schulz et al. found that F4-80 expression levels on macrophages correlated with yolk sac (F4-80^{high}) versus hematopoietic (F4-80^{low}) origins [21]. And yet, adoptive transfer experiments showed that a fraction of LPM originated from transferred SPM and indicated that a yolk sac-derived cell compartment can be replaced by cells of hematopoietic origin [10]. Consequently, it can be assumed that, in specific conditions leading to LPM depletion, SPMs can replenish this compartment and can indeed represent an intermediate differentiation stage of LPM. In the other hand, it was reported that SPMs could originate from blood monocytes based on observations conducted upon thioglycolate or LPS intraperitoneal administration [4]. These stimulations resulted in a fast and intense recruitment of Ly6C^{high}, MHC-II^{neg} blood monocytes in the peritoneal cavity that, according to the mentioned study, differentiate into SPM-like cells that are phenotypically indistinguishable from typical resident SPM in peritoneal cavities of unchallenged animals. As thioglycolate-elicited macrophages are a common model for immunology and host-pathogen interaction studies, we decided to evaluate if, as stated, SPMs originated from blood monocytes that are recruited upon thioglycolate injection and were truly comparable with resident SPMs. The comparison of gene expression between pools of resident-SPM and of recruited-SPM (collected 4 days after thioglycolate injection), further designed Thio-MF, revealed striking differences. Indeed, compared to resident-SPMs, Thio-MF showed an increased expression of several genes including *Tnfa* and *Ccl5* which are typical markers of the M1 phenotype [2] (Figure 4). Yet, none of the two cell subsets expressed *inos* suggesting that thioglycolate elicitation in itself is

not sufficient to promote nitric oxide synthesis pathway. Conversely, the expression of M2 canonical genes such as *Klf4*, *Fizz1*, *Mrc1* or *PPARG* was sharply decreased in Thio-MF (Figure 4). Taken together these observations strongly suggest that thioglycolate elicitation primes the classical activation pathway in recruited monocytes that further differentiate into peritoneal macrophages. Although sharing some minor similarities with resident SPM as observed by flow cytometry, macrophages recruited upon thioglycolate administration are definitely no longer comparable with homeostatic resident peritoneal macrophages. In our opinion, this strong phenotypic alteration should be kept in mind when using thioglycolate-elicited peritoneal macrophages as a model for macrophage studies. Furthermore, the expression of LPM signature genes, *Cxcl13*, *SRA* and *Ccl24*, but not *IFNGR* were increased in Thio-MFs compared to SPMs. This was confirmed by comparison of pool of LPMs with Thio-MF cells that revealed similar expression levels for these genes, excepted for *IFNGR* that remained exclusive to pooled LPMs. These results provided additional evidences that, as previously suspected, a fraction of the newly recruited inflammatory macrophages may partly reconstitute the resident LPM compartment.

As a conclusion, our study brings new insights on the phenotype of resident peritoneal macrophages. Owing to our single-cell analysis, we defined a molecular signature specific of each subset of peritoneal macrophages. Despite a clear phenotypic diversity, it can be assumed that both subsets operate homeostatic functions. Undeniably, studying macrophage phenotype across the single-cell levels provides a powerful mean to uncover and investigate the highly plastic and diverse population of resident macrophages at steady state or under various inflammatory or pathologic conditions.

References

1. Lavin Y, Merad M (2013) Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res* 1: 201–209. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0117.
2. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015.
3. Schiwon M, Weisheit C, Franken L, Gutweiler S, Dixit A, et al. (2014) Crosstalk between Sentinel and Helper Macrophages Permits Neutrophil Migration into Infected Uroepithelium. *Cell* 156: 456–468. doi:10.1016/j.cell.2014.01.006.
4. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, et al. (2010) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci* 107: 2568–2573. doi:10.1073/pnas.0915000107.
5. Ray A, Dittel BN (2010) Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *J Vis Exp*. Available: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1488>. Accessed 21 October 2014.
6. Lagasse E, Weissman IL (1996) Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197: 139–150.
7. Pelegrin P, Surprenant A (2009) Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *EMBO J* 28: 2114–2127.
8. Abramson JS, Mills EL, Sawyer MK, Regelman WR, Nelson JD, et al. (1981) Recurrent infections and delayed separation of the umbilical cord in an infant with abnormal phagocytic cell locomotion and oxidative response during particle phagocytosis. *J Pediatr* 99: 887–894.
9. Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, et al. (2006) Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett* 259: 260–268. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x.
10. Cain DW, O’Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, et al. (2013) Identification of a Tissue-Specific, C/EBP β -Dependent Pathway of Differentiation for Murine Peritoneal Macrophages. *J Immunol* 191: 4665–4675. doi:10.4049/jimmunol.1300581.
11. Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11: 723–737. doi:10.1038/nri3073.
12. Ansel KM, Harris R, Cyster JG (2002) CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 16: 67–76.
13. Benoit M, Desnues B, Mege J-L (2008) Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181: 3733–3739.
14. Pesce JT, Ramalingam TR, Wilson MS, Mentink-Kane MM, Thompson RW, et al. (2009) Retnla (relm α /fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. *PLoS Pathog* 5: e1000393. doi:10.1371/journal.ppat.1000393.

15. Raes G, De Baetselier P, Noël W, Beschin A, Brombacher F, et al. (2002) Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71: 597–602.
16. Schlesinger PH, Doebber TW, Mandell BF, White R, DeSchryver C, et al. (1978) Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells. Studies with beta-glucuronidase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, ribonuclease B and agalacto-orosomucoid. *Biochem J* 176: 103–109.
17. Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, et al. (2002) Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295: 1898–1901. doi:10.1126/science.1069540.
18. Taylor P, Gordon S, Martinezpomares L (2005) The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 26: 104–110. doi:10.1016/j.it.2004.12.001.
19. Feinberg MW, Cao Z, Wara AK, Lebedeva MA, SenBanerjee S, et al. (2005) Kruppel-like Factor 4 Is a Mediator of Proinflammatory Signaling in Macrophages. *J Biol Chem* 280: 38247–38258. doi:10.1074/jbc.M509378200.
20. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14: 986–995. doi:10.1038/ni.2705.
21. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, et al. (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86–90. doi:10.1126/science.1219179.

Figure legends:

Figure 1

The gating strategy used to analyze and isolate resident LPM and SPM. Doublets, cell debris and dead cells (7-AAD⁺) were excluded by electronic gating as indicated. LPM and SPM were sorted after gating on CD115⁺ cells and according to the expression and intensity of F4-80 and CD11b: LPM (F4-80^{high} CD11b^{high} MHC II^{low}) and SPM (F4-80^{int} CD11b^{int} MHC II^{high}). Sorted cells were processed and separated with the C1 Single-Cell Auto Prep systems and analyzed for gene expression with BioMark (FluidigmTM).

Figure 2

(A) Principal component analysis of single LPM, SPM, M1 and M2 pools. (B) Ascendant hierarchical clustering analysis of gene expression for each single LPM and SPM cells. Discriminant genes were highlighted in bold. (C) Random forest analysis for the most discriminant genes. (D) Violin plot representation of selected gene expression in LPM and SPM single cells.

Figure 3

(A) Violin plot representation of selected gene expression in single cell LPM (red) vs pooled LPM cells (black dots and bar=mean) (10^6 cells, n=3 pools). (B) Violin plot representation of selected gene expression in single SPM cells (green) vs pooled SPM cells (black dots and bar=mean) (10^6 cells, n=3 pools). (C) Flow cytometry analysis and mean fluorescence intensity of CD206 on SPM (F4-80^{int}) and LPM (F4-80^{high}).

Figure 4

Comparison of selected gene expression between pooled resident SPM (Green) and pooled thioglycolate-elicited macrophages (Blue).

Figure 1

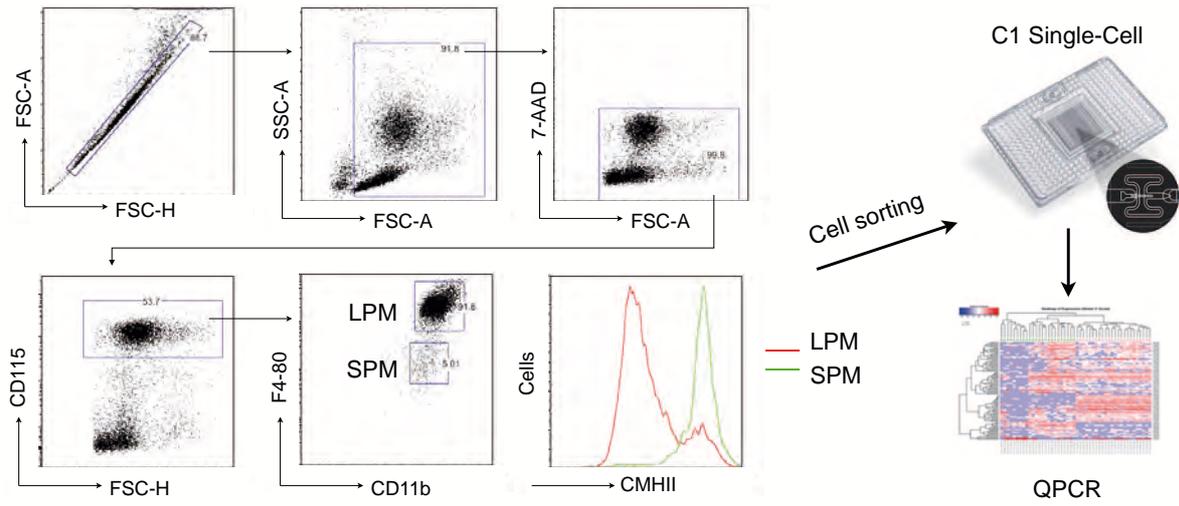


Figure 2

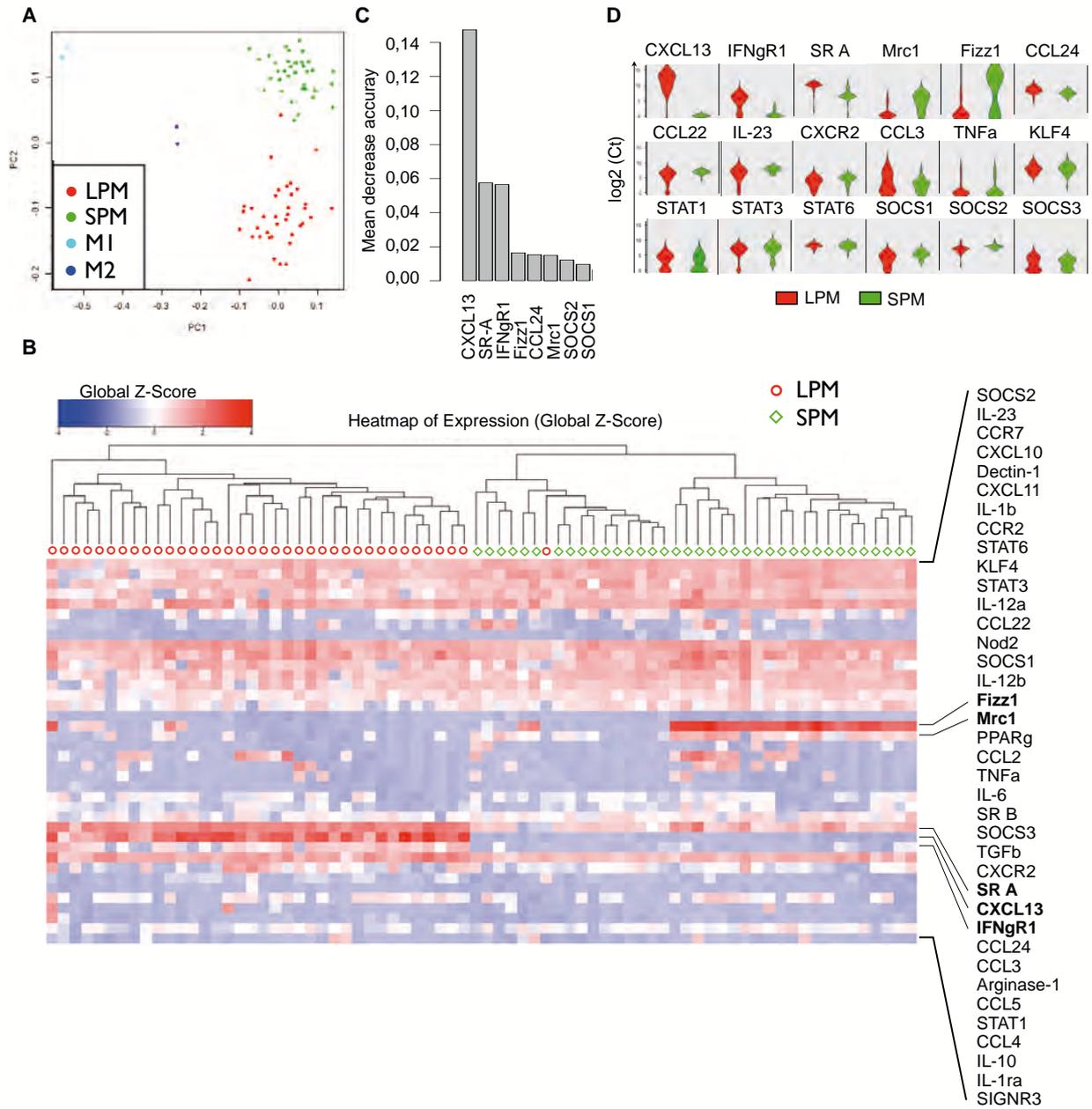


Figure 3

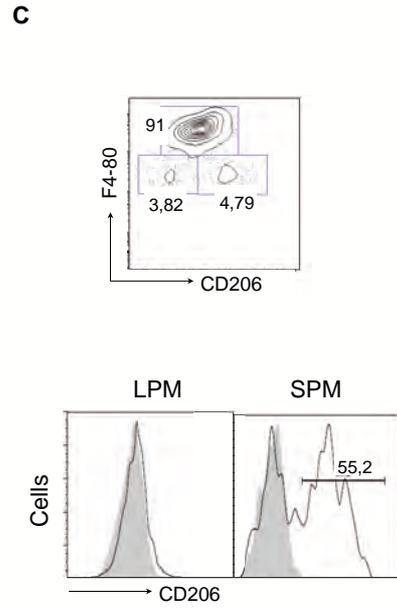
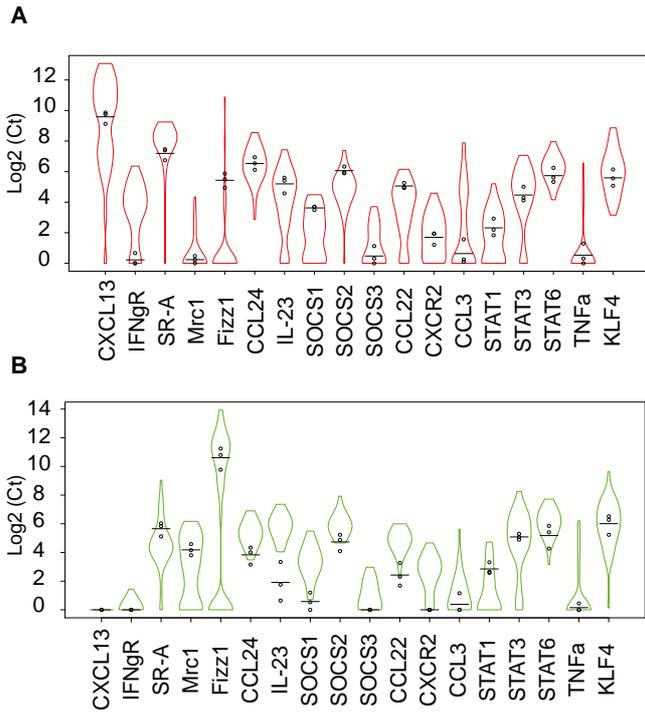
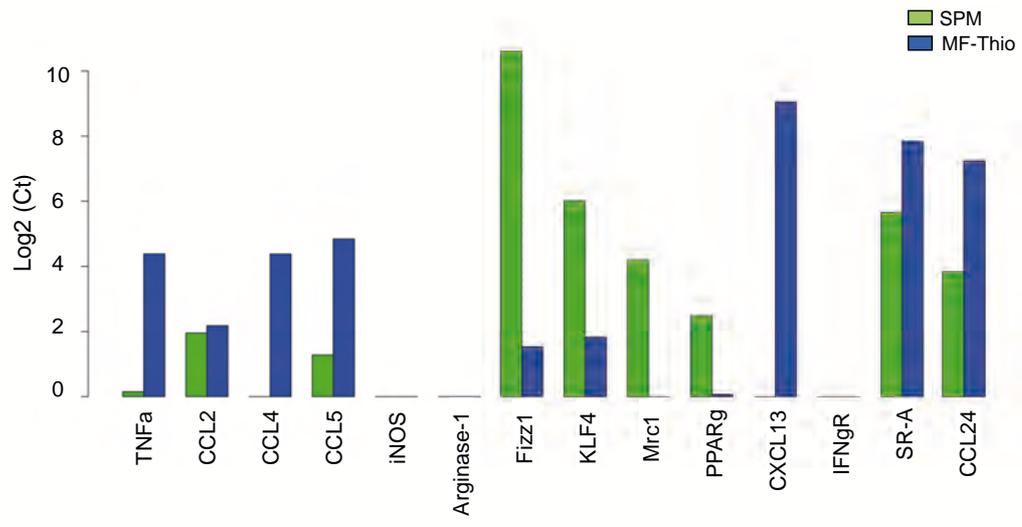


Figure 4



Discussion et perspectives

Le compartiment des macrophages constitue un pool de cellules extrêmement hétérogène destiné à de multiples fonctions dépendant de leur phénotype, de leur localisation tissulaire et du contexte physiologique de l'organisme. Ainsi, cette incroyable plasticité, à la fois phénotypique et fonctionnelle, confère aux macrophages un rôle central dans de nombreux processus biologiques tels que le développement et le remodelage des tissus embryonnaires, l'homéostasie et la surveillance des tissus au sein desquels ils résident et bien sûr la défense immunitaire. De part cette position centrale, les macrophages sont de véritables orchestrateurs de la réponse inflammatoire. Le dialogue moléculaire entre macrophages résidents et cellules effectrices de l'immunité est un élément fondamental de l'initiation de réponses immunitaires aussi bien d'un point de vue inné qu'adaptatif. Par ailleurs, leur participation à la mise en place de processus inflammatoires à l'origine de diverses pathologies aiguës ou chroniques font de ces cellules de potentielles cibles thérapeutiques [177]. Ainsi, l'altération de leur phénotype et la dérégulation de leurs fonctions consécutives d'une modification de leur microenvironnement tissulaire, peuvent conduire à une réponse exacerbée ou au contraire inhibée. Les « Tumor associated macrophages » en sont le parfait exemple.

