

Invasion intracellulaire des cellules non-phagocytaires par *Staphylococcus aureus*

BOULANGER D., BUREAU F., LEKEUX P.

Service de Physiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, 20 Boulevard de Colonster, B-4000 Liège, Belgique

Correspondance : Delphine Boulanger, téléphone : +32(0)4/366.40.30, Fax : +32(0)4/366.29.35, E-mail : delphine.boulanger@student.ulg.ac.be

RESUME : *Staphylococcus aureus* est souvent à l'origine de maladies chroniques. La récurrence de ce type d'infection peut être mise en relation avec la capacité qu'a *S. aureus* à pénétrer et survivre à l'intérieur des cellules non-phagocytaires. L'adhérence de *S. aureus* aux cellules-hôtes est essentielle à l'invasion de la bactérie et dépend, d'une part, des protéines de surface bactériennes capables de se lier à la fibronectine et, d'autre part, des intégrines $\alpha_5\beta_1$ des cellules-hôtes. La pénétration de *S. aureus* à l'intérieur des cellules-hôtes nécessite l'activation de protéines tyrosine-kinases, impliquées dans l'initiation d'un signal intracellulaire et la polymérisation des microfilaments d'actine à la base d'un réarrangement du cytosquelette. À l'intérieur de la cellule-hôte, *S. aureus* est soit logé dans un endosome, soit libre dans le cytoplasme. Après avoir proliféré, *S. aureus* peut induire l'apoptose des cellules qu'il envahit, mais peut également persister dans les cellules sous forme de variants qui se caractérisent par une faible activité métabolique et une moindre virulence. Enfin, bien que *S. aureus* pénètre à l'intérieur de cellules non-phagocytaires, tant *in vitro* que chez l'animal, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'impact d'une présence intracellulaire de *S. aureus in vivo*.

1. INTRODUCTION

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène capable de provoquer diverses maladies chez l'homme ainsi que chez l'animal domestique. Chez l'homme, *S. aureus* peut causer, soit des infections mineures de la peau ou des muqueuses, soit des infections sévères, associées ou non à des septicémies, telles que des pneumonies, des endocardites, l'ostéomyélite, le syndrome du choc toxique, etc (Lowy, 1998). Chez l'animal, *S. aureus* est principalement connu pour provoquer des infections de la glande mammaire (mammites) chez la vache laitière (Sutra et Poutrel, 1994). La mammité pose un problème majeur car elle engendre d'importantes pertes économiques pour l'éleveur. Ces pertes sont dues, entre autres, au coût du traitement antibiotique, à la perte de rendement laitier et, aux pénalités imposées par l'industrie laitière

(Sears et McCarthy, 2003). D'une manière générale, les infections à *S. aureus* sont souvent chroniques et récurrentes. La récurrence de ce type d'infection s'explique par les nombreux mécanismes que *S. aureus* a acquis pour se protéger des défenses immunitaires de l'hôte ainsi que des traitements antibiotiques (Lowy, 1998). Parmi les stratégies développées, l'invasion (pénétration d'une bactérie à l'intérieur d'une cellule non-phagocytaire) des cellules de l'hôte par la bactérie pourrait s'avérer être la plus subtile. En effet, bien que *S. aureus* soit considéré comme une bactérie extracellulaire, de nombreuses expériences *in vitro* ont démontré que cette bactérie peut pénétrer, survivre et même se répliquer à l'intérieur de cellules non-phagocytaires telles que les cellules épithéliales, les fibroblastes et, les kératinocytes (Hamill *et al.*, 1986 ; Usui *et al.*, 1992 ; Almeida *et al.*, 1996). Peu d'études *in vivo* ont

confirmé ces observations ; cependant, la présence de *S. aureus* a été mise en évidence dans des ostéoblastes (Hudson *et al.*, 1995 ; Reilly *et al.*, 2000), dans des macrophages et des cellules alvéolaires isolés à partir de lait prélevé sur des vaches naturellement infectées (Craven et Anderson, 1984 ; Hébert *et al.*, 2000) et, dans des cellules épithéliales et des neutrophiles issus d'une glande mammaire de souris expérimentalement infectée (Anderson et Chandler, 1975 ; Brouillette *et al.*, 2003). Cette propriété pourrait contribuer, d'une part, à la protection de *S. aureus* qui se logerait dans les cellules de manière à éviter les défenses immunitaires de l'hôte et les traitements antibiotiques et d'autre part, à la prolifération et à la dissémination de *S. aureus* à travers les tissus. Cette revue fait le point sur les différentes étapes franchies par *S. aureus* pour se retrouver à l'intérieur des cellules non-phagocytaires.

2. GENERALITES

L'internalisation (endocytose de la bactérie par la cellule eucaryote) de *S. aureus* par les cellules-hôtes a été démontrée pour la première fois en 1985 (Ogawa *et al.*, 1985). Depuis, *S. aureus* a été mis en évidence dans les cellules endothéliales (Hamill *et al.*, 1986 ; Vann et Proctor, 1987), les cellules épithéliales (Almeida *et al.*, 1996 ; Bayles *et al.*, 1998 ; Dziewanowska *et al.*, 1999), les ostéoblastes (Hudson *et al.*, 1995 ; Jevon *et al.*, 1999), les fibroblastes (Usui *et al.*, 1992 ; Sinha *et al.*, 1999) et les cellules embryonnaires de rein (Sinha *et al.*, 2000).

Sur base d'analyses réalisées à l'aide d'autres bactéries intracellulaires facultatives, telles que *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* spp. ou, *Streptococcus pyogenes*, il a été établi que l'invasion intracellulaire de cellules non-phagocytaires requiert entre autres deux étapes cruciales : 1) la fixation de la bactérie à un récepteur cellulaire de l'hôte avec une affinité suffisante pour induire la transduction d'un signal de la membrane vers l'intérieur de la cellule-hôte ; 2) un réarrangement subséquent du cytosquelette permettant l'endocytose de la bactérie.

La fixation de l'agent pathogène à un récepteur de l'hôte peut se réaliser de différentes manières. Par exemple, *Yersinia* spp. exprime une protéine de surface capable de se lier à la sous-unité β_1 des intégrines membranaires des cellules-hôtes. Cette molécule est appelée « invasine » parce qu'elle permet non seulement l'adhérence de la bactérie mais, également, l'invasion de celle-ci dans la cellule-hôte (Isberg et Leong, 1990 ; Pepe et Miller, 1993). L'interaction entre l'invasine et la sous-unité β_1 induit la transduction d'un signal intracellulaire à partir du domaine cytoplasmique de l'intégrine, ce qui conduit à un réarrangement du cytosquelette de la cellule-hôte et à l'endocytose de *Yersinia*. Dans ce cas, l'invasion est due à une interaction directe entre la bactérie et la cellule non-phagocytaire. Par opposition, *Streptococcus pyogenes* entre dans la cellule-hôte après un contact indirect avec celle-

ci. En effet, *Streptococcus pyogenes* présente à sa surface une protéine (F) qui agit comme un récepteur à la fibronectine et qui ne se lie à la sous-unité β_1 de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ qu'une fois couplée à la fibronectine (Ozeri *et al.*, 1998). L'interaction entre *Streptococcus pyogenes* et la cellule-hôte se fait donc par l'intermédiaire d'un pont, obtenu par une molécule de fibronectine. Ce type d'interaction semble cependant aussi efficace que celui utilisé par *Yersinia* car, un réarrangement du cytosquelette et un englobement de la bactérie ont lieu également.

S. aureus colonise la surface des tissus-hôtes grâce à la présence de nombreuses protéines de surface présentant une affinité élevée pour certains composants de la matrice extracellulaire. Ces protéines, appelées *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM), se lient à la fibronectine, au fibrinogène, au collagène, à la vitronectine et à d'autres ligands (Patti *et al.*, 1994). La fibronectine semble cependant jouer un rôle majeur dans l'adhérence et l'invasion de *S. aureus*. Il a d'abord été démontré que la fibronectine se fixe à *S. aureus* avec une affinité telle que la réaction soit difficilement réversible en conditions physiologiques (Mosher et Proctor, 1980 ; Kuusela *et al.*, 1984 ; Maxe *et al.*, 1986). Puis, des études plus approfondies ont permis d'identifier deux MSCRAMMs de *S. aureus* capables de se lier à la fibronectine (Fröman *et al.*, 1987 ; Signäs *et al.*, 1989 ; Jönsson *et al.*, 1991) et jouant un rôle important dans l'invasion par *S. aureus* (Bayles *et al.*, 1998 ; Lammers *et al.*, 1999 ; Dziewanowska *et al.*, 1999 ; Sinha *et al.*, 1999). Ces protéines sont appelées FnBP (*fibronectin-binding protein*). Il a également été démontré que l'internalisation de *S. aureus* requiert les intégrines $\alpha_5\beta_1$, connues pour fixer la fibronectine (Sinha *et al.*, 1999 ; Dziewanowska *et al.*, 2000 ; Massey *et al.*, 2001 ; Kintarak *et al.*, 2004). L'implication du cytosquelette de la cellule-hôte a été mise en évidence pour la première fois par Almeida et collaborateurs en 1996. Ceux-ci démontrèrent, d'une part,

qu'un traitement des cellules-hôtes par la cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine) réduisait fortement le taux d'invasion de *S. aureus* et, d'autre part, que des pseudopodes étaient visibles lors d'observations réalisées en microscopie électronique.