Le premier article de cette thèse avait pour objectif d'étudier le comportement des macrophages résidents lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*. Bien que l'infection par voie intrapéritonéale ne soit pas la plus pertinente cliniquement, il nous est apparu logique, en particulier au vu des modèles infectieux préexistants à notre étude, de choisir ce site pour les raisons suivantes. Premièrement, la composition cellulaire de la cavité péritonéale est très riche en macrophages, ce qui, vu notre objectif, nous plaçait dans les conditions idéales. Deuxièmement, ayant à l'esprit la grande quantité d'études réalisées à l'aide de macrophages péritonéaux, nous pensions que leur phénotype était parfaitement décrit. Néanmoins, au fil de nos analyses et de nos questionnements, nous sommes arrivés au constat qu'en dehors de toute réaction inflammatoire infectieuse ou stérile, le phénotype basal des macrophages péritonéaux était assez peu détaillé dans la littérature. C'est d'ailleurs ce constat qui nous a conduits à réaliser notre seconde étude. Pour finir, la cavité péritonéale offre de larges possibilités de collecte d'échantillons tels que cellules recrutées ou exsudat péritonéal, permettant de caractériser avec une très bonne précision les cellules effectrices et les médiateurs mis en jeu au cours de la réaction inflammatoire. Ce faisant, nous avons cherché à préciser les bases moléculaires des mécanismes immunitaires possiblement impliqués dans la résistance ou la sensibilité à l'infection par *S. aureus*.

Afin d'identifier ces mécanismes, nous avons comparé les étapes précoces de la réponse inflammatoire chez deux lignées de souris présentant des différences de sensibilité à l'infection par *S. aureus*.

Notre étude confirme que les souris C57BL/6 résistent à l'infection contrairement aux souris DBA/2. Ce résultat est en parfait accord avec les études initiales qui montrent que les souris DBA/2 succombent à l'infection suite à une administration intraveineuse ou intrapéritonéale [248,299]. Selon ces études, la mort des souris DBA/2 résulte d'un sepsis. Les niveaux élevés de cytokines CXCL1, CXCL2, CCL2 et IL-6 mesurés chez ces souris confortent cette hypothèse. En effet, ces molécules pro-inflammatoires sont généralement associées au choc septique induit par *S. aureus* et sont considérées comme des biomarqueurs pertinents et dont des niveaux très élevés sont prédictifs d'une issue fatale [295]. Par ailleurs, l'augmentation de la bactériémie et la forte granulocytose mesurées chez les souris DBA/2 sont également en faveur d'un tel scénario. Ces données suggèrent l'existence de réactions inflammatoires différentes entre souris sensibles et résistantes.

Néanmoins, d'autres phénomènes pourraient expliquer cette différence de sensibilité. En particulier, il convient de noter que les souris DBA/2 sont déficientes pour le composant C5 du complément. Bien qu'il soit connu que la déficience en C5 contribue à la sensibilité d'une variété de pathogènes, sa contribution dans la sensibilité à l'infection par *S. aureus* n'est pas encore clairement démontrée et reste controversée. Dans un sens, il a été montré que les souris déficientes en C5 ont une moindre élimination bactérienne dans les poumons [362] ou une moindre survie lors d'une infection par *S. aureus* [363]. Néanmoins, des résultats diamétralement opposés ont également été publiés [364,365]. Plus récemment, il a été démontré que les gènes associés à la sensibilité des souris A/J (également déficiente en C5) à l'infection par *S. aureus* étaient localisés sur les chromosomes 18, 11 et 8 [299] or, le gène C5 est localisé sur le chromosome 2 ce qui suggère que cette déficience n'est pas principalement impliquée dans la sensibilité accrue des souris DBA/2 et A/J. De plus, la molécule C5a est pro-sepsis [365,366], la déficience en C5a des souris DBA/2 devrait donc les rendre moins sujettes au développement d'un sepsis. Finalement, la création de cette déficience dans trois lignées de souris de fond génétique C57BL/6 n'altère pas de façon significative leur résistance intrinsèque à l'infection par *S. aureus* [299]. Dans leur ensemble, ces données suggèrent fortement que la déficience en C5a n'est pas le facteur principal permettant d'expliquer la plus grande sensibilité des souris DBA/2 (ou A/J) à l'infection i.v. ou i.p. De plus, *S. aureus* a la capacité de déjouer le C5a en sécrétant des protéines telles que

SCIN, Efb et CHIPS. En effet, SCIN bloque l'activité de la C3b convertase empêchant la production de C5a [328]. De même, Efb bloque l'activation des voies classiques et alternes en se liant au C3, inhibant la production de C5a [327]. Enfin, CHIPS se fixe directement sur les récepteurs C5a inhibant la réponse des phagocytes au C5a [350].

La caractérisation comparée des réponses inflammatoires initiées chez ces lignées de souris suite à l'infection a mis en évidence deux phénomènes d'importance.

Premièrement, les analyses par cytométrie de flux ont clairement démontré un afflux de PMN plus rapide, et donc plus intense, chez les souris C57BL/6 précocement (1 et 2 hr p.i.). Cela constitue une observation essentielle car il est bien établi que l'intensité et la précocité de l'afflux des PMN jouent un rôle majeur dans le contrôle des infections cutanées, systémiques et péritonéales à *S. aureus* [248,310,367]. Le cas des infections pulmonaires est plus complexe et nous reviendrons sur ce point plus tard dans la discussion.

Deuxièmement, la caractérisation et la quantification des cytokines produites dans l'exsudat péritonéal au cours de l'infection ont révélé une production massive des cytokines associées à l'activité NF- κ B telles que le TNF α , l'IL-6, CXCL1, CXCL2 ou encore CCL2 chez les souris DBA/2. Inversement, nos analyses ont mis en évidence une libération précoce d'IL-1 β chez les souris C57BL/6. Ces observations suggéraient une orchestration différente des premières étapes de la réaction inflammatoire entre ces deux lignées de souris. Au vu de leurs fonctions, nous avons focalisé notre attention sur les macrophages résidents [96,284,368,369].

Le suivi par cytométrie de flux des macrophages péritonéaux a mis en évidence une rapide diminution de leur nombre suite à l'épreuve i.p. chez les souris C57BL/6. En comparaison, le nombre de macrophages péritonéaux est peu modifié chez les souris sensible jusque 2 hr p.i.. Deux hypothèses ont été envisagées pour expliquer ce phénomène. La première consistait à évaluer la migration des macrophages résidents en dehors de la cavité péritonéale vers les noeuds lymphatiques et la rate. Le marquage des macrophages résidents à l'aide d'un traceur fluorescent nous a permis de tracer leur présence dans différentes structures lymphatiques drainant la cavité. Néanmoins, nous n'avons pu trouver trace de ces cellules dans les structures prélevées 1 hr après infection démontrant l'absence de migration des macrophages péritonéaux. L'autre hypothèse impliquait la mort de ces cellules. De façon surprenante, lors de l'analyse en cytométrie des macrophages, nous n'avons jamais enregistré de marquage franc avec le 7-AAD, un marqueur couramment utilisé pour éliminer les cellules mortes de l'acquisition. Néanmoins, le marquage avec l'Annexin V s'avérait positif et dans une plus

grand proportion chez les souris C57BL/6. L'Annexin V est un marqueur d'apoptose [370] se liant à la phosphatidylsérine exposée à la membrane des cellules en cours de mort programmée. Cependant, la cinétique décroissance du nombre des macrophages péritonéaux (< 1hr chez les souris C57BL/6), n'était pas compatible avec le processus apoptotique généralement plus lent [371]. Nous avons dès lors utilisés d'autres marqueurs de mort cellulaire (intercalants de l'ADN) mais de poids moléculaire plus faible que celui du 7-AAD. Ainsi, via un marquage au bromure d'éthidium nous avons pu mettre en évidence une fréquence accrue de macrophages double positifs Annexin V – EtBr chez les souris résistantes en comparaison des souris DBA/2. Ces observations sont compatibles avec les études montrant la capacité de *S. aureus* à induire précocement la mort des cellules *in vitro* sur des lignées cellulaires macrophagiques [333,334] ou sur des macrophages péritonéaux [338], et *in vitro* et *in vivo* sur des macrophages périvasculaires [284]. Cependant, les processus de mort cellulaire n'ont jamais été clairement démontrés *in vivo*. Ces observations indiquent la formation de pores dans la membrane des cellules, ce qui avec la cinétique du phénomène, suggérait la mise en place d'un programme de mort cellulaire appelé pyroptose. Pour confirmer cette mort cellulaire, nous avons analysé l'ensemble des marqueurs caractéristiques de ce processus. La détection de caspase-1 active au sein des macrophages associée à une importante sécrétion d'IL-1 β et à la libération de LDH dans les exsudats péritonéaux confirmaient cette hypothèse. L'activation de caspase-1 suggère également l'implication de l'inflammasome ce qui est en cohérence avec de précédents travaux mettant en évidence la relation entre *S. aureus* et ses toxines avec ce complexe multimoléculaire [281,298,332,338]. En effet, ces études montrent *in vitro* que *S. aureus* ou ses toxines, et en particulier l' α -hémolysine, induit la formation de l'inflammasome NLRP3, dépendant de ASC, dans les cellules monocytaires conduisant à l'activation de la caspase-1, à la libération d'IL-1 β et à la lyse cellulaire mesuré par la libération de LDH. La stimulation par *S. aureus*, ou ses toxines, de cellules monocytaires déficientes NLRP3 $^{-/-}$ ou ASC $^{-/-}$ ne permet pas l'activation de la caspase-1 dont dépend la libération d'IL-1 β , elle même mise en évidence par une déficience en caspase-1.

Différentes cinétiques de pyroptose : les causes

Ces différentes cinétiques de pyroptose peuvent avoir plusieurs origines. Premièrement, elles pourraient s'expliquer par une différentielle du récepteur de l' α -hémolysine, ADAM10 [87,284,298,332,335]. En effet, l'activation de l'inflammasome

NLRP3 observée dans ces études est dépendante de l' α -hémolysine de *S. aureus*. L' α -hémolysine se fixe spécifiquement sur le récepteur ADAM10 présent principalement sur les cellules épithéliales et les macrophages. Cette interaction permet la formation de pore dans la membrane conduisant à l'activation de l'inflammasome et à la lyse cellulaire. Cependant, nos analyses par cytométrie de flux n'ont pas révélé de différence d'expression d'ADAM10 à la surface des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 et DBA/2 ce qui a priori invalide cette hypothèse. Le phénotypage moléculaire par QPCR à haut débit des macrophages péritonéaux des deux lignées de souris et en dehors de toute infection, indique d'autres hypothèses. En premier lieu, ces analyses ont montré que l'expression de certains gènes essentiels au fonctionnement de l'inflammasome tels que *nlrp3* (NLRP3), *pycard* (ASC) ou *caspase-1* [281,298,331,332,338] était comparable entre les deux lignées de souris. Ce résultat prouve que l'inflammasome est, selon toute vraisemblance, fonctionnel dans les deux lignées de souris. Néanmoins, ces analyses ont permis de mettre en évidence des différences phénotypiques majeures entre les macrophages issus des deux fonds génétiques. D'un côté, trois gènes parmi ceux analysés sont plus exprimés dans les PerMF de souris DBA/2 comparés à ceux des souris C57BL/6 : resistin-like a (*fizz1*), *arginase-1*, et *signr3* qui sont assurément considérés (dans une moindre mesure pour *signr3*) comme marqueurs des macrophages activés alternativement, aussi appelés macrophages polarisés M2 [372,373]. De l'autre côté, les PerMF de souris C57BL/6 expriment, comparé aux macrophages issus de DBA/2, un panel de gènes plus large et difficilement associable à un seul état de polarisation défini. Les gènes *il12*, *ccl4*, *ccl5* et *tnfa* sont des marqueurs des macrophages activés classiquement (polarisés M1) alors que les gènes chitinase 3-like (*chi3l3*), *ccl17* et mannose récepteur 1 (*mrc1*) sont associés à une polarisation M2 [372]. Peu de données sont disponibles concernant le phénotype précis et la fonctionnalité des PerMF résidents à l'état basal. Bien que les macrophages résidents soient souvent associés à un profil « M2-like » assurant le maintien de l'homéostasie à l'état basal [185,186], les PerMF des souris C57BL/6 semblent plus orientés vers un phénotype M1 comparés aux souris DBA/2 dont les PerMF semblent plus engagés vers l'extrémité du phénotype M2. Ces données reflètent bien le continuum d'états phénotypiques que peut avoir un macrophage. Afin de confirmer l'hypothèse d'un impact du phénotype basal des macrophages sur la cinétique de pyroptose et la mobilisation de l'inflammasome suite à la stimulation par *S. aureus*, nous avons altéré *in vitro* le phénotype basal de macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDM) des 2 lignées de souris de façon à les engager vers un profil d'activation classique ou alternatif. L'analyse des niveaux d'activation de caspase-1 et de libération d'IL-1 β montre que les cellules possédant

un phénotype plus orienté vers la voie M1 ont une meilleure capacité à mobiliser leur inflammasome en réponse à *S. aureus* comparé aux macrophages possédant un phénotype M2. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude démontrant une moindre induction de l'inflammasome au sein des macrophages M2 suite à une stimulation par l'ATP via les récepteurs purynergiques [232]. Les résultats obtenus dans notre étude démontrent qu'il en va de même lors d'une exposition des macrophages à *S. aureus*. Par ailleurs, nous avons observé que les BMDM polarisés M1 issus des souris DBA/2 ont une moindre capacité à mobiliser l'inflammasome que ceux des souris C57BL/6. L'analyse de l'expression de gènes marqueurs des deux états de polarisation a révélé une plus faible expression *d'inos* indiquant une moindre activation classique dans les cellules DBA/2. Ces résultats soulignent à nouveau les différences biologiques entre macrophages de ces deux lignées. Cette différence génétique de polarisation des macrophages a été reportée dans un modèle de stéatose hépatique non alcoolique entre les souris C57BL/6 et BALB/c [374]. Ceci étant, la reproduction de ces expérimentations avec des macrophages différenciés de monocytes humains démontre à nouveau le lien entre phénotype basal des macrophages et les cinétiques de pyroptose induites par *S. aureus*.

Différentes cinétiques de pyroptose : les conséquences

La participation de la pyroptose dans l'inhibition de la croissance bactérienne est connue, en particulier dans le cadre des infections par des bactéries intracellulaires [375–377]. En effet, la lyse cellulaire résultant de la pyroptose permet d'exposer les bactéries qui dans certains cas profitent de la séquestration par le macrophage pour demeurer masquées et protégées de l'action des autres cellules effectrices de l'immunité. De plus, la lyse de la cellule entraîne la libération des enzymes lysosomiales dans le microenvironnement ce qui renforce l'action bactéricide locale [378]. Par ailleurs, caspase-1 favorise l'acidification du phagosome et contribue ainsi à la restriction de la croissance bactérienne [281]. La diminution significative de la charge bactérienne présente dans l'exsudat péritonéal des souris C57BL/6 30 minutes après infection pourrait refléter l'effet de la pyroptose plus précoce des macrophages résidents de ces souris.

Les cinétiques respectives de pyroptose des PerMF modifient le profil précoce de sécrétion de cytokines entre les souris C57BL/6 et DBA/2. En plus de favoriser une libération

précoce d'IL-1 β par les PerMF, la pyroptose induite semble limiter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dépendante de NF-kB. En effet, la survie prolongée des PerMF des souris DBA/2 permet la sécrétion d'une quantité importante cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, telles que CXCL1, CXCL2, IL-6 et TNF α . Ce résultat est cohérent des mesures effectuées à partir des exsudats péritonéaux. De façon surprenante, cette surproduction de chémokines CXCL1 et CXCL2 n'entraîne pas un recrutement en PMN exacerbé puisqu'à 4hr p.i. le nombre de PMN péritonéaux est équivalent entre les deux lignées de souris. Au contraire, nous avons même observé que le recrutement des PMN est plus précoce chez les souris C57BL/6 résistantes qui produisent moins de ces chemokines. Ces résultats sont confirmés par les essais de chémotaxie *in vitro* mettant en évidence une plus grande chémoattraction des PMN dans les surnageant de macrophages C57BL/6 stimulés par *S. aureus* et collectés à des temps précoces. Ainsi, il semble qu'il puisse y avoir un lien entre cinétique de pyroptose et recrutement des PMN. Au delà de la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 la pyroptose entraîne la lyse de la cellule et la libération de nombreux signaux pro-inflammatoires [339,379]. Les DAMPs (Damage-associated molecular patterns) alors libérés induisent le recrutement des leucocytes, notamment des PMN, au site inflammatoire et initient la sécrétion de cytokines [379]. Il est donc envisageable que la mort rapide des PerMF de C57BL/6 par pyroptose favorise un recrutement précoce de PMN et contribue ainsi à la limitation de la prolifération locale des bactéries. Toutefois, il reste difficile d'évaluer quelle part du mécanisme que nous avons décrit influe positivement ou négativement sur le devenir de l'infection. Indéniablement, le recrutement des PMN-inflammasome dépendent via la signalisation de l'IL-1 β joue un rôle majeur. En effet, des souris déficientes IL-1R $^{-/-}$, IL-1 β $^{-/-}$, ou ASC $^{-/-}$, ont toutes un recrutement en PMN fortement diminué et sont toutes très sensibles à l'infection par *S. aureus* [287,300,301]. Ces souris ayant toutes le même phénotype, il est malaisé de déterminer si c'est la production d'IL-1 β qui est déterminante ou si c'est le processus de pyroptose en lui-même. Dans le même ordre d'idée, la contribution des chemokines CXCL1 et CXCL2 reste incertaine. Classiquement, ces chemokines sont reconnues pour exercer une forte influence sur le recrutement des PMN et sont donc largement considérées comme essentielles à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace et bénéfique. Néanmoins, dans le cadre des infections staphylococciques, leur rôle pourrait être tout autre, tout du moins si leur sécrétion devait être exacerbée, comme tel est le cas dans les souris DBA/2. En attestent les résultats suivants : l'administration exogène de CXCL1 et CXCL2 dans un modèle intrapéritonéal ou sous cutané d'infection par *S. aureus*, augmente à la fois la mortalité des souris et la charge bactérienne [285,310]. A l'inverse, le

blocage de CXCR2, le récepteur de ces chemokines, améliore l'élimination des bactéries dans les infections des plaies par *S. aureus* [285]. Il a aussi été montré que la production locale de chimiokines CXC pouvait retarder l'apoptose des PMN, un mécanisme crucial pour éviter le détournement des PMN par *S. aureus* et pour prévenir des dommages tissulaires collatéraux [341]. En effet, dans un contexte riche en chimiokines CXC, les PMN internalisent *S. aureus* mais ne tuent pas la bactérie [310]. De plus, le récepteur de ces chemokines (CXCR2) constitue une cible majeure pour les leucotoxines produites par *S. aureus* [98]. La régulation de l'expression de CXCR2 sous une forte influence de CXCL1 et CXCL2 n'est selon nous pas décrite à ce jour. IL est possible que l'expression de CXCR2 soit dans de telles circonstances up régulée ce qui favoriserait par conséquent la lyse des PMN via les leucotoxines comme LuKED [98]. Au-delà de l'intensité du recrutement des PMN, il est probable que la vitesse de ce phénomène joue également un rôle important. La quantification des charges bactériennes associées aux exsudats péritonéaux montre indéniablement une moindre élimination des bactéries chez les souris DBA/2 et ce dès 2 hr p.i. L'utilisation d'une souche de *S. aureus* exprimant la GFP révèle une répartition de la charge bactérienne totalement différente entre les deux lignées de souris. Dans le cas des souris C57BL/6, les bactéries sont rapidement libérées des macrophages qui meurent par pyroptose pour être ensuite prises en charge par les PMN précocement recrutés. Ces résultats sont en accord avec d'autres modèles de péritonites associés à un sepsis qui indiquent que le recrutement précoce et intense de PMN diminue efficacement la charge bactérienne locale et améliore la survie [380]. De même, dans des modèles d'infection sous cutanée ou intraveineuse par *S. aureus*, un recrutement moindre de PMN est associé à la sensibilité avec un moindre contrôle de la charge bactérienne [248,287,367]. Inversement, la pyroptose retardée des macrophages entraîne la séquestration des bactéries et s'associe à un défaut initial de recrutement des PMN. En outre, il est intéressant de noter qu'il a été montré que *S. aureus* est capable de survivre et de se répliquer activement dans les macrophages humains pendant plusieurs jours [357].

Enfin, le phénotype des PMN recrutés pourrait lui aussi influencer sur l'évolution de l'infection. En effet, les PMN peuvent présenter différents phénotypes selon le microenvironnement dans lequel ils sont recrutés. Ces phénotypes apparaissent alors hétérogènes selon la sensibilité de l'individu à l'infection par *S. aureus* ou *L. major*, avec une production différentielle de cytokines et chimiokines, et une expression différente de marqueurs de surface [309,381]. Ainsi, le contexte de recrutement du PMN impacte non seulement sur l'intensité de l'afflux en PMN mais aussi sur leurs fonctions avec des

conséquences majeures sur la réponse inflammatoire qui en découle [309,382,383]. Le contexte généré par les différentes cinétiques de pyroptose pourrait influencer sur le phénotype des PMN recrutés au sein des deux lignées de souris. Dans nos conditions expérimentales, nos analyses montrent qu'il n'existe pas de différence intrinsèque dans la capacité des PMN naïfs issus de chaque lignée de souris à tuer *S. aureus*. De plus, l'activation de ces PMN naïfs à l'aide d'exsudats péritonéaux collectés de chaque fond génétique en cours d'infection, certes améliore la capacité bactéricide des PMN mais ne permet de mettre en évidence de différence selon l'origine des PMN ou des exsudats péritonéaux. Nous pouvons en conclure que les différents contextes inflammatoires orchestrés par la cinétique de pyroptose ne modulent pas différenciellement la bactéricidie des PMN. Par contre, nous avons montré que les PMN de souris C57BL/6 produisent des niveaux d'IL-1 β très nettement supérieurs aux PMN de DBA/2. C'est une observation importante car il a été montré que les PMN producteurs d'IL-1 β étaient nécessaires pour la formation d'abcès et le contrôle de l'infection sous cutanée par *S. aureus* [286]. En revanche, la fréquence des PMN produisant de l'IL-10 est bien supérieure chez les souris DBA/2 ce qui est susceptible de participer négativement au devenir de l'infection. En effet, la production d'IL10 par les PMN est connue pour supprimer l'activité des monocytes inflammatoires dans les sepsis polymicrobiens, entraînant une moindre élimination des bactéries et une issue fatale [323]. De même, l'expression induite d'IL-10 dans les étapes précoces (<6hrs) d'une infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa* diminue l'influx des PMN et limite la bactéricidie ce qui entraîne une surproduction de CXCL1 qui s'accompagne ultérieurement de dommages tissulaires et d'une augmentation de la mortalité [384]. Outre cette production différente de cytokines, les PMN des 2 lignées de souris présentent des phénotypes différents de par leur expression de CD11b et de CD49d. Chez les souris C57BL/6 nous avons mis en évidence un recrutement plus important de PMN CD49d+ avec une expression de CD11b plus intense, indiquant un phénotype plus activé comparé aux PMN des souris DBA/2. Bien que non évalué dans notre travail, il serait intéressant de tenter d'établir un lien entre phénotype de ces PMN et sécrétion cytokinique. Néanmoins, il existe quelques indices dans la littérature. Ainsi, Tsuda et al. (2004) ont mis en évidence l'existence de différentes sous-populations de PMN suivant le contexte inflammatoire de l'hôte [309]. En créant un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) d'intensité modérée ou sévère après brûlure au second ou au troisième degré, ils ont généré deux populations distinctes de PMN. Ces populations de PMN se distinguent notamment par l'expression de CD49d, CD11b et de certains TLRs. Il est à noter que, tout comme dans notre étude, ces populations de PMN ne semblent pas avoir d'activité bactéricide

différente. Cependant, le transfert de ces populations module fortement la sensibilité à une infection par *S. aureus* (une souche de type SARM). Dans ces circonstances, les PMN CD49d+ (PMN-I) confèrent une résistance contrairement aux CD49d- (PMNII). De plus, ils ont associé les PMN CD49d- avec une production d'IL-10, comme les souris DBA/2 de notre étude.

Cette différence fonctionnelle des PMN entre les 2 lignées de souris pourrait impacter sur le recrutement des monocytes inflammatoires. En effet, la sécrétion des PMN, de même que les protéines de leurs granules, recrutent et activent directement les monocytes inflammatoires et régulent leur activité antibactérienne [241,309,319–324]. Dans notre étude, on observe un recrutement doublé de monocytes inflammatoires à 12hrs p.i. dans les souris C57BL/6 comparées aux souris DBA/2. En effet, l'IL-1 β produit par les PMN des souris C57BL/6 favorise le recrutement et la rétention des macrophages [385], contrairement à l'IL-10 produit par les PMN des souris DBA/2 qui inhibe l'activité des monocytes inflammatoires [323]. La coopération entre les cellules monocytaires et les PMN est bien connue. En effet, plusieurs études suggèrent que les PMN sont capables de moduler le phénotype des macrophages par la production de médiateurs solubles ou via l'élimination des PMN sénescents par les macrophages [241,322,324]. Cependant, dans le cadre des infections à *S. aureus*, la contribution des PMN dans la modulation du phénotype des macrophages est encore peu étudiée. Dans l'étude de Tsuda et ses collaborateurs, ils ont aussi montré que ces deux populations distinctes de PMN activaient différenciellement les macrophages [309]. Les PMN des souris résistantes (PMN-I) activent classiquement les macrophages (M1), alors que les PMN des souris sensibles (PMN-II) induisent la génération de macrophages activés alternativement (M2). Une prédominance de macrophages M1, produisant des cytokines pro-inflammatoires, semble avoir un rôle bénéfique dans l'infection par SARM, alors qu'une prédominance de macrophages M2, produisant des cytokines anti-inflammatoires, semble avoir un rôle délétère. Ainsi, la production de cytokines par les PMN module l'activation des macrophages et pourrait orienter la réponse à *S.aureus*. En effet, l'état de polarisation du macrophage semble être un processus majeur dans la résolution de l'inflammation ou la persistance de l'infection [249,309,325]. Dans ces études, une polarisation vers le phénotype M2 est toujours associée à la sensibilité à l'infection par *S. aureus*. Cependant, un programme de polarisation M1 trop prolongé peut aussi être délétère pour l'hôte, générant une inflammation excessive [168,231–233]. L'analyse des gènes exprimés par les monocytes inflammatoires à 16hrs p.i. montre bien que les monocytes des 2 lignées de souris sont

différents. Bien que les monocytes des souris C57BL/6 expriment plus fortement 2 gènes (*Ym1* and *IL-10*) associés à un programme de polarisation M2, ils expriment aussi des niveaux plus élevés d'*iNOS* et de *CCL5* qui sont caractéristiques du phénotype M1. L'expression d'*iNOS* permettrait ainsi de mieux contrôler la charge bactérienne, *CCL5* d'induire une amplification du recrutement monocyttaire, avant enfin de switcher vers un phénotype M2 résolutif par l'expression d'*IL-10* et de *Ym1*. En effet, d'autres modèles ont montré une activation atypique des macrophages, avec des caractéristiques des phénotypes M1 et M2 [231,386,387]. Bystrom et ses collaborateurs ont ainsi montré que lors d'une péritonite induite par du zymosan, les macrophages associés à la résolution de l'inflammation présentaient des caractéristiques communes aux phénotypes M1 et M2 [387]. Ces macrophages exprimaient des hauts niveaux d'*IL-10*, mais aussi d'*iNOS*, comme dans notre modèle. L'association de différents signaux pro-M1 ou pro-M2 entrainerait donc l'apparition de macrophages avec une signature chimérique. De même, les macrophages des souris DBA/2 expriment plus fortement 2 gènes caractéristiques du phénotype M1 (*IL6* et *IL12b*), mais expriment aussi plus fortement *Dectin-1*, *CCL17* et *Signr3* qui sont associés au phénotype de polarisation M2 [215,373,388]. L'expression concomitante d'*IL-12* et de *dectin-1* a été associée à un défaut de résolution dans un modèle d'ulcère veineux chronique [233]. Dans les souris DBA/2, la production d'*IL-10* par les PMN inhiberait l'activité bactéricide « pro-M1 » des monocytes recrutés et ne permettrait pas de contrôler la charge bactérienne [323]. Ainsi, d'une part l'orientation des macrophages vers un phénotype M2 avant l'élimination de la bactérie ne permettrait pas le contrôle de l'infection, et d'autre part, la production d'*IL6* amplifierait l'évolution vers un choc septique. En accord avec notre étude, Tsuda et al ont montré que la forte sécrétion de *CCL17* est associée à la sensibilité alors que la forte production d'*iNOS* et *CCL5* est associée à la résistance à l'infection par SARM [309]. Tsuda et al ont conclu que les souris sensibles induisent un phénotype M2 et que les souris résistantes induisent un phénotype M1 sans que d'autres gènes n'aient été analysés. Sachant que les macrophages ne sont pas limités à ces 2 phénotypes et qu'ils sont plutôt dans un continuum d'activation, ces conclusions semblent peut être trop tranchées. Plutôt, c'est l'équilibre étroit entre les signaux du microenvironnement dépendant du degré d'inflammation et les différents états de polarisation du macrophage générés en conséquence qui permet le contrôle de l'infection. Cependant, notre analyse est également critiquable car nous avons analysé les monocytes à 16hrs p.i., alors qu'ils sont en cours de différenciation en macrophages. Les gènes exprimés pourraient de fait varier si l'analyse avait été réalisée sur des macrophages pleinement différenciés. Néanmoins, il est indéniable que les monocytes sont différents entre les 2 lignées de souris. Il

est maintenant essentiel d'établir le lien entre ces phénotypes et celui des PMN recrutés. Ceci étant dit, en raison de l'incompatibilité des molécules de classe I, les fonds génétiques utilisés dans notre étude représentent un frein majeur aux expérimentations de transfert de cellules qui auraient permis de telles confirmations.