L'internalisation de *S. aureus* par les cellules-hôtes non-phagocytaires serait donc initiée par l'intermédiaire d'une molécule de fibronectine qui se lie d'une part à une FnBP de la bactérie et d'autre part à une intégrine de la cellule-hôte (Dziewanowska *et al.*, 2000 ; Fowler *et al.*, 2000). L'interaction induirait la transduction d'un signal intracellulaire conduisant à un réarrangement du cytosquelette, à la formation de pseudopodes et à l'invasion de la bactérie dans la cellule ciblée.

2.1. Structures des molécules impliquées dans l'adhérence et l'invasion de *Staphylococcus aureus*

2.1.1. La fibronectine

La fibronectine est une glyco-protéine dimérique qui sert notamment à ancrer les cellules des tissus dans la matrice extracellulaire. L'analyse des fragments de la fibronectine a permis d'identifier 6 domaines polypeptidiques repliés de façon compacte. Chaque domaine est lui-même constitué de séquences répétitives (Yamada, 1989). Les divers domaines de la fibronectine portent des sites de haute affinité envers les intégrines de surface (généralement $\alpha_5\beta_1$), certaines formes dénaturées du collagène et la fibrine. Il a été observé qu'il suffit d'un segment de 100 acides aminés pour que la fibronectine se lie aux intégrines ; l'essai de peptides synthétiques correspondant à ce segment a identifié le tripeptide Arg-Gly-Asp (abrégé couramment en RGD) comme étant la structure minimale reconnue par les récepteurs de la surface des cellules (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984a ; 1984b).

2.1.2. Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs superficiels qui font adhérer la cellule à la matrice et aux cellules voi-

sines. Ce sont des hétérodimères d'éléments α et β (Hynes, 1987 ; 1992). Toute chaîne β peut s'assembler avec n'importe quelle chaîne α , formant ainsi des intégrines capables de fixer divers ligands (Humphries, 2000). Chaque chaîne contient un domaine extracellulaire important, un domaine transmembranaire et, un court domaine cytoplasmique (figure 1). L'intégrine sur laquelle se fixe la fibronectine se compose généralement des chaînes $\alpha_5\beta_1$ (Isberg et Leong, 1990). L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ réside en des points particuliers de la membrane cellulaire, appelés « points de contact focaux », qui correspondent au point d'ancrage des filaments d'actine du cytosquelette de la cellule. D'autres protéines se fixant à l'actine, comme la vinculine, la taline ou l' α -actinine, sont aussi rassemblées en ces points de la membrane (figure 1) (Horwitz *et al.*, 1986 ; Otey *et al.*, 1990). En plus de jouer un rôle structurel, les sites focaux d'adhésion riches en intégrines sont des centres d'activation pour la transduction d'un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule (Hynes, 1992 ; Schaller *et al.*, 1992 ; Hughes et Pfaff, 1998). En conséquence, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est également associée à des protéines de signalisation cellulaire, dont le groupe prédominant est le FAK (*Focal Adhesion Kinase*), une sous-famille des protéines-tyrosine kinases (PTK)

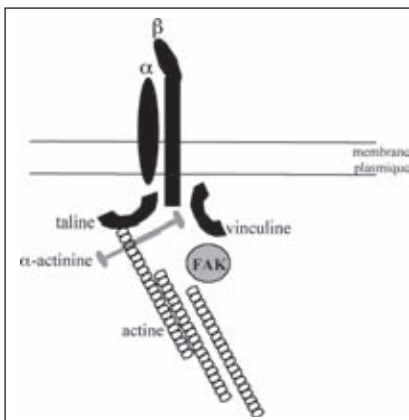


Figure 1 : Schéma structurel des récepteurs superficiels de la famille des intégrines et de leurs connections à l'actine du cytosquelette. Chaque récepteur est formé de 2 polypeptides transmembranaires, les protomères α et β . La connection de l'intégrine à l'actine du cytosquelette a lieu grâce à la fixation au domaine cytoplasmique de l'intégrine de plusieurs protéines telles que la vinculine, la taline et, l' α -actinine (d'après Hauck, 2002).

(Miyamoto *et al.*, 1995 ; Schlaepfer *et al.*, 1999 ; Hauck, 2002). L'activation de FAK requiert entre autres le recrutement des protéines kinases Src pour former un complexe FAK/Src capable d'induire toute une série de signaux intracellulaires comme, par exemple, l'activation des kinases ERK/MAP ou la phosphorylation des molécules associées aux filaments d'actine, tels que l'actinine (Miyamoto *et al.*, 1995 ; Hauck, 2002).

2.1.3. Les fibronectin-binding protéines

Deux FnBP ont été identifiées chez *S. aureus*, FnBPA et FnBPB (Signäs *et al.*, 1989 ; Jönsson *et al.*, 1991). Ces deux récepteurs présentent des caractéristiques structurales communes. Dans leur partie N-terminale, ces protéines portent une séquence signal nécessaire pour le transport des protéines à travers la membrane plasmique. La partie C-terminale, quant à elle, se compose : 1) d'un motif conservé LPXTG (L = Leu, P = Pro, T = Thr, G = Gly, X = acide aminé quelconque) requis pour l'ancrage de la protéine dans la paroi cellulaire, 2) d'une région hydrophobe capable de se fixer dans la membrane, 3) d'une queue chargée positivement et destinée à rester dans le cytoplasme (figure 2) (Schneewind *et al.*, 1995 ; Ton-That

et al., 1997). Une fois que la protéine a été transportée à la surface cellulaire, le motif LPXTG est clivé et le groupe carboxylique, mis ainsi en évidence, se fixe à un groupe amine libre d'une branche d'un peptide constituant le peptidoglycane (figure 2) (Schneewind *et al.*, 1995 ; Ton-That *et al.*, 1997).

La partie N-terminale de la protéine présente une région A, longue de ~500 acides aminés (aa), une région B caractérisée par deux séquences répétitives de ~30 aa, une région C comprenant une région de 40 aa capable de fixer la fibronectine et appelée Du, et une région D (94 % d'homologie entre FnBPA et FnBPB ; Jönsson *et al.*, 1991) composée de 3 séquences répétitives de 37 ou 38 aa (désignées D1, D2 et D3) ainsi que d'une séquence répétitive incomplète (D4) (Signäs *et al.*, 1989 ; Jönsson *et al.*, 1991). Alors que la région B n'était pas considérée comme importante pour la fixation à la fibronectine, une étude récente (Massey *et al.*, 2001) montre que la présence des 3 régions B, C et D sont nécessaires à l'adhérence de *S. aureus*. En effet, des souches exprimant une FnBPA déficiente pour les régions C et D maintenaient leur capacité d'adhérence alors que des souches exprimant une FnBPA déficiente pour les régions B, C et D la perdait complètement. Les FnBP présentent donc de multiples sites de liaison à la fibro-

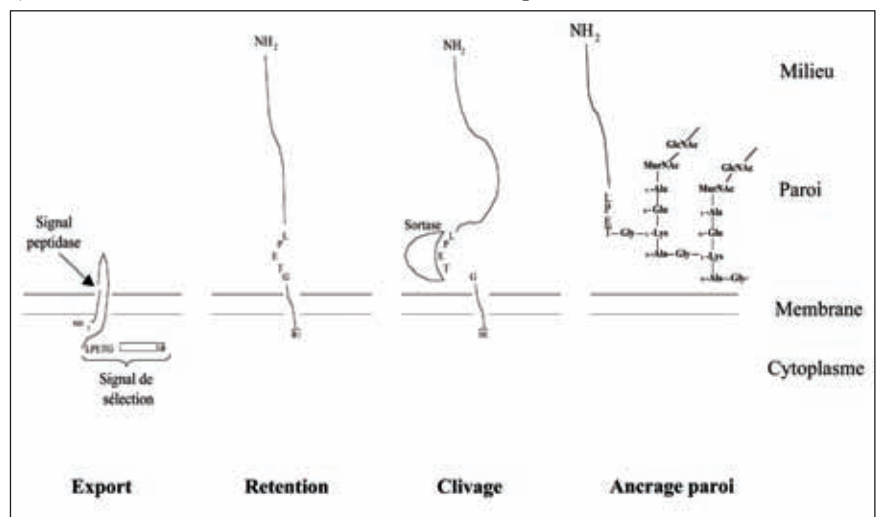


Figure 2 : Modèle schématique représentant les étapes nécessaires à l'exportation et à l'ancrage dans la paroi bactérienne de la protéine fixatrice de fibronectine (FnBP) chez *S. aureus*. Ce processus requiert 4 étapes majeures au cours desquelles un clivage de la chaîne polypeptidique a lieu entre le résidu thréonine et le résidu glycine du motif LPXTG. Le groupement carboxyle du résidu thréonine se fixe alors au peptidoglycane de la paroi bactérienne via un groupement amine libre d'une chaîne peptidique riche en glycine, servant de pont structurel au peptidoglycane (d'après Schneewind *et al.*, 1995).

nectine.

Cette étude confirme des résultats antérieurs qui démontraient que les FnBP pouvaient en effet fixer plusieurs molécules de fibronectine. En 1987, Fröman et collaborateurs observaient qu'une FnBP purifiée de *S. aureus* pouvait fixer 6 à 9 copies d'un domaine spécifique de la fibronectine. En 1994, Huff et collaborateurs montraient qu'un fragment contenant les séquences D1-D3 liaient 2 molécules de fibronectine.

D'après Ozeri et collaborateurs (1998), cette capacité à fixer plusieurs molécules de Fn serait indispensable à la pénétration de la bactérie à l'intérieur de la cellule-hôte. En effet, ses expériences ont montré que l'invasion de la bactérie à l'intérieur des cellules-hôtes dépendaient de la concentration en fibronectine. Plus précisément, l'entrée de la bactérie n'avait lieu qu'à partir du moment où le nombre de molécules de fibronectine liées à la bactérie dépassait un certain seuil et, par conséquent, permettaient le passage d'un état d'adhérence de la bactérie à une invasion maximale de celle-ci à l'intérieur des cellules-hôtes (Ozeri *et al.*, 1998).

Une telle propriété implique que l'entrée de la bactérie requiert une interaction simultanée entre plusieurs molécules de fibronectine et des intégrines (Ozeri *et al.*, 1998). Sachant que les intégrines se regroupent en « amas » en des « points de contact focaux » pour interagir avec la matrice extracellulaire, il a été suggéré qu'une bactérie invasive pouvait utiliser ces mêmes « amas » pour entrer dans la cellule-hôte. Récemment, il a été mis en évidence que les FnBP pouvaient induire des « amas » d'intégrines lors de l'invasion de *Streptococcus pyogenes* dans les cellules épithéliales (Ozeri *et al.*, 2001) et dans les cellules endothéliales (Rohde *et al.*, 2003).

2.2. Définition de l'endocytose

S. aureus pénètre les cellules-hôtes par un mécanisme d'endocytose. Par définition, l'endocytose permet le prélèvement, par la cellule eucaryote, de matériaux extracellulaires au moyen d'une invagination de sa membrane plasmique qui va se muer en une

petite vésicule (Lodish *et al.*, 1997). L'endocytose qui a lieu en présence d'un récepteur (= endocytose par récepteur interposé), comme c'est le cas lors de l'invasion de *S. aureus*, fait intervenir une incorporation spécifique du ligand fixé à son récepteur, par invagination de puits tapissés de clathrine sur la membrane plasmique (Lodish *et al.*, 1997). La clathrine est une protéine fibreuse qui polymérise en un réseau appuyé sur la face cytosolique d'une zone de la membrane et amorce l'endocytose. La région en cause se gonfle alors vers l'intérieur en formant un puits tapissé qui s'approfondit et finit par se détacher de la membrane (Lodish *et al.*, 1997).

3. ANALYSE DÉTAILLÉE DU MÉCANISME D'INVASION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DANS LES CELLULES NON-PHAGOCYTAIRES

3.1. Adhérence : implication des fibronectin-binding proteins de Staphylococcus aureus et de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ de la cellule-hôte

3.1.1. Rôle des fibronectin-binding proteins

Il a été démontré que :

- 1) des mutants de *S. aureus* déficients en FnBP présentaient une capacité d'adhérence et d'invasion nettement inférieure à celle de la souche sauvage. Ces études ont permis de déduire que les FnBP sont importantes pour l'adhérence et requises pour l'invasion de *S. aureus* dans les cellules épithéliales mammaires bovines (Dziewanowska *et al.*, 1999 ; Lammers *et al.*, 1999), dans les cellules épithéliales de la cornée humaine (Jett et Gilmore, 2002), dans les kératinocytes (Kintarak *et al.*, 2004), dans les cellules endothéliales (Peacock *et al.*, 1999 ; Sinha *et al.*, 1999), dans les fibroblastes (Fowler *et al.*, 2000), et dans une lignée de cellules embryonnaires de rein (Sinha *et al.*, 1999) ;
- 2) La pré-incubation des cellules hôtes (cellules 293) avec un peptide comprenant la région D1-D4 des FnBP empêche l'internalisa-

tion de *S. aureus* (Sinha *et al.*, 1999) ;

- 3) la transformation des souches non-invasives de *S. carnosus* et *Lactococcus lactis* par un plasmide codant pour les FnBP engendre la pénétration de ces souches dans les cellules 293 (Sinha *et al.*, 2000) et dans les cellules endothéliales (Massey *et al.*, 2001) ;
- 4) des billes de polystyrène recouvertes de FnBP peuvent être endocytées par les cellules 293 (lignée de cellules embryonnaires de rein) (Sinha *et al.*, 2000) ;
- 5) sur un total de 163 souches cliniques de *S. aureus*, 77 % présentent les deux FnBP et 23 % présentent soit FnBPA, soit FnBPB. Aucune de ces souches isolées n'est donc dépourvue de FnBP (Peacock *et al.*, 2000) ;
- 6) les souches associées aux maladies invasives possèdent plus souvent 2 gènes *fnbp* qu'un seul gène (Proctor *et al.*, 1984 ; Peacock *et al.*, 2000).

Ces différents résultats renforcent donc bien l'hypothèse que les FnBP jouent un rôle majeur pour l'adhérence et l'invasion de *S. aureus* dans les cellules non-phagocytaires.

3.1.2. Rôle de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$

Le modèle actuellement accepté pour expliquer l'internalisation de *S. aureus* par les cellules-hôtes, propose une interaction entre la bactérie et la cellule par l'intermédiaire d'un pont-fibronectine. Le complexe *S. aureus*-fibronectine se fixerait à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. L'importance de ce récepteur dans l'invasion de *S. aureus* a été mise en évidence à plusieurs reprises. D'une part, il a été démontré, à partir de différents types cellulaires, que l'incubation préalable des cellules-hôtes avec des anticorps anti- $\alpha_5\beta_1$ permet de réduire de manière significative l'invasion de *S. aureus* (Sinha *et al.*, 1999 ; Massey *et al.*, 2001 ; Dziewanowska *et al.*, 2000 ; Kintarak *et al.*, 2004). D'autre part, Fowler et collaborateurs (2000) ont montré que la capacité qu'a *S. aureus* à pénétrer les cellules GD25 (lignée de cellules fibroblastiques murines mutantes) déficientes en intégrines β_1 était réduite de ± 98 % en comparaison

avec les cellules GD25 complémen-tées en β_1 . L'ensemble de ces résultats suggère donc que, tout comme les FnBP, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ joue un rôle crucial dans l'invasion des cellules-hôtes par *S. aureus*.