Pour tenter de palier à cet obstacle nous avons essayé de reconstituer un phénotype C57BL/6 résistant en induisant précocement l'inflammasome des souris DBA/2. L'utilisation de l'ATP ou de la nigéricine, deux inducteurs de l'inflammasome, diminue le nombre de macrophages dans les souris DBA/2 traitées dans des proportions similaires à celles observées chez les souris C57BL/6 suite à l'infection par *S. aureus* (et sans traitement inducteur). Cette diminution des macrophages résidents est corrélée à la production d'IL-1 β . Ces inducteurs de l'inflammasome restaurent ainsi dans les souris DBA/2 un taux de pyroptose comparable à celui des souris C57BL/6. Par ailleurs, on constate que cette pyroptose induite précocement dans les souris DBA/2 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , CXCL1 et IL-6 dans les souris DBA/2 et restaure des niveaux comparables à ceux des souris résistantes. Ces expériences confirment qu'une pyroptose rapide empêche la production des cytokines pro-inflammatoires nécessitant l'induction d'NF-kB. Ainsi, la cinétique de pyroptose module indéniablement le profil de réponse inflammatoire induit par les macrophages résidents péritonéaux. Cette modulation est aussi reflétée par le phénotype des PMN recrutés. Dans les souris DBA/2 traitées, le pourcentage de PMN CD49d+ est similaire aux souris résistantes et significativement plus élevé que dans les souris DBA/2 non traitées. Cependant, la contribution de la pyroptose dans ce processus reste encore à élucider, bien que le contexte inflammatoire qu'elle génère joue probablement un rôle. En dernier lieu, nous avons évalué l'influence de la cinétique de pyroptose sur le devenir de l'infection. Nous avons donc évalué la survie des souris DBA/2 traitées suite à l'infection par *S. aureus*, en comparaison avec les souris C57BL/6 et les souris DBA/2 non traitées. Le traitement des souris DBA/2 avec les inducteurs de l'inflammasome améliore partiellement leur survie mais ne restaure pas un niveau de résistance comparable aux souris C57BL/6. De plus, il est important de préciser que la nigéricine est aussi appelée azalomycine M ou helixine C due à son activité antibiotique sur certaine bactérie Gram positive. En revanche, elle n'a pas d'activité sur *S. aureus* à 0,5 μ M ou à des doses plus faibles [389], et elle a été utilisée dans cette étude à 0,25 μ M. Cependant, ces résultats suggèrent que le retard de pyroptose des macrophages résidents n'est pas le seul mécanisme responsable de la sensibilité des souris DBA/2 suite à une infection i.p. par *S. aureus*. Il semble que ce soit la combinaison d'un

contexte inflammatoire exacerbé, résultant très probablement d'un retard de pyroptose, avec d'autres altérations immunitaires dans les souris DBA/2 ne permettant pas un contrôle satisfaisant de la bactérie, qui conduise au développement du sepsis.

En conclusion, cette étude démontre qu'en association avec la génétique de l'hôte, le phénotype basal des macrophages résidents influence directement l'orchestration précoce de la réponse inflammatoire induite par l'infection à *S. aureus* via la voie de l'inflammasome et la pyroptose qui en résulte. Nous avons fourni la preuve que, au-delà de la libération d'IL-1 β , une pyroptose précoce limite la libération d'une grande variété de cytokines pro-inflammatoires connues pour contribuer au syndrome de réponse inflammatoire systémique et son évolution en choc septique. Une meilleure compréhension de la base génétique et/ou des facteurs environnementaux influençant le phénotype des macrophages à l'état basal et la façon dont ils se polarisent suite à la rencontre avec le pathogène pourrait rendre possible le développement de nouvelles stratégies pour la lutte contre les infections bactériennes. Cette étude offre ainsi de nouvelles possibilités d'interventions ciblées non plus sur le pathogène, mais sur l'hôte et sa réponse.

Phénotype basal des macrophages : Etude approfondie

Les résultats obtenus lors de notre première étude suggèrent que le phénotype basal des macrophages péritonéaux résidents varie d'un individu à l'autre ce qui semble influencer quantitativement et qualitativement sur la réponse inflammatoire mise en jeu.

Cela dit au cours de nos travaux, nous avons fait le constat que, malgré le très grand nombre de travaux ayant utilisé les macrophages péritonéaux de souris comme modèle d'étude de la biologie de ces cellules dans différents contextes infectieux ou inflammatoires, la description de leur phénotype basal reste assez imprécise. Communément, différents agents induisant une péritonite stérile sont utilisés pour induire le recrutement de « macrophages péritonéaux » afin d'en récolter d'importantes quantités. La plus connue étant l'administration de thioglycolate. Néanmoins, ces méthodes posent question car il est très probable que le phénotype des macrophages recrutés soit significativement différent des macrophages péritonéaux résidents.

Par ailleurs, de manière à accroître le degré de précision du phénotypage que nous projetions d'entreprendre sur les macrophages péritonéaux résidents, nous avons opté pour une caractérisation à l'échelle de la cellule unique. Cette approche nous a en effet permis

d'appréhender toute la diversité et la plasticité des populations macrophagiques contrairement aux méthodes plus classiques utilisant des pools de cellules avec comme défaut de moyenniser le phénotype moléculaire et ainsi de gommer des différences importantes entre sous populations. Par ailleurs, quelques études avaient d'ores et déjà souligné la diversité des populations de macrophages péritonéaux à l'état basal au travers d'analyses en cytométrie de flux [390,391] ce qui insiste sur la nécessité de ne pas étudier ces cellules en tant que population homogène. En effet, deux populations ont été identifiées selon la taille et les marqueurs cellulaires présents à leur surface. Les macrophages de grande taille (Large Peritoneal Macrophages) représentent environ 90% de la population totale de macrophages péritonéaux résidents et se caractérisent par une expression intense des marqueurs F4-80 et CD11b (F4-80^{high} ; CD11b^{high}). La seconde population se compose de petits macrophages (Small Peritoneal Macrophages) présentant une moindre expression des marqueurs F4-80 et CD11b (F4-80^{int} ; CD11b^{int}). Cependant, le phénotype moléculaire précis de ces 2 populations n'a pas été évalué.

Actuellement, il est considéré que le phénotype des macrophages résidents s'apparente au phénotype M2 afin d'assurer l'homéostasie tissulaire [176,177,185,186]. L'analyse de l'expression de gènes caractéristiques de la signature M2, tels que *KLF4*, *STAT6*, *STAT3*, *SOCS2* et *Dectin-1*, antagonistes du phénotype M1 [167,373,392,393], confirme le phénotype M2-like des deux sous populations de macrophages résidents. Néanmoins, notre analyse à l'échelle de la cellule unique a révélé l'existence de signatures moléculaires spécifiques de chacune de ces deux populations.

La classification hiérarchique ascendante discrimine parfaitement les LPM des SPM et l'analyse de type Random Forest montre que cette différence repose principalement sur l'expression différentielle de six gènes. La signature LPM se caractérise par l'expression exclusive du gène codant pour *cxcl13*, une chémokine constitutivement exprimée par les macrophages péritonéaux et impliquée dans le recrutement et l'entretien des lymphocytes B1 de la cavité péritonéale favorisant ainsi une immunité locale efficace [394]. La déficience en CXCR5 (le récepteur à CXCL13) ou CXCL13 montre un défaut de développement des nœuds lymphatiques périphériques, un nombre réduit des plaques de Peyer et une désorganisation des follicules primaires dans la rate [395]. De plus, les macrophages péritonéaux pourraient être une source physiologique importante de CXCL13 lors de l'inflammation et contribuer au recrutement des cellules B au site infectieux [395]. Nos données démontrent que le maintien

de l'homéostasie du compartiment en lymphocytes B1 est, au sein de la population de macrophages péritonéaux, exclusivement assurée par les LPM.

De façon concordante, les LPM présentent une forte expression du récepteur scavenger A (*sr-a*) également associé au phénotype M2. Ce récepteur est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques des macrophages dont l'adhésion, l'endocytose des lipoprotéines modifiées, la liaison et la phagocytose des pathogènes, la détoxification des composants spécifiques des pathogènes et l'élimination des cellules apoptotiques ou sénescents de l'hôte [396]. L'expression de Sr-A à la membrane des macrophages péritonéaux, mais aussi d'autres macrophages tissulaires, leur confère un rôle de sentinelle tissulaire et permet d'induire dans certains contextes l'activation du macrophage et la réponse inflammatoire [244].

Dans le même ordre d'idées, l'expression exclusive de *l'ifngr1*, un des récepteurs cellulaires de l'IFNg, renforce cette notion de sentinelle et suggère que ces LPM pourraient en présence d'IFNg acquérir rapidement un phénotype M1 pro-inflammatoire. En effet, la stimulation par l'IFNg active les fonctions microbicides effectrices des macrophages qui montrent alors une augmentation des capacités de pinocytose, de phagocytose et de destruction des pathogènes [397]. Les souris déficientes pour l'IFNgR1, bien que leur système immunitaire semble se développer normalement, présentent une moindre résistance naturelle aux infections bactériennes, parasitaires et virales [397].

Dans leur ensemble, ces données confirment le caractère homéostatique des LPM et soulignent leur rôle de sentinelles de la cavité péritonéale capables, le cas échéant, d'initier une réponse inflammatoire et d'acquérir un phénotype M1.

En comparaison, les SPM expriment un répertoire de gènes différent qui se caractérise principalement par l'expression de *Fizz1* et *Mrc1*, tous deux des marqueurs reconnus du phénotype M2. L'expression de *Fizz1*, encore appelé *retnla* pour resistin-like alpha ou RELM-alpha, est principalement associée à une activation alternative des macrophages et une régulation négative des gènes de polarisation M1 [398]. L'induction de ce gène a été mise en évidence dans les fibroses pulmonaires où la protéine Fizz1 semble avoir un rôle profibrogénique de par sa capacité à induire la différenciation des myofibroblastes et à recruter les cellules dérivées de la moelle osseuse [399]. *Fizz1* est également impliqué dans la régulation de l'inflammation pulmonaire induite par les cytokines Th2 en réponse aux infections helminthiques [400]. Au delà de ces informations, les fonctions de Fizz1 sont encore peu connues.

Le récepteur Mannose (MR), codé par le gène *Mrc1*, est exprimé à la surface des cellules dendritiques et des macrophages et permet la reconnaissance puis la phagocytose de divers pathogènes [401]. Au delà de la détection des résidus mannose, N-acétylglucosamine ou fucose sur les glucanes fixés aux protéines [402], ce récepteur participe à l'élimination de certaines glycoprotéines telles que des hormones sulfatées ou des glycoprotéines synthétisées en réponse à des évènements pathologiques. Bien que présentant une signature moléculaire fortement différente, les SPM pourraient, tout comme les LPM, jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie de la cavité péritonéale. Par ailleurs, de notre approche d'analyse sur cellule unique, nous avons mis en évidence l'hétérogénéité de la population des SPM. Sur la base de l'expression des gènes *Fizz1* et *Mrc1*, cette dichotomie est franche. L'analyse par cytométrie de flux de l'expression du récepteur mannose (CD206) confirme l'existence de deux sous-populations de SPM. Une contamination par des cellules non SPM co-isolées lors du tri cellulaire restait envisageable. En effet, F4-80 est théoriquement exprimé à la surface des cellules dendritiques [403] et des éosinophiles [404] à des niveaux comparables à ceux des SPM [390]. Néanmoins, l'analyse cytométrique des SPM triés selon les paramètres de forward (taille) et surtout de side (granulosité) scatter montre une population SPM avec une faible granulosité ce qui exclue la contamination par des granulocytes éosinophiles. De même, les SPM restent négatifs pour le CD11c, un marqueur générique des cellules dendritiques. En outre, les cellules dendritiques de la cavité péritonéale n'expriment pas le F4-80 [234,390]. Il est donc probable que notre population SPM soit un ensemble de deux sous populations de macrophages. Cette observation représente une démonstration assez convaincante des biais possiblement associés à l'analyse phénotypique de population cellulaire en tant que groupe de cellules. En outre, comme le montrent nos mesures d'expression, quelques cellules au sein d'un pool (1×10^6) sont susceptibles de fausser significativement le niveau réel d'expression moyenne d'un gène donné. Dans le cas particulier du compartiment macrophagique, ce type de biais peut masquer l'hétérogénéité de la population étudiée en gommant la variabilité phénotypique liée à la plasticité de ces cellules selon leur état de différenciation ou d'activation et les rôles qu'elles doivent assumer dans l'organisme.

Néanmoins, il reste difficile de déterminer si ces populations de SPM ont une fonction biologique bien déterminée ou s'ils constituent des états intermédiaires de différenciation du stade final à savoir les LPM. En effet, les expériences de suivi cellulaire précédemment réalisées [390] ont démontré que les LPM ne se différencient pas en SPM, pour autant la possibilité contraire n'a pas été étudiée en détail. Le marquage de cellules souches hématopoïétiques par internalisation de BrdU, un marqueur de division cellulaire, a permis de

démontrer que le compartiment LPM à une longue durée de vie et ne nécessite pas d'ajout d'origine hématopoïétique pour se maintenir à l'état basal [391]. Par ailleurs, il est considéré que les macrophages exprimant des hauts niveaux du marqueur F4-80 avaient une origine vitelline contrairement aux autres macrophages d'origine hématopoïétique [405]. Pourtant, une irradiation (souris C57BL/6) suivie d'une reconstitution avec des cellules souches issues de souris C57BL/6 CD45.1 entraîne le repeuplement du compartiment LPM par des cellules d'origine hématopoïétiques puisque 70% des LPM sont alors CD45.1 [391]. Il semble donc que dans certaines circonstances conduisant à déplétion du pool de LPM résidents (irradiation, infection, inflammation etc.) une partie de ce compartiment puisse être restaurée par un afflux monocyttaire. L'origine des SPM est moins incertaine et, à l'aide de plusieurs modèles de péritonite stérile induite par l'administration de LPS ou de thioglycolate, a été définie comme monocyttaire [390,391]. Plus particulièrement, il s'agirait de monocytes inflammatoires (Ly6Chigh) qui, une fois recrutés dans la cavité péritonéale, entament leur différenciation en macrophages « SPM ». Bien que certaines similitudes aient été mises en évidence par cytométrie entre les SPM résidents et les « SPM » recrutés suite à l'administration de thioglycolate, cette association reste sujette à caution car aucune caractérisation poussée n'a été effectuée et rien ne prouve que les SPM recrutés aient conservé un phénotype homéostatique. Nos résultats confirment effectivement que le phénotype des « SPM » recrutés est très altéré. Cette modification se traduit par l'expression de gènes usuellement associés à l'activation classique des macrophages (M1) tels que *tnfa* ou certaines chemokines inflammatoires telles que *ccl3*, *ccl4* ou *ccl5*. En parallèle, la diminution de l'expression de gènes tels que *klf4*, *mrc1* ou *fizz1*, véritables signatures moléculaires du phénotype SPM résident, confirme la répression du phénotype M2. De façon intéressante, nous avons également pu constater que certains gènes caractéristiques du compartiment LPM, à savoir *cxcl13*, *Sr-A* ou encore *ccl24* présentent une expression plus marquée dans les SPM recrutés que dans les résidents. Cette observation est un indice supplémentaire de la probable participation des monocytes inflammatoires dans la reconstitution de la population LPM. Les travaux de Yona et al. vont en ce sens et montrent la persistance des monocytes/macrophages inflammatoires (jusqu'ici appelés SPM recrutés) jusque deux mois après l'administration de thioglycolate [183]. Ces cellules acquièrent au cours du temps un phénotype CMHII^{low} F4-80^{high} a priori comparable à celui des LPM.

Dans ce contexte il apparaît difficile de déterminer où s'arrête le phénotype stable de la cellule résidente et où commence le retour à phénotype comparable de la cellule recrutée et en cours de différenciation. Il semblerait toutefois utile de trouver une terminologie qui

permette de clairement rendre compte des cellules considérées : résidentes ou recrutées. Selon toute logique, le terme SPM ne peut s'appliquer à la fois aux petits macrophages résidents de la cavité péritonéale et aux monocytes inflammatoire qui viennent reconstituer, même partiellement, le compartiment macrophagique.

Indéniablement, l'étude du phénotype des monocytes/macrophages tissulaires ou circulants par le biais de l'analyse à l'échelle de la cellule unique devrait permettre de mieux appréhender la complexité et la plasticité de ce compartiment cellulaire. Son application sur d'autres type de macrophages résidents, tels que les macrophages alvéolaires ou encore les cellules de Kuppfer, permettrait d'accroître le panel de signatures moléculaires qui leur sont associées et ainsi de mieux définir les bases mécanistiques de leur différenciation et de leur activation selon les contextes tissulaires.