3.2. Invasion : facteurs influençant le processus

3.2.1. Importance de l'interaction entre la bactérie et la cellule-hôte

Pour qu'une bactérie pénètre à l'intérieur des cellules-hôtes, il est nécessaire que l'adhésion se réalise avec une affinité assez élevée pour induire la transduction d'un signal intracellulaire et, par conséquent, un réarrangement du cytosquelette permettant l'endocytose de la bactérie. *S. aureus* adhère aux cellules non-phagocytaires via une interaction entre la bactérie et la fibronectine, d'une part et entre la fibronectine et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ d'autre part. Or, la fixation de *S. aureus* à la fibronectine n'est pas suffisante pour provoquer l'endocytose de la bactérie par la cellule-hôte (Verbrugh *et al.*, 1981 ; Proctor *et al.*, 1982 ; Van de Water *et al.*, 1983) et l'interaction entre la fibronectine et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est connue pour jouer un rôle essentiel dans le maintien des tissus à la matrice extracellulaire et non dans l'endocytose. L'invasion des cellules non-phagocytaires par *S. aureus* requiert donc, *a priori*, des subtilités supplémentaires pour induire la formation de pseudopodes et l'endocytose de la bactérie. Plusieurs études ont tenté d'approfondir cette interaction entre *S. aureus* et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ afin de comprendre pourquoi elle n'était pas suffisante à l'endocytose. Van Nhieu et Isberg (1991) ont, par exemple, comparé l'interaction entre l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et la fibronectine à celle de l'intégrine et de l'invasine. L'invasine est une protéine de surface de *Yersinia spp.* qui, en se fixant à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, induit l'invasion de la bactérie à l'intérieur des cellules-hôtes (Isberg et Falkow, 1985 ; Isberg, 1990 ; Isberg et Leong, 1990). Ils ont démontré que l'efficacité de l'interaction ne dépend pas du site de liaison de l'intégrine reconnu par la molécule (fibronectine ou invasine), mais bien de l'affinité du ligand pour l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Van Nhieu et

Isberg, 1993). En effet, ils ont pu constater que l'utilisation de différents anticorps anti- $\alpha_5\beta_1$ induisait un taux d'internalisation différent selon l'affinité que ces anticorps avaient pour l'intégrine. Plus l'affinité était élevée, plus l'endocytose de l'anticorps par la cellule-hôte était importante. En accord avec cette observation, ils ont relevé que l'affinité de l'invasine pour l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ était plus élevée que celle de la fibronectine (Van Nhieu et Isberg, 1993).

Rôle de la protéine de choc thermique-60

Dziewanowska et collaborateurs (2000) ont alors proposé l'idée que des co-récepteurs pourraient intervenir pour augmenter l'affinité du complexe *S. aureus*-fibronectine-intégrine $\alpha_5\beta_1$ et il a été démontré que la protéine de choc thermique (HSP) 60 (humaine ou bovine) avait la capacité de se lier aux FnBP purifiées. De plus, la pré-incubation de cellules épithéliales mammaires (bovines) avec une solution d'anticorps LK anti-HSP60 (reconnaissant l'épitope situé entre les résidus 383 et 447 de la HSP60 eucaryote) réduisait fortement l'invasion de *S. aureus*. Dziewanowska et collaborateurs (2000) ont donc suggéré que HSP60 pourrait agir en tant que co-récepteur pour augmenter l'affinité de la fibronectine à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et pour induire la transduction d'un signal intracellulaire. Cependant, aucune autre étude n'a encore confirmé ces résultats. Au contraire, deux études semblent contredire ces observations. Massey et collaborateurs (2001) n'ont observé aucune réduction de l'invasion de *S. aureus* lors de l'ajout d'anticorps anti-HSP60 (reconnaissant l'épitope compris entre les résidus 383 et 447) à une culture de cellules endothéliales humaines.

Sinha et collaborateurs (2000) ont avancé, sur base de plusieurs expériences, que les FnBP sont suffisantes à l'invasion de *S. aureus* dans les cellules 293.

Cependant, dans l'étude de Massey, l'anticorps anti-HSP60 utilisé est le même que celui choisi par Dziewanowska (2000) et, selon le type cellulaire considéré, HSP60 peut se

caractériser par des épitopes différents et par conséquent ne pas être reconnue par un même anticorps. De plus, au cours de l'étude de Sinha, aucune expérience n'a été faite pour vérifier la présence de HSP60 sur les cellules-hôtes et aucune expérience n'a permis d'évaluer l'effet de l'ajout d'anticorps anti-HSP60 sur l'efficacité d'invasion de *S. aureus*. Le rôle de HSP60 dans l'adhérence de *S. aureus* ne peut donc par être complètement exclu dans les études de Massey (2001) et Sinha (2000), mais il peut être avancé que cette protéine ne joue pas un rôle majeur dans l'invasion des cellules endothéliales et des cellules 293 par *S. aureus*.

Rôle de la protéine d'adhérence extracellulaire de *S. aureus*

Une étude récente a montré qu'une autre protéine pourrait également intervenir dans le processus d'invasion de *S. aureus* (Hagggar *et al.*, 2003). La protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) est une protéine généralement extracellulaire mais qui peut aussi se relocaliser et se fixer sur la surface bactérienne. Eap est capable de lier plusieurs protéines de plasma, telles que la fibronectine, le fibrinogène et la prothrombine, et joue un rôle majeur dans l'agrégation des bactéries (Palma *et al.*, 1999). Hagggar et collaborateurs (2003) ont réalisé trois expériences pour démontrer que Eap influence l'invasion de *S. aureus* dans les cellules-hôtes. Une première expérience était basée sur l'utilisation de souches *S. aureus* mutées pour le gène *eap*. Des fibroblastes ou des cellules épithéliales étaient incubées avec une culture mixte de souches *S. aureus* sauvages et mutées *eap*. Après 2 heures de co-culture, le nombre de bactéries intracellulaires était évalué. Le nombre de souches sauvages était bien plus important que celui des souches mutées *eap*. La deuxième expérience montrait que l'ajout d'Eap externe augmentait le taux d'invasion des souches *S. aureus* sauvages, des souches mutées *eap* mais également des souches de *S. carnosus*, bactérie caractérisée par une faible capacité d'invasion. Enfin, la troisième expérience démontrait que *S. aureus* traité préalablement avec

des anticorps anti-Eap présentait une efficacité d'invasion réduite. Haggart et collaborateurs (2003) ont donc suggéré que la protéine bactérienne Eap pourrait contribuer au mécanisme d'invasion de *S. aureus*. D'après leurs hypothèses, la protéine Eap serait impliquée dans une nouvelle voie d'invasion, parallèle ou complémentaire à la voie incluant les FnBP.

Rôle de la concentration en fibronectine et en intégrines $\alpha_5\beta_1$

Bien que la fibronectine ne semble pas avoir une affinité assez élevée pour l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ afin de permettre l'invasion de *S. aureus* dans les cellules-hôtes (Van Nhieu et Isberg, 1993), il semble néanmoins de plus en plus évident que l'interaction simultanée entre plusieurs molécules de fibronectine et des « amas » d'intégrines est requise pour une internalisation optimale de la bactérie dans des cellules-hôtes non-phagocytaires (Ozeri *et al.*, 1998).

3.2.2. Importance du cytosquelette

Afin qu'une bactérie soit endocytée par des cellules-hôtes, il est nécessaire que ces cellules forment des pseudopodes pour entourer l'organisme pathogène. Pour que ces pseudopodes se développent, il est nécessaire que la cellule-hôte subisse des réarrangements du cytosquelette. Le cytosquelette des cellules est essentiellement constitué de filaments d'actine et de microtubules. L'endocytose d'une bactérie requiert donc pour la formation de pseudopodes, la polymérisation d'actine et/ou de microtubules ainsi que la présence de molécules capables d'induire la formation de puits à clathrine (voir 2.2.).

La présence de pseudopodes lors de l'invasion de cellules non-phagocytaires par *S. aureus* a pu être observée à plusieurs reprises lors d'analyses en microscopie électronique (Hamill *et al.*, 1986 ; Almeida *et al.*, 1996 ; Bayles *et al.*, 1998 ; Kahl *et al.*, 2000).