Perspectives

La pyroptose était initialement considérée comme un mécanisme pathogénique utilisé par la bactérie pour détruire les cellules immunitaires de l'hôte. Cependant elle peut aussi être un mécanisme des défenses de l'hôte utilisé pour la clairance des pathogènes intracellulaires. La pyroptose a été bien décrite dans les infections par des pathogènes intracellulaires permettant de supprimer une niche écologique dans le macrophage conférant la protection de l'hôte à l'infection [375–377]. Certains pathogènes ont ainsi développé des mécanismes afin d'inhiber la pyroptose [379]. Dans le cadre de *S. aureus*, les modèles d'infections sous cutanées suggèrent plutôt la lyse cellulaire comme une stratégie d'évasion de *S. aureus* lui permettant de pénétrer à travers la barrière des kératinocytes et de lyser les macrophages périvasculaires, inhibant le recrutement neutrophilique [284,331]. De même, l' α -hémolysine de *S. aureus* a été associée à une pneumonie sévère via un mécanisme impliquant l'activation de l'inflammasome NLRP3 et « une mort cellulaire nécrotique » des macrophages induisant la production d'IL-1 β et d'alarmines qui résultait en des dommages pulmonaires [87]. Il faudrait ainsi déterminer le rôle du phénotype basal des macrophages dans le devenir de ces infections. Une polarisation orientée M1 à l'état basal serait-elle néfaste au niveau pulmonaire dans la réponse à *S. aureus*? Est ce que le phénotype basal module cette libération d'alarmines ? De plus, il faudrait évaluer l'impact de ces DAMPs libérés sur le recrutement et le phénotype des PMN recrutés, mais aussi quels facteurs jouent un rôle crucial. Le phénotype des PMN recrutés est peut être le reflet du contexte inflammatoire généré selon le phénotype basal des macrophages résidents. Il est donc important de bien considérer le lieu de l'infection, les

macrophages présentant des caractéristiques intrinsèques différentes selon leur localisation tissulaires, et les réponses de l'hôte étant différentes selon la localisation de l'infection. De plus, même au sein d'un tissu, il peut exister différentes populations de macrophage avec des propriétés intrinsèques différentes comme le montre notre 2^{ème} étude.

Ces 2 études apportent ainsi de nouvelles preuves du lien probable entre phénotype basal des macrophages résidents et leur implication dans diverses situations infectieuses ou pathologiques. En effet, les macrophages jouent un rôle clé dans de nombreuses maladies inflammatoires et dans plusieurs désordres métaboliques. L'état de polarisation des macrophages a un impact majeur sur le devenir de certaines infections, les différentes formes de sepsis, l'athérosclérose, l'obésité, la tumorigénèse ou encore l'asthme [177,406]. Par exemple, une altération du microbiote intestinal modifie le phénotype des macrophages résidents et entraîne des répercussions significative sur la résistance de l'hôte à une infection virale [407]. En effet, les signaux émis par les bactéries commensales régulent l'état d'activation des macrophages à l'état basal et de ce fait, modulent les réponses immunitaires innées à une infection virale. A l'état basal, les niveaux d'expression des gènes relatifs aux défenses antivirales sont plus exprimés dans les macrophages péritonéaux des souris saines comparées aux souris avec un microbiote altéré. En effet, les voies de détection des virus, de signalisation des IFN tels que *irf7*, *stat1*, *stat2* et *ifngr1*, et de l'inhibition de la réplication virale sont moins exprimés par les macrophages des souris ayant un microbiote défaillant comparées aux souris sauvages. Une altération du microbiote résulte ainsi en une moindre capacité à répondre à une infection virale et aux IFNs. Comme le suggère notre étude, la génétique de l'hôte peut elle aussi moduler ce phénotype basal et influencer la réponse des macrophages résidents lors d'une infection. Ce type de biais de polarisation dicté par le fond génétique de l'hôte a également été observé entre les souris C57BL/6 et Balb/c dans un modèle de stéatose hépatique non alcoolique [374]. Dans ce contexte, une polarisation vers le phénotype M1 semble associée à la progression de la maladie vers la stéatohépatite. La pathogenèse de la stéatose hépatique non alcoolique et le syndrome métabolique semblent avoir des mécanismes physiopathologiques communs liés à une résistance à l'insuline [408]. Dans des individus sains, une polarisation M2 des macrophages du tissu adipeux est cruciale dans la lipolyse et l'homéostasie tissulaire, permettant la prévention de l'inflammation et le maintien de la sensibilité à l'insuline [409]. Dans le cadre de l'obésité, le tissu adipeux est constitué principalement de macrophages de phénotype M1 pro-inflammatoire contribuant à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2. La polarisation des macrophages dans l'obésité et la résistance à l'insuline pourrait être modifié par des styles de vie, de régime

alimentaire, des médiateurs humoraux ou certains facteurs transcriptionnels [410]. Il est aussi connu que les macrophages jouent un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose. L'accumulation des macrophages de phénotype M1 dans les plaques d'athéromes en progression semble liée à une élévation du risque d'accident vasculaire athérotrombotique [411]. De ce fait, des stratégies thérapeutiques capables de repolariser les infiltrats macrophagiques vers un phénotype M2 pourraient avoir une action protectrice. De façon similaire, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) jouent un rôle crucial dans la formation du cancer. Lorsque que la tumeur progresse vers la malignité, les TAM contribuent à l'angiogenèse, à l'invasion, aux métastases des tumeurs, et à la diminution de l'immunité anti-tumorale [412]. Ces TAM sont généralement associés à un phénotype M2. De ce fait, des stratégies capables d'induire la polarisation M1 ou d'inhiber le développement du phénotype TAM M2-like pro-angiogénique sont en cours de développement [413]. En conclusion, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des macrophages et le maintien de leur phénotype basal en fonction des influences microenvironnementales pourrait offrir de nouvelles pistes de recherche afin de développer de nouveaux outils diagnostiques ou thérapeutiques.

Références

1. Orenstein A. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*. *Gevonden Op*. 2011; Available: <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf>
2. Hill LR. The Adansonian classification of the staphylococci. *J Gen Microbiol*. 1959;20: 277–283.
3. Whitman WB, editor. *Systematic Bacteriology* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009. Available: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-68489-5>
4. Tille PM. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 2014.
5. Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz TL, Driscoll T, Gabbard JL, et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: D581–591. doi:10.1093/nar/gkt1099
6. Cunha M de LRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99: 855–860. doi:/S0074-02762004000800012
7. Garcia P. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. *J Med Microbiol*. 2004;53: 67–72. doi:10.1099/jmm.0.04994-0
8. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. 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*. 2001;32: S114–S132.
9. Rosenstein R, Götz F. What distinguishes highly pathogenic staphylococci from medium- and non-pathogenic? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;358: 33–89. doi:10.1007/82_2012_286
10. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2003;67: 686–723.
11. Brown S, Meredith T, Swoboda J, Walker S. *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* W23 Make Polyribitol Wall Teichoic Acids Using Different Enzymatic Pathways. *Chem Biol*. 2010;17: 1101–1110. doi:10.1016/j.chembiol.2010.07.017
12. Xia G, Kohler T, Peschel A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2010;300: 148–154. doi:10.1016/j.ijmm.2009.10.001
13. Seo HS, Michalek SM, Nahm MH. Lipoteichoic Acid Is Important in Innate Immune Responses to Gram-Positive Bacteria. *Infect Immun*. 2008;76: 206–213. doi:10.1128/IAI.01140-07

14. Volz T, Nega M, Buschmann J, Kaesler S, Guenova E, Peschel A, et al. Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J*. 2010;24: 4089–4102. doi:10.1096/fj.09-151001
15. Nilsson I-M, Lee JC, Bremell T, Ryden C, Tarkowski A. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect Immun*. 1997;65: 4216–4221.
16. O’Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17: 218–234. doi:10.1128/CMR.17.1.218-234.2004
17. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;339: 520–532.
18. Behme RJ, Shuttleworth R, McNabb A, Colby WD. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. *J Clin Microbiol*. 1996;34: 3075–3084.
19. Nandy P, Roy S, Thakur AR, Chaudhuri SR. Comparative study on characterization of three staphylococcal isolates from varied origin. 2013; Available: <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/36824>
20. Brown DFJ. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*. 2005;56: 1000–1018. doi:10.1093/jac/dki372
21. Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>
22. Vitko NP, Richardson AR. Laboratory Maintenance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In: Coico R, Kowalik T, Quarles J, Stevenson B, Taylor R, editors. *Current Protocols in Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. Available: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780471729259.mc09c02s28>
23. Kim B-S, Yi H, Chun J, Cha C-J. Genome sequence of type strain of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Gut Pathog*. 2014;6: 6.
24. Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101: 9786–9791.
25. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67: 3057–3071. doi:10.1007/s00018-010-0389-4
26. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44: 1549–1555.

27. Guinane CM, Penadés JR, Fitzgerald JR. The role of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* host adaptation. *Virulence*. 2011;2: 241–243. doi:10.4161/viru.2.3.16193
28. Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2014;304: 103–109. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.010
29. Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57: 1968–1970. doi:10.1128/AAC.02008-12
30. Scharn CR, Tenover FC, Goering RV. Transduction of staphylococcal cassette chromosome mec elements between strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57: 5233–5238. doi:10.1128/AAC.01058-13
31. Winstel V, Liang C, Sanchez-Carballo P, Steglich M, Munar M, Bröker BM, et al. Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nat Commun*. 2013;4. doi:10.1038/ncomms3345
32. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4: 36–45. doi:10.1038/nrmicro1325
33. Cunnion KM, Zhang H-M, Frank MM. Availability of Complement Bound to *Staphylococcus aureus* To Interact with Membrane Complement Receptors Influences Efficiency of Phagocytosis. *Infect Immun*. 2003;71: 656–662. doi:10.1128/IAI.71.2.656-662.2003
34. Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, Ng J, Fink PS, Hawkins J, et al. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccines Immunother*. 2013;9: 480–487. doi:10.4161/hv.23223
35. Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B, et al. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infect Immun*. 1995;63: 1380–1386.
36. Grov A, Sveen K. Induction of leukochemotaxis by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]*. 1978;86B: 375–378.
37. Dziarski R, Dziarski A. Mitogenic activity of staphylococcal peptidoglycan. *Infect Immun*. 1979;23: 706–710.
38. Verbrugh HA, Verhoef J, Wilkinson BJ, Peterson PK. Biology and clinical significance of peptidoglycan antibody response in staphylococcal infections. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1983;41: 117–125.
39. Riber U, Espersen F, Wilkinson BJ, Kharazmi A. Neutrophil chemotactic activity of peptidoglycan. A comparison between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1990;98: 881–886.

40. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999;11: 443–451.
41. Wang Z-M, Liu C, Dziarski R. Chemokines Are the Main Proinflammatory Mediators in Human Monocytes Activated by *Staphylococcus aureus*, Peptidoglycan, and Endotoxin. *J Biol Chem*. 2000;275: 20260–20267. doi:10.1074/jbc.M909168199
42. Leemans JC, Heikens M, van Kessel KPM, Florquin S, van der Poll T. Lipoteichoic Acid and Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* Synergistically Induce Neutrophil Influx into the Lungs of Mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2003;10: 950–953. doi:10.1128/CDLI.10.5.950-953.2003
43. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18: 521–540.
44. Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun*. 2001;69: 3423–3426. doi:10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001
45. Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC, Walker S. Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. *ChemBioChem*. 2009;11: 35–45. doi:10.1002/cbic.200900557
46. Brown S, Xia G, Luhachack LG, Campbell J, Meredith TC, Chen C, et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109: 18909–18914. doi:10.1073/pnas.1209126109
47. Sewell EW, Brown ED. Taking aim at wall teichoic acid synthesis: new biology and new leads for antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013; Available: <http://www.nature.com/ja/journal/vaop/ncurrent/full/ja2013100a.html>
48. Von Aulock S, Morath S, Hareng L, Knapp S, van Kessel KP, van Strijp JA, et al. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus for neutrophil recruitment. *Immunobiology*. 2003;208: 413–422.
49. Koren L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *J Clin Microbiol*. 2004;42: 792–799. doi:10.1128/JCM.42.2.792-799.2004
50. Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio*. 2013;4: e00575–13–e00575–13. doi:10.1128/mBio.00575-13
51. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2009;191: 832–843. doi:10.1128/JB.01222-08

52. Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol*. 2006;51: 187–224. doi:10.1016/S0065-2911(06)51004-5
53. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2013;12: 49–62. doi:10.1038/nrmicro3161
54. Vaudaux PE, Francois P, Proctor RA, McDevitt D, Foster TJ, Albrecht RM, et al. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect Immun*. 1995;63: 585–590.
55. Bodén MK, Flock JI. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1989;57: 2358–2363.
56. Ko Y-P, Kuipers A, Freitag CM, Jongerius I, Medina E, van Rooijen WJ, et al. Phagocytosis Escape by a *Staphylococcus aureus* Protein That Connects Complement and Coagulation Proteins at the Bacterial Surface. Skaar EP, editor. *PLoS Pathog*. 2013;9: e1003816. doi:10.1371/journal.ppat.1003816
57. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Rydén C, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun*. 1994;62: 152–161.
58. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. Cheung A, editor. *PLoS Pathog*. 2010;6: e1001036. doi:10.1371/journal.ppat.1001036
59. Brenes JA, Goswami U, Williams DN. The association of septic thrombophlebitis with septic pulmonary embolism in adults. *Open Respir Med J*. 2012;6: 14.
60. Mölkänen T, Tyynelä J, Helin J, Kalkkinen N, Kuusela P. Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS Lett*. 2002;517: 72–78.
61. Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol*. 2004;172: 1169–1176.
62. Simons J-WF, Adams H, Cox RC, Dekker N, Götz F, Slotboom AJ, et al. The lipase from *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem*. 1996;242: 760–769.
63. Hu C, Xiong N, Zhang Y, Rayner S, Chen S. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;419: 617–620. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.057
64. Farrell A, Taylor D, Holland K. Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the hyaluronate lyase gene. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;130: 81–85. doi:10.1016/0378-1097(95)00187-A

65. Hart ME, Hart MJ, Roop AJ. Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species. *Int J Microbiol.* 2009;2009: 1–8. doi:10.1155/2009/614371
66. Madison BM, Baselski VS. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by thermonuclease testing. *J Clin Microbiol.* 1983;18: 722–724.
67. Hu Y, Meng J, Shi C, Hervin K, Fratamico PM, Shi X. Characterization and comparative analysis of a second thermonuclease from *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res.* 2013;168: 174–182. doi:10.1016/j.micres.2012.09.003
68. Arvidson S. The formation of a calcium-dependent extracellular proteolytic enzyme from *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol.* 1973;81: 552–558.
69. Drapeau GR. Role of metalloprotease in activation of the precursor of staphylococcal protease. *J Bacteriol.* 1978;136: 607–613.
70. Prokesová L, Potuzníková B, Potempa J, Zikán J, Radl J, Hachová L, et al. Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunol Lett.* 1992;31: 259–265.
71. Potempa J, Watorek W, Travis J. The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 1986;261: 14330–14334.
72. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48: 4673–4679. doi:10.1128/AAC.48.12.4673-4679.2004
73. McGavin MJ, Zahradka C, Rice K, Scott JE. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun.* 1997;65: 2621–2628.
74. Coulter SN, Schwan WR, Ng EY, Langhorne MH, Ritchie HD, Westbrook-Wadman S, et al. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol Microbiol.* 1998;30: 393–404.
75. Shaw L, Golonka E, Potempa J, Foster SJ. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Read Engl.* 2004;150: 217–228.
76. Mandell GL. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal–leukocyte interaction. *J Clin Invest.* 1975;55: 561.
77. Martínez-Pulgarín S, Domínguez-Bernal G, Orden JA, de la Fuente R. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. *Microbiol Read Engl.* 2009;155: 1505–1515. doi:10.1099/mic.0.025544-0

78. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, et al. Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2002;70: 4987–4996. doi:10.1128/IAI.70.9.4987-4996.2002
79. Tavares A, Nielsen JB, Boye K, Rohde S, Paulo AC, Westh H, et al. Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) Evolution and Expression among *Staphylococcus aureus* Clones with Hospital and Community Origin. Fitzgerald JR, editor. *PLoS ONE*. 2014;9: e98634. doi:10.1371/journal.pone.0098634
80. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 13473–13478. doi:10.1073/pnas.1001815107
81. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. 1996;274: 1859–1866.
82. Gouaux E. α -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An Archetype of β -Barrel, Channel-Forming Toxins. *J Struct Biol*. 1998;121: 110–122.
83. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*. 1991;55: 733–751.
84. Schmitt MJ, Schaffrath R, editors. *Microbial protein toxins*. Berlin ; New York: Springer; 2005.
85. Wiseman GM. The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol Rev*. 1975;39: 317–344.
86. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13: 16–34. doi:10.1128/CMR.13.1.16-34.2000
87. Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, Gao X, Broglie PM, Hall JD, et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J Infect Dis*. 2012;205: 807–817. doi:10.1093/infdis/jir846
88. Katayama Y, Baba T, Sekine M, Fukuda M, Hiramatsu K. Beta-Hemolysin Promotes Skin Colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2013;195: 1194–1203. doi:10.1128/JB.01786-12
89. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Lab*. 2008;2008: 61–69.
90. Schmitz F-J, Veldkamp K-E, Van Kessel KP, Verhoef J, Van Strijp JA. Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J Infect Dis*. 1997;176: 1531–1537.