De même, l'implication du cytosquelette lors de l'internalisation de *S. aureus* a été démontrée plusieurs fois. En effet, l'ajout de cytochalasine D (ou B), substance inhibitrice de la polymérisation des microfilaments d'actine, réduit fortement le nombre de *S. aureus* intracellulaire dans de nombreux types cellulaires (Hamill

et al., 1986 ; Almeida *et al.*, 1996 ; Dzienanowska *et al.*, 1999 ; Ellington *et al.*, 1999 ; Jevon *et al.*, 1999 ; Sinha *et al.*, 1999 ; Jett et Gilmore, 2002). Par exemple, un traitement à la cytochalasine D a permis de réduire l'invasion de *S. aureus* de 95 % dans des ostéoblastes humains (Jevon *et al.*, 1999) et de 99,8 % dans des ostéoblastes de souris (Ellington *et al.*, 1999). Par contre, la polymérisation de microtubules ne semble pas autant influencer la pénétration de *S. aureus* dans les cellules eucaryotes (Almeida *et al.*, 1996 ; Ellington *et al.*, 1999 ; Jevon *et al.*, 1999 ; Sinha *et al.*, 1999 ; Jett et Gilmore, 2002). Par exemple, le traitement des cellules épithéliales mammaires (bovines) à la colchicine n'a pas pu réduire l'invasion de *S. aureus* (Almeida *et al.*, 1996) et l'utilisation de colchicine sur des ostéoblastes humains n'a réduit l'invasion de *S. aureus* que de 40 %, en comparaison au traitement à la cytochalasine D qui réduisait l'invasion de 95 % (Jevon *et al.*, 1999).

Enfin, Jevon et collaborateurs (1999) et Ellington et collaborateurs (1999) ont mis en évidence la nécessité des cellules eucaryotes à présenter des molécules de clathrine. La formation des puits tapissés de clathrine est inhibée par l'ajout de monodansylcadaverine. Le traitement d'ostéoblastes humains (Jevon *et al.*, 1999) ou murins (Ellington *et al.*, 1999) par cette substance a réduit le nombre de *S. aureus* intracellulaires de 95 % et de 96 %, respectivement.

3.2.3. Importance des protéines tyrosine-kinases

L'activation des cascades de phosphorylation est cruciale pour l'invasion des cellules eucaryotes par les bactéries pathogènes (Finlay et Cossart, 1997). L'interaction de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ à un ligand capable d'induire la transduction d'un signal active toute une série de protéines intracellulaires, dont certaines ont été identifiées et étudiées (voir ci-dessus). Parmi ces protéines, la famille des protéines-tyrosine kinases ainsi que les kinases Src semblent jouer un rôle crucial (Miyamoto *et al.*, 1995 ; Hauck, 2002).

Dzienanowska et collaborateurs (1999) ont démontré que l'utilisation

de génistéine, une substance inhibitrice des protéines tyrosine-kinase, réduisait l'endocytose de *S. aureus* par les cellules épithéliales de 95 % par rapport aux cultures contrôles. La transduction de signal médiée par les tyrosine-kinases joue un rôle important pour l'internalisation de *S. aureus* par les cellules non-phagocytaires. Des études récentes confirment cette hypothèse en démontrant que les tyrosine-kinases Src sont également nécessaires à la pénétration de *S. aureus*. En effet, non seulement, l'inhibition pharmacologique et génétique des protéines kinase-Src réduit fortement la pénétration de *S. aureus* dans les cellules mais, les cellules déficientes en protéines kinase-Src sont résistantes à l'invasion par *S. aureus* et, l'activité des kinases Src est augmentée en réponse à l'infection de *S. aureus* (Agerer *et al.*, 2003 ; Fowler *et al.*, 2003).

3.2.4. Importance des kinases ERK/MAP

La stimulation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ suite à sa fixation avec un ligand spécifique peut induire la voie d'activation des kinases MAP (MAPK) (Miyamoto *et al.*, 1995). Parmi les MAPKs les kinases ERK1 et ERK2 sont activées lors de l'agrégation des récepteurs de type intégrine (Miyamoto *et al.*, 1995) et lors de l'activation du groupe FAK (Hauck, 2002). Récemment, Ellington et collaborateurs (2001) ont démontré que la phosphorylation de ERK1 et ERK2 était nécessaire à l'invasion de *S. aureus* dans les ostéoblastes. En effet, l'inhibition de ces kinases par l'inhibiteur PD98059 réduisait l'invasion intracellulaire de *S. aureus* de plus de 80 %.

3.3. Survie et prolifération intracellulaire

La plupart des bactéries invasives entrent dans la cellule-hôte via une vacuole formée par l'invagination de la membrane plasmique. Cependant, les événements ultérieurs peuvent varier d'un organisme à l'autre. Certaines bactéries sont capables d'empêcher la fusion de la vacuole avec un lysosome de manière à survivre dans une niche protégée au sein de la cellule. C'est le cas de *Salmonella* (Finlay et

Cossart, 1997). D'autres, par contre, lysent la vacuole et survivent dans le cytoplasme. C'est le cas, notamment, de *Shigella* et de *Listeria*. Bien que *S. aureus* ait souvent été observé au sein d'endosomes (Hamill *et al.*, 1986 ; Almeida *et al.*, 1996 ; Kahl *et al.*, 2000), plusieurs études ont montré la bactérie libre dans le cytoplasme (Hudson *et al.*, 1995 ; Bayles *et al.*, 1998 ; Brouillette *et al.*, 2003). *S. aureus* pénétrerait donc à l'intérieur de la cellule-hôte via un endosome, dont il s'échapperait après un certain temps pour se relocaliser dans le cytoplasme. Cependant, les mécanismes moléculaires développés lors de ce processus sont encore mal connus. Le cytoplasme pourrait favoriser la persistance de *S. aureus* à l'intérieur des cellules-hôtes grâce à son environnement riche en substances nutritives ainsi qu'à ses propriétés biochimiques qui permettraient la survie de variants « petites colonies » (voir 3.2.). *S. aureus* est également capable de se répliquer à l'intérieur des cellules-hôtes. En plus des expériences d'invasion basée sur le comptage des bactéries issues de la lyse des cellules infectées (Kahl *et al.*, 2000), des analyses de microscopie électronique ont permis d'observer des cellules de *S. aureus* en division (Bayles *et al.*, 1998 ; Brouillette *et al.*, 2003).

4. CONSÉQUENCES DE L'INVASION DE CELLULES NON-PHAGOCYTAIRES PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Les événements ultérieurs à l'internalisation de *S. aureus* sont multiples. Il a été démontré que *S. aureus* peut (1) se répliquer à l'intérieur des cellules-hôtes (voir 3.3.), (2) induire l'apoptose des cellules, (3) persister dans la cellule sous forme de variants à activité métabolique réduite.

4.1. L'apoptose des cellules infectées

L'apoptose associée à l'invasion de *S. aureus* a été reportée dans les cellules épithéliales (Bayles *et al.*, 1998 ; Kahl *et al.*, 2000 ; Wesson *et al.*, 2000), les kératinocytes (Mempel *et al.*, 2002), les cellules endothéliales

(Menzies et Kourteva, 1998) et les ostéoblastes (Tucker *et al.*, 2000). Les avis divergent quant à savoir si l'apoptose est induite par la cellule-hôte pour se défendre ou par *S. aureus* pour se propager.

Bayles et collaborateurs (1998) suggèrent que l'induction de l'apoptose dans les cellules non-phagocytaires pourrait permettre à *S. aureus* de pénétrer à l'intérieur des macrophages sans déclencher d'activités bactéricides et en étant protégé contre les défenses immunitaires et/ou les antibiotiques. La présence de cellules vivantes de *S. aureus* à l'intérieur de macrophages a, en effet, été démontrée (Craven et Anderson, 1984 ; Hébert *et al.*, 2000). Cette faculté à survivre à l'intérieur de cellules phagocytaires pourrait s'expliquer notamment par la production, par *S. aureus*, d'enzymes tels que la superoxyde dismutase qui permettrait de résister à l'action des espèces réactives de l'oxygène formées à l'intérieur du phagocyte (Miller et Britigan, 1997 ; Clements *et al.*, 1999 ; Karavolos *et al.*, 2003), ou par la sécrétion de l'entérotoxine SEC, capable d'induire l'expression de l'IL-10, cytokine connue pour diminuer les fonctions des macrophages (Sieling *et al.*, 1993 ; Ferens et Bohach, 2000).

Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose suite à l'invasion des cellules par *S. aureus* sont encore mal connus mais, quelques expériences suggèrent des possibilités. Wesson et collaborateurs (1998) ont démontré que les caspases 3 et 8 de la cellule-hôte sont activées quelques heures après l'invasion par *S. aureus*. Les caspases sont des protéines connues pour jouer un rôle primordial pour l'induction de l'apoptose (Kidd, 1998 ; Thornberry et Lazebnik, 1998). Il existe deux types de caspases : les caspases initiatrices, telles la caspase 8, qui enclenchent la voie de transduction menant à la mort cellulaire et les caspases effectrices, qui catalysent le désassemblage des structures de la cellule. La voie de transduction induite par la caspase 8 implique des « récepteurs associés à la mort cellulaire », dont la liaison avec certaines protéines comme le TNF, par exemple, amène à l'activation de cette caspase. Le rôle joué par la caspase 8 dans les

cellules infectées par *S. aureus* semble se confirmer par la découverte que *S. aureus* induit l'expression du TNF- α (Wesson *et al.*, 1998) et du ligand TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) (Alexander et Hudson, 2001). TRAIL est capable de se lier à un récepteur présentant un domaine spécifique de « mort cellulaire » et d'induire l'apoptose via l'activation de la caspase 8 (Ashkenazi et Dixit, 1998). Du point de vue de *S. aureus*, il semble que la bactérie, pour induire l'apoptose des cellules-hôtes, doit être active et localisée à l'intérieur de la cellule infectée. En effet, des bactéries tuées préalablement par la chaleur ou un rayonnement UV n'induisent pas l'apoptose des cellules eucaryotes (Menzies et Kourteva, 1998 ; Kahl *et al.*, 2000). De même, un traitement préalable des cellules-hôtes à la cytochalasine D ou à la rifampicine (antibiotique bactériostatique capable de pénétrer à l'intérieur des cellules eucaryotes) empêche l'induction de l'apoptose par *S. aureus* (Menzies et Kourteva, 1998 ; Wesson *et al.*, 1998 ; Kahl *et al.*, 2000). Il a également été démontré, d'une part, que la réplication intracellulaire de *S. aureus* précède l'induction de l'apoptose et, d'autre part, qu'une souche de *S. aureus* intracellulaire incapable de se répliquer n'engendre pas l'apoptose des cellules (Kahl *et al.*, 2000). Enfin, en 1998, Wesson et collaborateurs ont fait la découverte importante que le système régulateur *agr/sar* de *S. aureus* (voir 5.) intervient pour induire l'apoptose des cellules infectées. En effet, des souches *agr* ou *agr/sar* n'induisaient pas l'apoptose des cellules infectées.

4.2. Formation des variants « petites colonies »

La persistance et la récurrence de *S. aureus* ont aussi été associées à l'isolation de sous populations de *S. aureus* intracellulaires, caractérisées par un phénotype de « petites colonies » (SCV, pour « *small colony variants* »). Ces SCV contrairement au phénotype sauvage forment des colonies de petite taille, non pigmentées, non hémolytiques qui ne produisent que peu d' α -toxine (Quie, 1969 ; Proctor *et al.*, 1995). Ces SCV sont très résistants à de nombreux antibiotiques

et cette propriété permet notamment de les isoler par rapport aux souches sauvages (Kahl *et al.*, 1998 ; Brouillette *et al.*, 2004). Proctor et collaborateurs (1995) ont suggéré que ces SCV pourraient jouer un rôle de réservoir pour la récurrence de la maladie. Des SCV ont, en effet, été isolées à partir de patients atteints de muscoviscidose et d'ostéomyélite chronique (Von Eiff *et al.*, 1997 ; Kahl *et al.*, 1998). Ces variants sont auxotrophes pour la menadione et l'hémine, qui sont des molécules requises pour la synthèse de composants impliqués dans la chaîne des électrons (Proctor *et al.*, 1994 ; 1995). Par conséquent, les SCV sont caractérisés par des déficiences au niveau de la chaîne des électrons, responsable de la production d'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP étant utilisé pour la plupart des réactions métaboliques, il paraît donc évident que les SCV paraissent plus petits et moins virulents que les souches sauvages. La petite taille des colonies serait associée à une faible biosynthèse de la paroi cellulaire, l'absence de pigmentation à une faible synthèse de pigments caroténoïdes, l'activité hémolytique faible à une diminution de la synthèse protéique, la persistance à l'intérieur des cellules-hôtes à une diminution de production d' α -toxine, etc.

Ces variants de *S. aureus* ont la propriété de pouvoir récupérer un phénotype sauvage. En effet, des expériences *in vitro* ont montré que l'ajout d'hémine ou de médianone (sous forme de vitamine K) dans le milieu de culture des cellules permet un retour du phénotype SCV au phénotype sauvage, caractérisé notamment par une croissance plus importante et une activité hémolytique plus élevée (Balwit *et al.*, 1994 ; Proctor *et al.*, 1994 ; 1995 ; Vesga *et al.*, 1996 ; Von Eiff *et al.*, 1997). Les SCV pourraient donc être associés aux infections chroniques et récurrentes généralement réfractaires aux traitements antibiotiques. Leur faible activité métabolique et leur résistance accrue aux antibiotiques leur permettrait de survivre à l'intérieur des cellules-hôtes et d'être éventuellement à la base de nouveaux cycles d'infection.

5. RÔLE DU SYSTÈME RÉGULATEUR AGR/SAR DANS

L'INVASION DE CELLULES NON-PHAGOCYTAIRES PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

5.1. Système régulateur *agr/sar* : généralités

Afin d'optimiser leur capacité à infecter de nombreuses niches tissulaires différentes et à proliférer de manière efficace, les bactéries Gram + ont développé, entre autres, un système régulateur de type « *quorum-sensing* », qui permet la communication de cellule à cellule, ainsi que la régulation de nombreux facteurs de colonisation et de virulence. Le « *quorum-sensing* » est le système par lequel une population de bactéries exprime, de manière coordonnée, un phénotype spécifique en réponse à une densité de population. En d'autres termes, ce système permet aux bactéries de détecter la densité cellulaire et, par conséquent, d'optimiser l'expression de fonctions qui sont d'autant plus bénéfiques lorsqu'elles sont stimulées par une large population de cellules. L'indicateur de la densité bactérienne est une molécule auto-inductrice, sécrétée par *S. aureus*. Lorsque la concentration de cette molécule atteint un seuil critique, une voie de transduction est activée et conduit à un changement de comportement de l'ensemble de la population bactérienne.

En phase exponentielle, les bactéries expriment essentiellement des protéines de surface (protéine A, FnBP...), alors qu'en phase post-exponentielle, lorsque la densité bactérienne est importante, ce sont principalement des protéines sécrétées et jouant un rôle généralement cytotylique (hémolysines, protéases, lipases...) qui sont exprimées.

Le système permettant de réguler ce type de comportement chez *S. aureus* dépend principalement du locus *agr* (Recsei *et al.*, 1986). Le système régulateur *agr* (Morfeldt *et al.*, 1988 ; Peng *et al.*, 1988 ; Novick *et al.*, 1993) implique une voie de transduction à deux composants, caractérisée par un récepteur et un régulateur de réponse. Le locus *agr* consiste en deux unités de transcription différentes, ARN II et ARN III, transcrits à partir des promoteurs P2 et P3, respectivement. ARN II code pour 4 protéines responsables du système de « *quorum-*

sensing », AgrA, AgrB, AgrC, et AgrD (Novick *et al.*, 1995). ARN III est la molécule effectrice qui présente un effet régulateur positif sur les protéines extracellulaires à fonction cytotylique, telles que l'hémolysine, et un effet régulateur négatif sur les protéines de surface, telles que la protéine A ou les FnBP (Novick *et al.*, 1993 ; Morfeldt *et al.*, 1995 ; Saravia-Otten *et al.*, 1997). La transcription d'ARN III est largement dépendante de l'activation des gènes (*agrA*, C, D, B) codant pour ARN II.

AgrC (protéine transmembranaire) et AgrA (protéine cytoplasmique) correspondent respectivement au récepteur (senseur) et au régulateur de la voie de transduction à 2 composants (Novick *et al.*, 1995 ; Morfeldt *et al.*, 1996). Cette voie est auto-induite par un octapeptide, qui est formé à partir d'une modification d'AgrD, via l'activité d'AgrB (Ji *et al.*, 1995 ; 1997). AgrB est une protéine transmembranaire, responsable la modification de la protéine AgrD en un octapeptide auto-inductible, et de la sécrétion de ce peptide auto-inductible (PAI) (Ji *et al.*, 1995 ; 1997).