91. Vandenesch F, Lina G, Henry T. Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00012
92. Mesrati I, Saïdani M, Ennigrou S, Zouari B, Ben Redjeb S. Clinical isolates of Pantone-Valentine leucocidin- and gamma-haemolysin-producing Staphylococcus aureus: prevalence and association with clinical infections. *J Hosp Infect.* 2010;75: 265–268.
93. Staali L, Monteil H, Colin DA. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca²⁺ channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J Membr Biol.* 1998;162: 209–216.
94. Tseng CW, Kyme P, Low J, Rocha MA, Alsabeh R, Miller LG, et al. Staphylococcus aureus Pantone-Valentine Leukocidin Contributes to Inflammation and Muscle Tissue Injury. Bereswill S, editor. *PLoS ONE.* 2009;4: e6387. doi:10.1371/journal.pone.0006387
95. Yoong P, Torres VJ. The effects of Staphylococcus aureus leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16: 63–69. doi:10.1016/j.mib.2013.01.012
96. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, et al. Cross-talk between Staphylococcus aureus leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol.* 2012;14: 1019–1036. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x
97. Von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49: 157–162. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2004.03.009
98. Reyes-Robles T, Alonzo F, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ. Staphylococcus aureus leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe.* 2013;14: 453–459. doi:10.1016/j.chom.2013.09.005
99. Alonzo III F, Benson MA, Chen J, Novick RP, Shopsin B, Torres VJ. Staphylococcus aureus leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo: LukED contributes to S. aureus bacteraemia. *Mol Microbiol.* 2012;83: 423–435. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07942.x
100. DuMont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to Staphylococcus aureus pathogenesis: The cytotoxin LukAB kills human phagocytes. *Mol Microbiol.* 2011;79: 814–825. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07490.x
101. Malachowa N, Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Parnell MJ, Gardner DJ, et al. Staphylococcus aureus Leukotoxin GH Promotes Inflammation. *J Infect Dis.* 2012;206: 1185–1193. doi:10.1093/infdis/jis495
102. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000;61: 1–10.

103. Jupin C, Anderson S, Damais C, Alouf JE, Parant M. Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human tumor necrosis factors and gamma interferon. *J Exp Med.* 1988;167: 752–761.
104. Elias PM, Fritsch P, Epstein EH. Staphylococcal scalded skin syndrome. Clinical features, pathogenesis, and recent microbiological and biochemical developments. *Arch Dermatol.* 1977;113: 207–219.
105. Savage VJ, Chopra I, O’Neill AJ. Population Diversification in *Staphylococcus aureus* Biofilms May Promote Dissemination and Persistence. Forestier C, editor. *PLoS ONE.* 2013;8: e62513. doi:10.1371/journal.pone.0062513
106. Mirani ZA, Aziz M, Khan SI. Small colony variants have a major role in stability and persistence of *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Antibiot (Tokyo).* 2014; doi:10.1038/ja.2014.115
107. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4. doi:10.3389/fcimb.2014.00099
108. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2006;43: 961–967. doi:10.1086/507633
109. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1998;177: 1023–1029.
110. Schröder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2006;195: 185–194. doi:10.1007/s00430-006-0015-0
111. Gläser R, Becker K, von Eiff C, Meyer-Hoffert U, Harder J. Decreased Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants toward Human Antimicrobial Peptides. *J Invest Dermatol.* 2014;134: 2347–2350. doi:10.1038/jid.2014.176
112. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr Infect Dis Rep.* 2005;7: 420–428.
113. Gordon CP, Williams P, Chan WC. Attenuating *Staphylococcus aureus* Virulence Gene Regulation: A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2013;56: 1389–1404. doi:10.1021/jm3014635
114. Qazi SNA, Counil E, Morrissey J, Rees CED, Cockayne A, Winzer K, et al. agr Expression Precedes Escape of Internalized *Staphylococcus aureus* from the Host Endosome. *Infect Immun.* 2001;69: 7074–7082. doi:10.1128/IAI.69.11.7074-7082.2001

115. Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schafer T, Hecker M, Albrecht D, et al. Repair of Global Regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and Comparative Analysis with Other Clinical Isolates. *Infect Immun*. 2010;78: 2877–2889. doi:10.1128/IAI.00088-10
116. Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S. Regulation of agr-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative staphylococci. *J Bacteriol*. 1998;180: 3181–3186.
117. Jonsson I-M, Arvidson S, Foster S, Tarkowski A. Sigma Factor B and RsbU Are Required for Virulence in *Staphylococcus aureus*-Induced Arthritis and Sepsis. *Infect Immun*. 2004;72: 6106–6111. doi:10.1128/IAI.72.10.6106-6111.2004
118. Giachino P, Engelmann S, Bischoff M. B Activity Depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2001;183: 1843–1852. doi:10.1128/JB.183.6.1843-1852.2001
119. Sung JM-L, Lloyd DH, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology*. 2008;154: 1949–1959. doi:10.1099/mic.0.2007/015289-0
120. Aly R, Shinefield HI, Strauss WG, Maibach HI. Bacterial adherence to nasal mucosal cells. *Infect Immun*. 1977;17: 546–549.
121. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O’Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, et al. Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. Peschel A, editor. *PLoS Pathog*. 2012;8: e1003092. doi:10.1371/journal.ppat.1003092
122. Miller M, Cook HA, Furuya EY, Bhat M, Lee M-H, Vavagiakis P, et al. *Staphylococcus aureus* in the Community: Colonization Versus Infection. Galvani AP, editor. *PLoS ONE*. 2009;4: e6708. doi:10.1371/journal.pone.0006708
123. Noble WC, Valkenburg HA, Wolters CH. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J Hyg (Lond)*. 1967;65: 567–573.
124. Sivaraman K, Venkataraman N, Cole AM. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. *Future Microbiol*. 2009;4: 999–1008. doi:10.2217/fmb.09.79
125. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10: 505–520.
126. Den Heijer CD, van Bijnen EM, Paget WJ, Pringle M, Goossens H, Bruggeman CA, et al. Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2013;13: 409–415. doi:10.1016/S1473-3099(13)70036-7
127. Le Maréchal C, Seyffert N, Jardin J, Hernandez D, Jan G, Rault L, et al. Molecular Basis of Virulence in *Staphylococcus aureus* Mastitis. Horsburgh MJ, editor. *PLoS ONE*. 2011;6: e27354. doi:10.1371/journal.pone.0027354

128. Rupp R, Bergonier D, Dion S, Hygonenq MC, Aurel MR, Robert-Granié C, et al. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *J Dairy Sci.* 2009;92: 1203–1219. doi:10.3168/jds.2008-1435
129. Pascoe B, Dams L, Wilkinson TS, Harris LG, Bodger O, Mack D, et al. Dormant Cells of *Staphylococcus aureus* Are Resuscitated by Spent Culture Supernatant. Schlievert PM, editor. *PLoS ONE.* 2014;9: e85998. doi:10.1371/journal.pone.0085998
130. Mulyukin AL, Suzina NE, Mel'nikov VG, Gal'chenko VF, El'-Registan GI. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Microbiology.* 2014;83: 149–159. doi:10.1134/S0026261713060088
131. Kampf G, Adena S, Rüden H, Weist K. Inducibility and potential role of *MecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *J Hosp Infect.* 2003;54: 124–129.
132. Soares MJ, Tokumaru-Miyazaki NH, Noletto AL, Figueiredo AM. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. *J Med Microbiol.* 1997;46: 214–221.
133. Del Solar A, Gómez Rogers C, Garrido J, Reyes J. [Toxic shock. *Staphylococcus aureus* toxemia]. *Rev Médica Chile.* 1987;115: 236–238.
134. Jarraud S. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun.* 2002;70: 631–641. doi:10.1128/IAI.70.2.631-641.2002
135. Kravitz GR, Dries DJ, Peterson ML, Schlievert PM. *Purpura fulminans* due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2005;40: 941–947. doi:10.1086/428573
136. Maltezou HC, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27: 87–96. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.11.004
137. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA J Am Med Assoc.* 1998;279: 593–598.
138. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2008;46: S344–S349. doi:10.1086/533590
139. Solberg CO. Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. *Scand J Infect Dis.* 2000;32: 587–595.
140. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 629–641. doi:10.1038/nrmicro2200

141. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 2003;111: 1265–1273. doi:10.1172/JCI200318535
142. Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO. Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Dis*. 1996;23: 255–259.
143. Keene A, Vavagiakis P, Lee M-H, Finnerty K, Nicolls D, Cespedes C, et al. *Staphylococcus aureus* colonization and the risk of infection in critically ill patients. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am*. 2005;26: 622–628. doi:10.1086/502591
144. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003;36: 53–59.
145. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2012. Stockholm: ECDC; 2013.
146. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2009. Stockholm: ECDC; 2010.
147. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39: 273–282. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030
148. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007;298: 1763–1771. doi:10.1001/jama.298.15.1763
149. David MZ, Daum RS. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23: 616–687. doi:10.1128/CMR.00081-09
150. Weese JS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR J*. 2010;51: 233–244.
151. Peton V, Le Loir Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2014;21: 602–615. doi:10.1016/j.meegid.2013.08.011
152. Bergonier D, de Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res*. 2003;34: 689–716. doi:10.1051/vetres:2003030
153. Bonnefont CMD, Rainard P, Cunha P, Gilbert FB, Toufeer M, Aurel M-R, et al. Genetic susceptibility to *S. aureus* mastitis in sheep: differential expression of mammary

- epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. *Physiol Genomics*. 2012;44: 403–416. doi:10.1152/physiolgenomics.00155.2011
154. Bonnefont CM, Toufeer M, Caubet C, Foulon E, Tasca C, Aurel M-R, et al. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*. 2011;12: 208. doi:10.1186/1471-2164-12-208
155. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res GMR*. 2003;2: 63–76.
156. Juhász-Kaszanyitzky E, Jánosi S, Somogyi P, Dán A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis*. 2007;13: 630–632. doi:10.3201/eid1304.060833
157. Morgan M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J Antimicrob Chemother*. 2008;62: 1181–1187. doi:10.1093/jac/dkn405
158. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker GC. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*. 2011;2: 580–592. doi:10.4161/viru.2.6.18122
159. Melish ME, Murata S, Fukunaga C, Frogner K, McKissick C. Vaginal tampon model for toxic shock syndrome. *Rev Infect Dis*. 1989;11 Suppl 1: S238–246; discussion S246–247.
160. Amir LH, Garland SM, Lumley J. A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *BMC Fam Pract*. 2006;7: 57.
161. Benhamou D, Carrié AS, Lecomte F. [*Staphylococcus aureus*: role and impact in the treatment of nosocomial pneumonia]. *Rev Mal Respir*. 2005;22: 595–603.
162. Tremblay C. Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. *Pharmactuel*. 2008;41. Available: <http://www.pharmactuel.com/sommaires%5C200805pt.pdf>
163. Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2005;62: 2617–2633. doi:10.1007/s00018-005-5148-6
164. Morikawa K, Takemura AJ, Inose Y, Tsai M, Nguyen Thi LT, Ohta T, et al. Expression of a Cryptic Secondary Sigma Factor Gene Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *Staphylococcus aureus*. Peschel A, editor. *PLoS Pathog*. 2012;8: e1003003. doi:10.1371/journal.ppat.1003003
165. Garau J, Bouza E, Chastre J, Gudiol F, Harbarth S. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15: 125–136. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02701.x

166. Nannini E, Murray BE, Arias CA. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10: 516–521. doi:10.1016/j.coph.2010.06.006
167. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122: 787–795. doi:10.1172/JCI59643
168. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008;181: 3733–3739.
169. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449: 819–826. doi:10.1038/nature06246
170. Shaykhiev R, Bals R. Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis. *J Leukoc Biol*. 2007;82: 1–15. doi:10.1189/jlb.0207096
171. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. 2012;30: 257–262. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
172. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol*. 2008;1: 183–197. doi:10.1038/mi.2008.5
173. Markiewski MM, Lambris JD. The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *Am J Pathol*. 2007;171: 715–727. doi:10.2353/ajpath.2007.070166
174. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011;343: 227–235. doi:10.1007/s00441-010-1034-0
175. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8: 958–969. doi:10.1038/nri2448
176. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013;14: 986–995. doi:10.1038/ni.2705
177. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496: 445–455. doi:10.1038/nature12034
178. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9: 259–270. doi:10.1038/nri2528
179. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19: 71–82.
180. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5: 953–964. doi:10.1038/nri1733

181. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26: 421–452. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
182. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 762–774. doi:10.1038/nri3070
183. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity.* 2013;38: 79–91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001
184. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177: 7303–7311.
185. Klimchenko O, Di Stefano A, Georger B, Hamidi S, Opolon P, Robert T, et al. Monocytic cells derived from human embryonic stem cells and fetal liver share common differentiation pathways and homeostatic functions. *Blood.* 2011;117: 3065–3075. doi:10.1182/blood-2010-07-295246
186. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013;229: 176–185. doi:10.1002/path.4133
187. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22: 240–273. doi:10.1128/CMR.00046-08
188. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2006;81: 1–5. doi:10.1189/jlb.0306164
189. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012;122: 2711–2719. doi:10.1172/JCI62423
190. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52: 381–390; quiz 391–392. doi:10.1016/j.jaad.2004.08.026
191. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007;220: 35–46. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00574.x
192. Donato R, Cannon BR, Sorci G, RiuZZi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013;13: 24–57.
193. Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J.* 2011;4: 49–60. doi:10.2174/1875041901104010049
194. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140: 805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022

195. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14: 123–128.
196. Cambi A, Koopman M, Figdor CG. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* 2005;7: 481–488. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00506.x
197. Bryant CE, Monie TP. Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity. *Open Biol.* 2012;2: 120015–120015. doi:10.1098/rsob.120015
198. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol.* 2004;172: 2731–2738. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731
199. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock Augusta Ga.* 2006;26: 174–179. doi:10.1097/01.shk.0000225404.51320.82
200. Ivanov S, Dragoi A-M, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood.* 2007;110: 1970–1981. doi:10.1182/blood-2006-09-044776
201. Wilmanski JM, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol.* 2007;83: 13–30. doi:10.1189/jlb.0607402
202. Antosz H, Osiak M. NOD1 and NOD2 receptors: integral members of the innate and adaptive immunity system. *Acta Biochim Pol.* 2013;60: 351–360.
203. Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007;19: 615–622. doi:10.1016/j.coi.2007.09.002
204. Van de Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff THM. Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. *Lancet Infect Dis.* 2009;9: 688–698. doi:10.1016/S1473-3099(09)70255-5
205. Niedergang F, Chavrier P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16: 422–428. doi:10.1016/j.ceb.2004.06.006
206. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14: 136–145.
207. Sun-Wada G-H, Tabata H, Kawamura N, Aoyama M, Wada Y. Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci.* 2009;122: 2504–2513. doi:10.1242/jcs.050443
208. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem.* 1998;273: 9842–9851.