Au cours d'une infection, plus la densité bactérienne va augmenter, plus la concentration en PAI va être élevée et, plus AgrA va être activé grâce à un processus de phosphorylation. En effet, le PAI sécrété se lie au domaine extracellulaire d'AgrC et induit un signal qui engendre l'auto-phosphorylation d'un résidu histidine du domaine cytoplasmique (Lina *et al.*, 1998). Ce groupement phosphate est transféré à l'AgrA, qui devient alors actif. Via un mécanisme encore peu connu, l'activité d'AgrA augmente fortement la transcription de P2 et P3. L'augmentation de la transcription de l'opéron P3 résulte en une augmentation des niveaux intracellulaires de ARN III. Or, ARN III code pour l'hémolysine γ et, induit l'augmentation de la transcription de toute une série de facteurs de virulence, incluant la toxine du syndrome du choc toxique, ainsi que d'autres hémolysines (Yarwood et Schlievert, 2003). Parallèlement, l'expression de plusieurs protéines de surface est réduite lorsque la concentration du PAI est élevée. Cette

coordination de l'expression des gènes de virulence peut être facilement associée au développement d'une infection. Au début, les staphylocoques, présents en faible quantité, expriment leurs protéines de surface de manière à se fixer aux tissus et, ainsi, à échapper au système immunitaire de l'hôte. Lorsque le site initial d'infection devient pauvre en nutriments, suite à l'accumulation d'un grand nombre de bactéries, celles-ci augmentent la production et la sécrétion des protéines à fonction cytotolytique afin de détruire les tissus environnants et, par conséquent, de proliférer dans l'organisme hôte.

Il est intéressant de noter que l'élément régulateur *sarA* est important pour l'activation du locus *agr* (Cheung *et al.*, 1992 ; Morfeldt *et al.*, 1996 ; Chien et Cheung, 1998). SarA agirait comme un facteur de transcription reconnaissant un site spécifique au sein des promoteurs P2 et P3 (Chien *et al.*, 1999).

L'importance du système *agr* a été confirmée au cours de plusieurs études *in vivo* qui démontraient que des mutants *agr* étaient nettement moins virulents dans de nombreux modèles d'infection, tels que les abcès sous-cutané (Bunce *et al.*, 1992), les infections mammaires (Foster *et al.*, 1990), les infections pulmonaires (Heyer *et al.*, 2002) et l'arthrite (Abdelnour *et al.*, 1993) chez la souris, et l'endocardite chez le lapin (Cheung *et al.*, 1994).

5.2. Système régulateur *agr/sar* : rôle dans l'invasion des cellules par *S. aureus*

Quelques études démontrent que le système régulateur *agr/sar* pourrait également jouer un rôle dans la pénétration de *S. aureus* à l'intérieur des cellules-hôtes. Wesson et collaborateurs (1998), en montrant que les mutants *agr* et/ou *sar* s'accumulaient dans les cellules-hôtes mais, qu'ils étaient cependant incapables de se répliquer à l'intérieur des cellules, ont suggéré que l'activation du locus *agr* ne serait pas indispensable à la pénétration de *S. aureus* mais, bien à sa prolifération intracellulaire. Qazi et collaborateurs (2001 ; 2004) confirment et complètent ces observations

en avançant que, non seulement, l'induction d'*agr* serait nécessaire à la réplication intracellulaire de la bactérie mais qu'elle serait également nécessaire et antérieure à l'évasion de *S. aureus* hors de l'endosome.

Un modèle basé sur l'implication de l'opéron *agr* a alors été proposé pour expliquer l'invasion des cellules non-phagocytaires par *S. aureus* (Wesson *et al.*, 1998). Au début de l'infection, les bactéries, encore extracellulaires, expriment surtout des facteurs d'adhésion cellulaire, tels que les FnBP. Wesson et collaborateurs (1998) émettent l'hypothèse qu'à ce stade de l'infection, le PAI, dilué dans les fluides extracellulaires de l'hôte et donc présent en concentration faible, favoriserait les bactéries à être dans un état physique optimal pour adhérer et éventuellement pénétrer à l'intérieur des cellules-hôtes. Une fois, la bactérie endocytée par la cellule eucaryote, *S. aureus* reste un certain temps logé dans une vacuole (Hudson *et al.*, 1995 ; Bayles *et al.*, 1998 ; Menzies et Kourteva, 1998). Par conséquent, dans un tel environnement confiné, le PAI pourrait s'accumuler et activer le système de régulation *agr*. L'expression des protéines se modifierait alors au profit des protéines extracellulaires, telles que les hémolysines, qui interviendraient dans la lyse de l'endosome et, par conséquent, dans la re-localisation de *S. aureus* dans le cytoplasme des cellules infectées. Wesson et collaborateurs (1998) terminent alors leur modèle en proposant 3 possibilités quant à la destinée de la bactérie : 1) soit, *S. aureus* exprimerait un facteur dépendant du système régulateur *agr* et capable d'induire l'apoptose des cellules infectées, ce qui mènerait à la formation de corps apoptotiques englobés par les macrophages ; 2) soit, le PAI, suite à la multiplication intracellulaire de *S. aureus*, atteindrait des concentrations suffisantes pour induire l'expression des protéines cytotolytiques et il en résulterait une lyse de la cellule-hôte, ainsi qu'une propagation de la bactérie aux cellules adjacentes et probablement une aggravation subséquente de la maladie ; 3) soit, des SCV se formeraient dans le cytoplasme de la cellule-hôte, et engendreraient une mala-

die persistante et chronique.

Récemment, une étude (Shompole *et al.*, 2003) a permis d'accumuler des données supplémentaires qui soutiennent en partie ce modèle et qui concluent que l'expression du régulateur *agr* de *S. aureus* est régulée dans le temps au cours de l'invasion des cellules épithéliales. Il a, en effet, été démontré que 1) l'augmentation de la transcription de l'ARN III coïncide avec les pics de transcription des hémolysines α et β et avec la diminution de l'expression de la protéine A, protéine connue pour être négativement régulée par l'ARN III (Cheung *et al.*, 1997) ; 2) que le premier pic d'expression de l'ARN III coïncide avec l'évasion de *S. aureus* hors de l'endosome (un mutant *agr* était incapable de quitter l'endosome) ; 3) que le second pic d'expression de l'ARN III coïncide avec l'apparition de dégradations de la membrane cytoplasmique des cellules MAC-T infectées. Dans un environnement intracellulaire restreint, les exoprotéines (hémolysines) régulées par le locus *agr* joueraient donc un rôle dans la lyse des membranes de l'endosome, résultant en l'évasion de la bactérie dans le cytoplasme.

En conclusion, le système régulateur *agr* permet de réguler les facteurs de virulence de *S. aureus*, de manière générale, pour initier une infection dans un organisme hôte mais, également, lors de l'invasion de la bactérie à l'intérieur des cellules-hôtes.

6. PERTINENCE DES OBSERVATIONS *IN VITRO* PAR RAPPORT AUX ÉTUDES *IN VIVO*

À ce jour, peu d'expériences *in vivo* démontrent l'invasion intracellulaire de *S. aureus*. Cependant, il a été démontré que *S. aureus* était capable de pénétrer à l'intérieur d'ostéoblastes de poulet embryonnaire (Hudson *et al.*, 1995 ; Reilly *et al.*, 2000), de neutrophiles murins (Gresham *et al.*, 2000) et bovins (Anderson et Chandler, 1975), de macrophages bovins (Craven et Anderson, 1984 ; Hébert *et al.*, 2000), de cellules alvéolaires bovines (Hébert *et al.*, 2000), et de cellules épithéliales mammaires murines (Chandler *et*

al., 1980 ; Brouillette *et al.*, 2003). Les stratégies destinées à empêcher ou guérir les maladies associées à *S. aureus* doivent donc non seulement inhiber la croissance de la bactérie au site de l'infection mais également inhiber la pénétration de la bactérie dans les cellules-hôtes. Par conséquent, il paraît primordial de connaître le rôle joué par les molécules d'adhésion, et plus particulièrement par les FnBP, dans le processus d'infection *in vivo*.

6.1. Rôle des fibronectin-binding proteins *in vivo*

Brouillette et collaborateurs (2003) ont montré, grâce à l'utilisation d'un modèle murin d'infection à *S. aureus*, que des mutants *S. aureus* FnBP étaient nettement visibles à l'intérieur de cellules épithéliales de glandes mammaires, mais que ces souches mutées FnBP montraient un retard d'invasion par rapport aux souches sauvages. Les FnBP ne seraient donc pas indispensables à la pénétration de *S. aureus* à l'intérieur des cellules épithéliales *in vivo*, mais seraient néanmoins importantes pour une efficacité optimale du processus d'invasion.