209. Yates RM, Hermetter A, Russell DG. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic Cph Den.* 2005;6: 413–420. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00284.x
210. Mayer-Scholl A. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol.* 2004;7: 62–66. doi:10.1016/j.mib.2003.12.004
211. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87: 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
212. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994;298 (Pt 2): 249–258.
213. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 355–366. doi:10.1038/nrmicro2128
214. Yoshikai Y. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2001;14: 257–263.
215. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25: 677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
216. Mosser DM, Zhang X. Activation of Murine Macrophages. In: Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, editors. *Current Protocols in Immunology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008. Available: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1402s83>
217. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;11: 889–896. doi:10.1038/ni.1937
218. De Filippo K, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol.* 2008;180: 4308–4315.
219. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3: 133–146. doi:10.1038/nri1001
220. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214: 149–160. doi:10.1002/path.2287
221. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27: 519–550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
222. Tanaka T, Kishimoto T. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014;2: 288–294. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0022

223. Kapetanovic R, Cavaillon J-M. Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7: 907–918. doi:10.1517/14712598.7.6.907
224. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7: 678–689. doi:10.1038/nri2156
225. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* 2010;10: 1325–1334. doi:10.1016/j.intimp.2010.08.012
226. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity.* 2002;17: 413–423.
227. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood.* 2007;111: 42–49. doi:10.1182/blood-2007-07-099648
228. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity.* 2010;33: 657–670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
229. Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5: 1307–1315. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.009
230. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006;7: 311–317. doi:10.1038/ni1309
231. Mehta A, Brewington R, Chatterji M, Zoubine M, Kinasewitz GT, Peer GT, et al. INFECTION-INDUCED MODULATION OF M1 AND M2 PHENOTYPES IN CIRCULATING MONOCYTES: ROLE IN IMMUNE MONITORING AND EARLY PROGNOSIS OF SEPSIS. *Shock.* 2004;22: 423–430. doi:10.1097/01.shk.0000142184.49976.0c
232. Pelegrin P, Surprenant A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *EMBO J.* 2009;28: 2114–2127.
233. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011;121: 985–997. doi:10.1172/JCI44490
234. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 723–737. doi:10.1038/nri3073
235. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell.* 2010;140: 871–882. doi:10.1016/j.cell.2010.02.029
236. Serhan CN. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2011;25: 1441–1448. doi:10.1096/fj.11-0502ufm

237. Liu Y, Cousin JM, Hughes J, Van Damme J, Seckl JR, Haslett C, et al. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;162: 3639–3646.
238. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;164: 1663–1667.
239. Wang L, Yuan R, Yao C, Wu Q, Christelle M, Xie W, et al. Effects of resolvin D1 on inflammatory responses and oxidative stress of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127: 803–809.
240. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *J Innate Immun*. 2010;2: 216–227. doi:10.1159/000284367
241. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, et al. Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12^{low}IL-10^{high} Regulatory Phenotype in Macrophages. *J Immunol*. 2010;185: 2044–2050. doi:10.4049/jimmunol.1000017
242. Schif-Zuck S, Gross N, Assi S, Rostoker R, Serhan CN, Ariel A. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b^{low} macrophages: Modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol*. 2011;41: 366–379. doi:10.1002/eji.201040801
243. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*. 2001;108: 957–962. doi:10.1172/JCI200114122
244. Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect Inst Pasteur*. 2001;3: 149–159.
245. Korn D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of Macrophage Efferocytosis in Inflammation. *Front Immunol*. 2011;2. doi:10.3389/fimmu.2011.00057
246. Brecht K, Weigert A, Hu J, Popp R, Fisslthaler B, Korff T, et al. Macrophages programmed by apoptotic cells promote angiogenesis via prostaglandin E2. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2011;25: 2408–2417. doi:10.1096/fj.10-179473
247. Wu W-K, Llewellyn OPC, Bates DO, Nicholson LB, Dick AD. IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia. *Immunobiology*. 2010;215: 796–803. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.025
248. Von Köckritz-Blickwede M, Rohde M, Oehmcke S, Miller LS, Cheung AL, Herwald H, et al. Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe *Staphylococcus aureus* infection in the mouse model. *Am J Pathol*. 2008;173: 1657–1668. doi:10.2353/ajpath.2008.080337

249. Katakura T, Yoshida T, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Immunological control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in an immunodeficient murine model of thermal injuries. *Clin Exp Immunol*. 2005;0: 050929083117003. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02944.x
250. Mölne L, Verdrengh M, Tarkowski A. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2000;68: 6162–6167.
251. Verdrengh M, Tarkowski A. Role of macrophages in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis and sepsis. *Arthritis Rheum*. 2000;43: 2276–2282. doi:10.1002/1529-0131(200010)43:10<2276::AID-ANR15>3.0.CO;2-C
252. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol*. 2001;54: 7–19.
253. Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs*. 2011;34: 799–810. doi:10.5301/ijao.5000030
254. Triantafilou M, Gamper FGJ, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, et al. Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting. *J Biol Chem*. 2006;281: 31002–31011. doi:10.1074/jbc.M602794200
255. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 1999;274: 17406–17409.
256. Nilsen NJ, Deininger S, Nonstad U, Skjeldal F, Husebye H, Rodionov D, et al. Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol*. 2008;84: 280–291. doi:10.1189/jlb.0907656
257. Bunk S, Sigel S, Metzdorf D, Sharif O, Triantafilou K, Triantafilou M, et al. Internalization and Coreceptor Expression Are Critical for TLR2-Mediated Recognition of Lipoteichoic Acid in Human Peripheral Blood. *J Immunol*. 2010;185: 3708–3717. doi:10.4049/jimmunol.0901660
258. Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, Kiyohara A, Suda Y, Krikae F, et al. Not Lipoteichoic Acid but Lipoproteins Appear to Be the Dominant Immunobiologically Active Compounds in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2006;177: 3162–3169. doi:10.4049/jimmunol.177.5.3162
259. Hashimoto M. Lipoprotein is a predominant Toll-like receptor 2 ligand in *Staphylococcus aureus* cell wall components. *Int Immunol*. 2005;18: 355–362. doi:10.1093/intimm/dxh374
260. Girardin SE. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J Biol Chem*. 2003;278: 8869–8872. doi:10.1074/jbc.C200651200

261. Pan Q, Mathison J, Fearn C, Kravchenko VV, Da Silva Correia J, Hoffman HM, et al. MDP-induced interleukin-1 processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol.* 2007;82: 177–183. doi:10.1189/jlb.1006627
262. Sethi S, Chakraborty T. Role of TLR- / NLR-signaling and the associated cytokines involved in recruitment of neutrophils in murine models of *Staphylococcus aureus* infection. *Virulence.* 2011;2: 316–328. doi:10.4161/viru.2.4.16142
263. Eddie Ip WK, Takahashi K, Alan Ezekowitz R, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev.* 2009;230: 9–21.
264. Rooijackers SHM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol.* 2005;13: 596–601. doi:10.1016/j.tim.2005.10.002
265. Kapetanovic R, Nahori M-A, Balloy V, Fitting C, Philpott DJ, Cavillon J-M, et al. Contribution of Phagocytosis and Intracellular Sensing for Cytokine Production by *Staphylococcus aureus*-Activated Macrophages. *Infect Immun.* 2006;75: 830–837. doi:10.1128/IAI.01199-06
266. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* 2006;6: 33–43. doi:10.1038/nri1745
267. Miller M, Dreisbach A, Otto A, Becher D, Bernhardt J, Hecker M, et al. Mapping of Interactions between Human Macrophages and *Staphylococcus aureus* Reveals an Involvement of MAP Kinase Signaling in the Host Defense. *J Proteome Res.* 2011;10: 4018–4032. doi:10.1021/pr200224x
268. Lee I-T, Lee C-W, Tung W-H, Wang S-W, Lin C-C, Shu J-C, et al. Cooperation of TLR2 with MyD88, PI3K, and Rac1 in Lipoteichoic Acid-Induced cPLA2/COX-2-Dependent Airway Inflammatory Responses. *Am J Pathol.* 2010;176: 1671–1684. doi:10.2353/ajpath.2010.090714
269. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, et al. Distinct and Essential Roles of Transcription Factors IRF-3 and IRF-7 in Response to Viruses for $\text{IFN-}\alpha/\beta$ Gene Induction. *Immunity.* 2000;13: 539–548.
270. Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology.* 2009;214: 562–575. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.003
271. Leslie RGQ, Hansen S. Complement receptors. eLS. 1999; Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000512.pub2/full>
272. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000;165: 5392–5396.
273. Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, McCafferty DG, Yang SR, Fowler VG. Critical Role of NOD2 in Regulating the Immune Response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2009;77: 1376–1382. doi:10.1128/IAI.00940-08

274. Verdrengh M, Thomas JA, Hultgren OH. IL-1 receptor-associated kinase 1 mediates protection against *Staphylococcus aureus* infection. *Microbes Infect.* 2004;6: 1268–1272. doi:10.1016/j.micinf.2004.08.009
275. Wardenburg JB, Williams WA, Missiakas D. Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103: 13831–13836.
276. Hruz P, Zinkernagel AS, Jenikova G, Botwin GJ, Hugot J-P, Karin M, et al. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 12873–12878. doi:10.1073/pnas.0904958106
277. Mullaly SC, Kubes P. The role of TLR2 in vivo following challenge with *Staphylococcus aureus* and prototypic ligands. *J Immunol.* 2006;177: 8154–8163.
278. Stuart LM. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 2005;170: 477–485. doi:10.1083/jcb.200501113
279. DeLoid GM, Sulahian TH, Imrich A, Kobzik L. Heterogeneity in Macrophage Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* Strains: High-Throughput Scanning Cytometry-Based Analysis. Bereswill S, editor. *PLoS ONE.* 2009;4: e6209. doi:10.1371/journal.pone.0006209
280. Shimada T, Park BG, Wolf AJ, Brikos C, Goodridge HS, Becker CA, et al. *Staphylococcus aureus* Evades Lysozyme-Based Peptidoglycan Digestion that Links Phagocytosis, Inflammasome Activation, and IL-1 β Secretion. *Cell Host Microbe.* 2010;7: 38–49. doi:10.1016/j.chom.2009.12.008
281. Sokolovska A, Becker CE, Ip WKE, Rathinam VAK, Brudner M, Paquette N, et al. Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. *Nat Immunol.* 2013;14: 543–553. doi:10.1038/ni.2595
282. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. *Staphylococcus aureus* Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. *J Immunol.* 2011;186: 6585–6596. doi:10.4049/jimmunol.1002794
283. Nippe N, Varga G, Holzinger D, Löffler B, Medina E, Becker K, et al. Subcutaneous Infection with *S. aureus* in Mice Reveals Association of Resistance with Influx of Neutrophils and Th2 Response. *J Invest Dermatol.* 2010;131: 125–132. doi:10.1038/jid.2010.282
284. Abtin A, Jain R, Mitchell AJ, Roediger B, Brzoska AJ, Tikoo S, et al. Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat Immunol.* 2014;15: 45–53. doi:10.1038/ni.2769

285. McLoughlin RM, Solinga RM, Rich J, Zaleski KJ, Cocchiaro JL, Risley A, et al. CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103: 10408–10413.
286. Cho JS, Guo Y, Ramos RI, Hebroni F, Plaisier SB, Xuan C, et al. Neutrophil-derived IL-1 β Is Sufficient for Abscess Formation in Immunity against *Staphylococcus aureus* in Mice. DeLeo FR, editor. *PLoS Pathog*. 2012;8: e1003047. doi:10.1371/journal.ppat.1003047
287. Miller LS, O'Connell RM, Gutierrez MA, Pietras EM, Shahangian A, Gross CE, et al. MyD88 Mediates Neutrophil Recruitment Initiated by IL-1R but Not TLR2 Activation in Immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 2006;24: 79–91. doi:10.1016/j.immuni.2005.11.011
288. Verdrengh M, Tarkowski A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1997;65: 2517–2521.
289. Onogawa T. Staphylococcal alpha-toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;33: 15–21.
290. Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, Ehrentraut S, Velten M, Grohé C, et al. Systemically Administered Ligands of Toll-Like Receptor 2, -4, and -9 Induce Distinct Inflammatory Responses in the Murine Lung. *Mediators Inflamm*. 2011;2011: 1–12. doi:10.1155/2011/746532
291. Ferrante A, Martin AJ, Bates EJ, Goh DH, Harvey DP, Parsons D, et al. Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor-alpha-activated neutrophils. The role of serum opsonins, integrin receptors, respiratory burst, and degranulation. *J Immunol*. 1993;151: 4821–4828.
292. Kowanko IC, Ferrante A, Clemente G, Kumaratilake LM. Tumor necrosis factor primes neutrophils to kill *Staphylococcus aureus* by an oxygen-dependent mechanism and *Plasmodium falciparum* by an oxygen-independent mechanism. *Infect Immun*. 1996;64: 3435–3437.
293. Nakane A, Okamoto M, Asano M, Kohanawa M, Minagawa T. Endogenous gamma interferon, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect Immun*. 1995;63: 1165–1172.
294. Hume EBH, Cole N, Garthwaite LL, Khan S, Willcox MDP. A Protective Role for IL-6 in Staphylococcal Microbial Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47: 4926–4930. doi:10.1167/iovs.06-0340
295. Van den Berg S, Laman JD, Boon L, ten Kate MT, de Knecht GJ, Verdijk RM, et al. Distinctive Cytokines as Biomarkers Predicting Fatal Outcome of Severe *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Mice. Cormier SA, editor. *PLoS ONE*. 2013;8: e59107. doi:10.1371/journal.pone.0059107

296. Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25: 355–367. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.011
297. Brubaker AL, Kovacs EJ. G-CSF Enhances Resolution of Staphylococcus aureus Wound Infection in an Age-Dependent Manner: *Shock.* 2013;40: 327–333. doi:10.1097/SHK.0b013e3182a43651
298. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Wardenburg JB, McElvania-TeKippe E, et al. Staphylococcus aureus α -Hemolysin Activates the NLRP3-Inflammasome in Human and Mouse Monocytic Cells. *Ratner AJ, editor. PLoS ONE.* 2009;4: e7446. doi:10.1371/journal.pone.0007446
299. Ahn S-H, Deshmukh H, Johnson N, Cowell LG, Rude TH, Scott WK, et al. Two Genes on A/J Chromosome 18 Are Associated with Susceptibility to Staphylococcus aureus Infection by Combined Microarray and QTL Analyses. *Wessels MR, editor. PLoS Pathog.* 2010;6: e1001088. doi:10.1371/journal.ppat.1001088
300. Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH, Hirano K, Rao S, Lin H, et al. Inflammasome-mediated production of IL-1 β is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo. *J Immunol.* 2007;179: 6933–6942.
301. Hultgren OH, Svensson L, Tarkowski A. Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during Staphylococcus aureus infection. *J Immunol.* 2002;168: 5207–5212.
302. Varoga D, Pufe T, Harder J, Meyer-Hoffert U, Mentlein R, Schröder J-M, et al. Production of endogenous antibiotics in articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;50: 3526–3534. doi:10.1002/art.20605
303. Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, et al. Staphylococcus aureus Susceptibility to Innate Antimicrobial Peptides, -Defensins and CAP18, Expressed by Human Keratinocytes. *Infect Immun.* 2003;71: 3730–3739. doi:10.1128/IAI.71.7.3730-3739.2003
304. Wang G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals.* 2014;7: 545–594. doi:10.3390/ph7050545
305. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120: 2423–2431. doi:10.1172/JCI41649
306. Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections. *Semin Immunopathol.* 2012;34: 237–259. doi:10.1007/s00281-011-0295-3
307. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med.* 2000;343: 1703–1714. doi:10.1056/NEJM200012073432307

308. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, et al. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet.* 1995;9: 202–209. doi:10.1038/ng0295-202
309. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three Different Neutrophil Subsets Exhibited in Mice with Different Susceptibilities to Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* 2004;21: 215–226.
310. Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.* 2000;164: 3713–3722.
311. Ardura MI, Banchereau R, Mejias A, Di Pucchio T, Glaser C, Allantaz F, et al. Enhanced Monocyte Response and Decreased Central Memory T Cells in Children with Invasive *Staphylococcus aureus* Infections. Ratner AJ, editor. *PLoS ONE.* 2009;4: e5446. doi:10.1371/journal.pone.0005446
312. Jann NJ, Schmalzer M, Ferracin F, Landmann R. TLR2 enhances NADPH oxidase activity and killing of *Staphylococcus aureus* by PMN. *Immunol Lett.* 2011;135: 17–23. doi:10.1016/j.imlet.2010.09.007
313. Hattar K, Grandel U, Moeller A, Fink L, Iglhaut J, Hartung T, et al. Lipoteichoic acid (LTA) from *Staphylococcus aureus* stimulates human neutrophil cytokine release by a CD14-dependent, Toll-like-receptor-independent mechanism: Autocrine role of tumor necrosis factor- α in mediating LTA-induced interleukin-8 generation. *Crit Care Med.* 2006;34: 835–841.
314. Van Ziffle JA, Lowell CA. Neutrophil-specific deletion of Syk kinase results in reduced host defense to bacterial infection. *Blood.* 2009;114: 4871–4882. doi:10.1182/blood-2009-05-220806
315. De Gevel V, Benten V, others. Infection of human endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces the production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and monocyte chemotaxis. *Clin Exp Immunol.* 1999;117: 489–495.
316. Frodermann V, Chau TA, Sayedyahosseini S, Toth JM, Heinrichs DE, Madrenas J. A Modulatory Interleukin-10 Response to Staphylococcal Peptidoglycan Prevents Th1/Th17 Adaptive Immunity to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2011;204: 253–262. doi:10.1093/infdis/jir276
317. Söderquist B, Sundqvist KG, Vikerfors T. Adhesion molecules (E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)) in sera from patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia with or without endocarditis. *Clin Exp Immunol.* 1999;118: 408.
318. Golias CH, Tsoutsis E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo.* 2007;21: 757–769.

319. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol.* 2009;87: 93–106. doi:10.1189/jlb.0809549
320. Soehnlein O, Kenne E, Rotzius P, Eriksson EE, Lindbom L. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2007;151: 139–145. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03532.x
321. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood.* 2008;112: 1461–1471. doi:10.1182/blood-2008-02-139634
322. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL, Mastrofrancesco B, et al. Modulation of macrophage phenotype by soluble product (s) released from neutrophils. *J Immunol.* 2005;174: 2265–2272.
323. Ocuin LM, Bamboat ZM, Balachandran VP, Cavnar MJ, Obaid H, Plitas G, et al. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol.* 2010;89: 423–432. doi:10.1189/jlb.0810479
324. Greenlee-Wacker MC, Rigby KM, Kobayashi SD, Porter AR, DeLeo FR, Nauseef WM. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2014;192: 4709–4717. doi:10.4049/jimmunol.1302692
325. Asai A, Tsuda Y, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Pathogenic role of macrophages in intradermal infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in thermally injured mice. *Infect Immun.* 2010;78: 4311–4319. doi:10.1128/IAI.00642-10
326. Silva MT. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J Leukoc Biol.* 2010;88: 885–896. doi:10.1189/jlb.0410205
327. Lee LY, Höök M, Haviland D, Wetsel RA, Yonter EO, Syribeys P, et al. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis.* 2004;190: 571–579.
328. Rooijackers SHM, Ruyken M, van Roon J, van Kessel KPM, van Strijp JAG, van Wamel WJB. Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol.* 2006;8: 1282–1293. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00709.x
329. Rooijackers SHM, van Wamel WJB, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect.* 2005;7: 476–484. doi:10.1016/j.micinf.2004.12.014
330. Berube B, Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins.* 2013;5: 1140–1166. doi:10.3390/toxins5061140

331. Soong G, Chun J, Parker D, Prince A. Staphylococcus aureus Activation of Caspase 1/Calpain Signaling Mediates Invasion Through Human Keratinocytes. *J Infect Dis.* 2012;205: 1571–1579. doi:10.1093/infdis/jis244
332. Munoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Nunez G. A Critical Role for Hemolysins and Bacterial Lipoproteins in Staphylococcus aureus-Induced Activation of the Nlrp3 Inflammasome. *J Immunol.* 2009;183: 3942–3948. doi:10.4049/jimmunol.0900729
333. Essmann F, Bantel H, Totzke G, Engels IH, Sinha B, Schulze-Osthoff K, et al. Staphylococcus aureus α -toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ.* 2003;10: 1260–1272.
334. Motani K, Kushiyaama H, Imamura R, Kinoshita T, Nishiuchi T, Suda T. Caspase-1 Protein Induces Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain (ASC)-mediated Necrosis Independently of Its Catalytic Activity. *J Biol Chem.* 2011;286: 33963–33972. doi:10.1074/jbc.M111.286823
335. Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, Wang Y, et al. A Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med.* 2011;17: 1310–1314. doi:10.1038/nm.2451
336. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol.* 2012;13: 325–332. doi:10.1038/ni.2231
337. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* 2006;8: 1812–1825. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x
338. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006;440: 228–232. doi:10.1038/nature04515
339. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 99–109. doi:10.1038/nrmicro2070
340. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Said-Salim B, Porcella SF, et al. Insights into Mechanisms Used by Staphylococcus aureus to Avoid Destruction by Human Neutrophils. *J Immunol.* 2005;175: 3907–3919. doi:10.4049/jimmunol.175.6.3907
341. Anwar S, Prince LR, Foster SJ, Whyte MKB, Sabroe I. The rise and rise of Staphylococcus aureus : laughing in the face of granulocytes. *Clin Exp Immunol.* 2009;157: 216–224. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03950.x
342. Holzinger D, Geldon L, Mysore V, Nippe N, Taxman DJ, Duncan JA, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. *J Leukoc Biol.* 2012;92: 1069–1081. doi:10.1189/jlb.0112014

343. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med.* 2007;13: 1510–1514. doi:10.1038/nm1656
344. Genestier A-L, Michallet M-C, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* 2005;115: 3117–3127. doi:10.1172/JCI22684
345. Verkaik NJ, Dauwalder O, Antri K, Boubekri I, de Vogel CP, Badiou C, et al. Immunogenicity of Toxins during *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis.* 2010;50: 61–68. doi:10.1086/648673
346. Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1975;72: 1059–1062.
347. Le Y, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 2002;23: 541–548.
348. Southgate EL, He RL, Gao J-L, Murphy PM, Nanamori M, Ye RD. Identification of Formyl Peptides from *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* as Potent Chemoattractants for Mouse Neutrophils. *J Immunol.* 2008;181: 1429–1437. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1429
349. Veldkamp KE, Heezius H, Verhoef J, Van Strijp JAG, Van Kessel KPM. Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect Immun.* 2000;68: 5908–5913.
350. De Haas CJC. Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*, a Bacterial Antiinflammatory Agent. *J Exp Med.* 2004;199: 687–695. doi:10.1084/jem.20031636
351. Peschel A, Collins LV. Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides.* 2001;22: 1651–1659.
352. Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Götz F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2005;55: 778–787. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x
353. Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 2002;10: 179–186.
354. Kristian SA, Lauth X, Victor N, Goetz F, Neumeister B, Peschel A, et al. Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *J Infect Dis.* 2003;188: 414–423.
355. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.* 2005;202: 209–215. doi:10.1084/jem.20050846

356. Fraunholz M, Sinha B. Intracellular staphylococcus aureus: Live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00043
357. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, et al. A Potential New Pathway for Staphylococcus aureus Dissemination: The Silent Survival of S. aureus Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages. May R, editor. *PLoS ONE.* 2008;3: e1409. doi:10.1371/journal.pone.0001409
358. Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, et al. Phagocytosis of Staphylococcus aureus by Macrophages Exerts Cytoprotective Effects Manifested by the Upregulation of Antiapoptotic Factors. Ratner AJ, editor. *PLoS ONE.* 2009;4: e5210. doi:10.1371/journal.pone.0005210
359. Koziel J, Kmiecik K, Chmiest D, Maresz K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, et al. The Role of Mcl-1 in S. aureus-Induced Cytoprotection of Infected Macrophages. *Mediators Inflamm.* 2013;2013: 427021. doi:10.1155/2013/427021
360. Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host Microbe.* 2010;8: 44–54. doi:10.1016/j.chom.2010.06.007
361. Yan Q, Sharma-Kuinkel BK, Deshmukh H, Tsalik EL, Cyr DD, Lucas J, et al. Dusp3 and Psme3 Are Associated with Murine Susceptibility to Staphylococcus aureus Infection and Human Sepsis. Skaar EP, editor. *PLoS Pathog.* 2014;10: e1004149. doi:10.1371/journal.ppat.1004149
362. Cerquetti MC, Sordelli DO, Ortegon RA, Bellanti JA. Impaired lung defenses against Staphylococcus aureus in mice with hereditary deficiency of the fifth component of complement. *Infect Immun.* 1983;41: 1071–1076.
363. Easmon CS, Glynn AA. Comparison of subcutaneous and intraperitoneal staphylococcal infections in normal and complement-deficient mice. *Infect Immun.* 1976;13: 399–406.
364. Cunnion KM, Benjamin DK, Hester CG, Frank MM. Role of complement receptors 1 and 2 (CD35 and CD21), C3, C4, and C5 in survival by mice of staphylococcus aureus bacteremia. *J Lab Clin Med.* 2004;143: 358–365. doi:10.1016/j.lab.2004.03.005
365. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2004;4: 133–142. doi:10.1038/nri1269
366. Guo RF, Huber-Lang M, Wang X, Sarma V, Padgaonkar VA, Craig RA, et al. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. *J Clin Invest.* 2000;106: 1271–1280. doi:10.1172/JCI10793
367. Nippe N, Varga G, Holzinger D, Löffler B, Medina E, Becker K, et al. Subcutaneous infection with S. aureus in mice reveals association of resistance with influx of neutrophils and Th2 response. *J Invest Dermatol.* 2010;131: 125–132.

368. Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, et al. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005;174: 2336–2342.
369. Schiwon M, Weisheit C, Franken L, Gutweiler S, Dixit A, Meyer-Schwesinger C, et al. Crosstalk between Sentinel and Helper Macrophages Permits Neutrophil Migration into Infected Uroepithelium. *Cell*. 2014;156: 456–468. doi:10.1016/j.cell.2014.01.006
370. Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, et al. Imaging of apoptosis (programmed cell death) with 99mTc annexin V. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1999;40: 184–191.
371. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun*. 2005;73: 1907–1916. doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005
372. Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology Baltim Md*. 2014;59: 2034–2042. doi:10.1002/hep.26754
373. Lefèvre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, Olganier D, Authier H, et al. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity*. 2013;38: 1038–1049. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.010
374. Maina V, Sutti S, Locatelli I, Vidali M, Mombello C, Bozzola C, et al. Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2012;122: 545–553. doi:10.1042/CS20110366
375. Baugh LA, Flanagan JR. Motor Memory: A Declaration of Non-Independence. *Curr Biol*. 2011;21: R70–R72. doi:10.1016/j.cub.2010.11.065
376. Bergsbaken T, Cookson BT. Macrophage Activation Redirects *Yersinia*-Infected Host Cell Death from Apoptosis to Caspase-1-Dependent Pyroptosis. *PLoS Pathog*. 2007;3: e161. doi:10.1371/journal.ppat.0030161
377. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*. 2010;11: 1136–1142. doi:10.1038/ni.1960
378. Bergsbaken T, Fink SL, den Hartigh AB, Loomis WP, Cookson BT. Coordinated Host Responses during Pyroptosis: Caspase-1-Dependent Lysosome Exocytosis and Inflammatory Cytokine Maturation. *J Immunol*. 2011;187: 2748–2754. doi:10.4049/jimmunol.1100477
379. LaRock CN, Cookson BT. Burning down the house: cellular actions during pyroptosis. *PLoS Pathog*. 2013;9: e1003793.

380. Craciun FL, Schuller ER, Remick DG. Early Enhanced Local Neutrophil Recruitment in Peritonitis-Induced Sepsis Improves Bacterial Clearance and Survival. *J Immunol.* 2010;185: 6930–6938. doi:10.4049/jimmunol.1002300
381. Charmoy M, Megnekou R, Allenbach C, Zweifel C, Perez C, Monnat K, et al. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol.* 2007;82: 288–299. doi:10.1189/jlb.0706440
382. Yamashiro S, Kamohara H, Wang J-M, Yang D, Gong W-H, Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol.* 2001;69: 698–704.
383. Ito T, Collins LV, Thorén FB, Dahlgren C, Karlsson A. Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13: 575–583.
384. Sun L, Guo R-F, Newstead MW, Standiford TJ, Macariola DR, Shanley TP. Effect of IL-10 on neutrophil recruitment and survival after *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41: 76–84. doi:10.1165/rcmb.2008-0202OC
385. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 and IL-1 Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *J Immunol.* 2011;187: 4835–4843. doi:10.4049/jimmunol.1102048
386. Goldmann O, von Kockritz-Blickwede M, Holtje C, Chhatwal GS, Geffers R, Medina E. Transcriptome Analysis of Murine Macrophages in Response to Infection with *Streptococcus pyogenes* Reveals an Unusual Activation Program. *Infect Immun.* 2007;75: 4148–4157. doi:10.1128/IAI.00181-07
387. Bystrom J, Evans I, Newson J, Stables M, Toor I, van Rooijen N, et al. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood.* 2008;112: 4117–4127. doi:10.1182/blood-2007-12-129767
388. Lopez-Castejón G, Baroja-Mazo A, Pelegrín P. Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cell Mol Life Sci.* 2010;68: 3095–3107. doi:10.1007/s00018-010-0609-y
389. Taechowisan T, Chanaphat S, Ruensamran W, Phutdhawong WS. Antibacterial activity of 1-methyl ester-nigericin from *Streptomyces hygroscopicus* BRM10; an endophyte in *Alpinia galanga*. *J Appl Pharm Sci.* 2013;3. Available: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=22313354&AN=88017407&h=3NElwU5uM0YzYGjbl0%2BjxtNuY7J4Sp3skVXNdpHIXlmy8htT8YsvXN1f%2F3FUO02qpyCZvPJ6eOyokNaT5SILIA%3D%3D&crl=c>
390. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107: 2568–2573. doi:10.1073/pnas.0915000107

391. Cain DW, O’Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, Hopper K, et al. Identification of a Tissue-Specific, C/EBP -Dependent Pathway of Differentiation for Murine Peritoneal Macrophages. *J Immunol.* 2013;191: 4665–4675. doi:10.4049/jimmunol.1300581
392. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, et al. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2011;121: 2736–2749. doi:10.1172/JCI45444
393. Wilson HM. SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Front Immunol.* 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00357
394. Ansel KM, Harris R, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity.* 2002;16: 67–76.
395. Müller G, Höpken UE, Stein H, Lipp M. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J Leukoc Biol.* 2002;72: 1–8.
396. Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? — The mouse’s tale. *J Clin Invest.* 2001;108: 649–654. doi:10.1172/JCI13903
397. Schroder K. Interferon- : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2003;75: 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252
398. Raes G, De Baetselier P, Noël W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2002;71: 597–602.
399. Liu T, Yu H, Ullenbruch M, Jin H, Ito T, Wu Z, et al. The In Vivo Fibrotic Role of FIZZ1 in Pulmonary Fibrosis. *PLoS One.* 2014;9: e88362.
400. Pesce JT, Ramalingam TR, Wilson MS, Mentink-Kane MM, Thompson RW, Cheever AW, et al. Retnla (relalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. *PLoS Pathog.* 2009;5: e1000393. doi:10.1371/journal.ppat.1000393
401. Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology.* 2009;214: 554–561. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.004
402. Schlesinger PH, Doebber TW, Mandell BF, White R, DeSchryver C, Rodman JS, et al. Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells. Studies with beta-glucuronidase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, ribonuclease B and agalacto-orosomucoid. *Biochem J.* 1978;176: 103–109.
403. Kruger T. Identification and Functional Characterization of Dendritic Cells in the Healthy Murine Kidney and in Experimental Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15: 613–621. doi:10.1097/01.ASN.0000114553.36258.91

404. McGarry MP, Stewart CC. Murine eosinophil granulocytes bind the murine macrophage-monocyte specific monoclonal antibody F4/80. *J Leukoc Biol.* 1991;50: 471–478.
405. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012;336: 86–90. doi:10.1126/science.1219179
406. Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F, Yao Y-M. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int J Biol Sci.* 2014;10: 520–529. doi:10.7150/ijbs.8879
407. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity.* 2012;37: 158–170. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011
408. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia.* 2009;13: 9.
409. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117: 175–184. doi:10.1172/JCI29881
410. Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22: 365.
411. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston A-T, Clement M, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One.* 2010;5: e8852. doi:10.1371/journal.pone.0008852
412. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23: 549–555.
413. He L, Marneros AG. Doxycycline Inhibits Polarization of Macrophages to the Proangiogenic M2-type and Subsequent Neovascularization. *J Biol Chem.* 2014;289: 8019–8028. doi:10.1074/jbc.M113.535765

Impact of resident macrophage phenotype in early inflammatory response to *S. aureus* infection

The objective of this work was to compare the inflammatory response orchestrated by peritoneal resident macrophages (PerMF) in C57BL/6 and DBA/2 mice, respectively resistant or sensitive to *S. aureus* infection. We demonstrated that: (i) upon infection, PerMF of C57BL/6 mice are dying by pyroptosis at a much higher rate than in DBA-2 mice (ii) pyroptosis kinetics depends on the basal phenotype of PerMF (M1 or M2) (iii) this kinetics modulates the early inflammatory response. Using an innovative approach based on single-cell gene expression analysis, we also characterized two populations of PerMF: LPM and SPM (large *or* small peritoneal macrophages). SPM and LPM express different molecules but both show an M2 phenotype, different from macrophages recruited by thioglycolate. Altogether, these results prove that the ground phenotype of resident macrophages, in association with host genetics, directly influences the early inflammatory response induced by *S. aureus* infection.

AUTEUR : Solène ACCARIAS

TITRE : Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*.

DIRECTEURS DE THESE : Séverine Boullier et Guillaume Tabouret

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Décembre 2014

RESUME

L'objectif de ce travail était de caractériser la réponse immunitaire orchestrée par les macrophages résidents péritonéaux (PerMF) des souris C57BL/6 et DBA/2, respectivement résistantes et sensibles à l'infection par *S. aureus*. Nous avons démontré que : (i) suite à l'infection, les PerMF des C57BL/6 meurent par pyroptose à un taux plus élevé que ceux des DBA/2. (ii) la cinétique de pyroptose est liée au phénotype basal des PerMF et (iii) cette cinétique module la réponse inflammatoire précoce. Nous avons également caractérisé, par une analyse en cellule unique, deux populations de PerMF: les LPM ou SPM (large *ou* small peritoneal macrophages) qui (i) présentent un profil M2 distinct et (ii) diffèrent des macrophages recrutés par le thioglycolate. En conclusion, ce travail démontre l'importance du phénotype basal des PerMF, en établissant une relation entre ce phénotype, fonction du fond génétique de l'hôte, et la qualité de la réponse inflammatoire contre *S. aureus*.

MOTS-CLES

S. aureus; macrophages; pyroptose; réponse inflammatoire; polarisation; homéostasie; single cell.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE

Immunologie et Maladies infectieuses

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

ENVT-INRA UMR 1225 IHAP - Laboratoire Interactions Hôtes-Agents Pathogènes

23, Chemin des Capelles

31076 Toulouse