Cependant, au cours de la même étude, aucune différence en terme de virulence, n'a pu être observée entre les mutants FnBP et les souches sauvages. En effet, le nombre de colonies FnBP isolées à partir d'une glande infectée par un inoculum composé d'un mélange de souches mutées et sauvages (et non soumise à la traite), était équivalent au nombre de colonies formées par les souches sauvages (Brouillette *et al.*, 2003). En accord avec ces observations, les mutants FnBP, en comparaison avec des souches sauvages, ne montraient pas de différence concernant l'efficacité d'infection dans un modèle animal d'endocardite (Flock *et al.*, 1996), ainsi que dans un modèle animal de pneumonie (McElroy *et al.*, 2002). Ces résultats semblent donc suggérer que, malgré un rôle non négligeable des FnBP mis en évidence dans de nombreuses expériences *in vitro*, d'autres molécules bactériennes interviendraient pour la virulence et l'invasion de *S. aureus*, *in vivo*.

Pourtant, l'importance des FnBP dans

le processus d'invasion de *S. aureus* *in vivo* ne peut être exclu. Un problème majeur relatif à l'utilisation de ces souches *S. aureus* mutées FnBP est la difficulté à discerner la contribution d'un seul facteur de virulence alors que *S. aureus* possède une multitude de facteurs microbiens capables de contrecarrer la perte d'une propriété indispensable à sa prolifération.

Une étude récente a d'ailleurs développé une idée originale qui tend à montrer que les FnBP sont des facteurs de virulence majeurs (Que *et al.*, 2001). Le gène FnBPA de *S. aureus* a été transféré dans une souche bactérienne peu pathogène, *Lactococcus lactis*, et la fonction ainsi conférée a été testée dans un modèle expérimental d'endocardite. Il a été démontré que la souche recombinante était plus virulente pour induire l'endocardite chez le rat que la souche sauvage (Que *et al.*, 2001).

Des expériences de vaccination confirment également l'importance des FnBP de *S. aureus* dans l'infection *in vivo*. Il a notamment été démontré que l'injection intramusculaire d'une protéine recombinante rFnBP, capable d'empêcher l'entrée de *S. aureus* à l'intérieur de cellules-hôtes *in vitro*, prévient la formation d'abcès liée à l'infection d'une blessure, dans un modèle animal expérimental (Menziez *et al.*, 2002). De même, des rats immunisés par l'injection d'une protéine recombinante (gal-FnBP), puis infectés par *S. aureus*, développaient une endocardite moins virulente que des rats non-immunisés (Schennings *et al.*, 1993). Enfin, l'opsonisation de la bactérie par des anticorps dirigés spécifiquement contre les FnBP, réduisait de manière significative l'infection due à *S. aureus* (Rozalska et Wadström, 1993 ; Mamo *et al.*, 1994). L'ensemble de ces résultats suggère que les FnBP, bien que non-indispensable au développement d'une infection par *S. aureus*, jouent un rôle majeur dans le processus d'invasion de *S. aureus* *in vivo*.

6.2. Rôle des intégrines $\alpha_5\beta_1$ *in vivo*

Le rôle des intégrines n'a pas encore été confirmé dans des expériences *in*

vivo. Il serait par exemple intéressant de démontrer que des souris traitées à l'aide d'anticorps anti-intégrine $\alpha_5\beta_1$ sont moins sensibles à l'infection de *S. aureus* ou que des micro-environnements favorisant la présence d'intégrines $\alpha_5\beta_1$, l'expression de la fibronectine, ou l'accessibilité de celle-ci soient favorables à l'infection par *S. aureus*.

7. CONCLUSION

La pathogénèse associée à *S. aureus* est très complexe. L'effet de l'invasion de cette bactérie à l'intérieur de cellules non-phagocytaires peut être variable selon le modèle d'infection utilisé. Des résultats différents peuvent être obtenus selon la souche bactérienne considérée, l'animal utilisé, le mode d'administration de l'inoculum, le type cellulaire étudiée, etc. Il est donc indispensable pour une meilleure compréhension des mécanismes d'invasion développés par *S. aureus* de continuer à combiner les expériences *in vitro* et *in vivo*.

De plus, de nombreuses questions restent sans réponse. Par exemple, on ne sait toujours pas si l'apoptose des cellules observée après la pénétration de *S. aureus* est un mécanisme de défense de l'hôte pour éviter la propagation de l'agent pathogène ou un mécanisme développé par la bactérie pour se disséminer. On ne connaît toujours pas, non plus, le rôle exact de l'invasion intracellulaire dans le développement d'une infection à *S. aureus*, *in vivo*, ni le rôle des FnBP dans le processus de pénétration de la bactérie à l'intérieur des cellules-hôtes.

Afin d'élargir le débat, il est intéressant de relever certaines études complémentaires qui proposent un tout autre point de vue quant à l'endocytose de *S. aureus* par les cellules non-phagocytaires. Elles suggèrent que certaines cellules non-phagocytaires, notamment les cellules épithéliales du colon, pourraient agir comme des granulocytes en tuant des bactéries endocytées grâce à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Deitch *et al.*, 1995). Ce processus serait alors un mécanisme

immunitaire de l'hôte dans lequel la fibronectine jouerait le rôle d'opsonine, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, le rôle de récepteur phagocytaire et NOH-1 (une NADPH oxydase) le rôle d'effecteur bactéricide (Deitch *et al.*, 1995 ; Suh *et al.*, 1999 ; Banfi *et al.*, 2000).

En conclusion, il est fondamental de poursuivre les recherches et de continuer à combiner les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* afin de mieux comprendre les mécanismes d'invasion développés par *S. aureus* et, peut-être, de répondre à la question fondamentale suivante : « quelle est l'importance réelle de l'invasion de cellules non-phagocytaires par *S. aureus* dans la pathogénèse ? ».

ABSTRACT

Intracellular invasion of *Staphylococcus aureus* in nonphagocytic cells

Staphylococcus aureus often causes chronic diseases. It is now believed that recurrence of these infections could be related to the ability of *S. aureus* to invade and persist within nonphagocytic cells. Adherence to eucaryotic cells is crucial for *S. aureus* to invade and persist within invasion and depends on interactions between bacterial fibronectin-binding proteins, fibronectin and the host cell fibronectin receptor, integrin $\alpha_5\beta_1$. It is currently established that fibronectin acts as a bridging molecule. Penetration of

S. aureus in host cells requires also activation of protein tyrosine kinases that mediate signal transduction and actin polymerization leading to cytoskeletal rearrangements. After internalization, *S. aureus* either remains in membrane-bound vacuoles or appears free in the cytoplasm. After bacterial proliferation, *S. aureus* induces host cell apoptosis or persist inside cells as small colony variants, which represent a less virulent subpopulation of *S. aureus* that grows slower. Although numerous *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the ability of *S. aureus* to invade nonphagocytic cells, additional experiments have to be realized to understand the relevance of intracellular localization *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDELNOUR A., ARVIDSON S., BREMELL T., RYDEN C., TARKOWSKI A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 3879-3885.
- AGERER F., MICHEL A., OHLSEN K., HAUCK C.R. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 42524-42531.
- ALEXANDER E.H., HUDSON M.C. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 361-366.
- ALMEIDA R.A., MATTHEWS K.R., CIFRIAN E., GUIDRY A.J., OLIVER S.P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.*, 1996, **79**, 1021-1026.
- ANDERSON J.C., CHANDLER R.L. Experimental Staphylococcal mastitis in the mouse. Histological, ultrastructural and bacteriological changes caused by a virulent strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Comp. Pathol.*, 1975, **85**, 499-510.
- ASHKENAZI A., DIXIT V.M. Death receptors : signaling and modulation. *Science*, 1998, **281**, 1305-1308.
- BALWIT J.M., VAN LANGEVELDE P., VANN J.M., PROCTOR R.A. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J. Infect. Dis.*, 1994, **170**, 1033-1037.
- BANFI B., MATURANA A., JACONI S., ARNAUDEAU S., LAFORGE T., SINHA B., LIGETI E., DEMAUREX N., KRAUSE K.-H. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog *NOH-1*. *Science*, 2000, **287**, 138-142.
- BAYLES K.W., WESSON C.A., LIU L.E., FOX L.K., BOHACH G.A., TRUMBLE W.R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 336-342.
- BROUILLETTE E., GRONDIN G., SHKRETA L., LACASSE P., TALBOT B.G. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathog.*, 2003, **35**, 159-168.
- BROUILLETTE E., MARTINEZ A., BOYLL B.J., ALLEN N.E., MALOUIN F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure *in vivo*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004, **41**, 35-41.
- BUNCE C., WHEELER L., REED G., MUSSER J., BARG N. Murine model of cutaneous infection

- with gram-positive cocci. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 2636-2640.
- CHANDLER R.L., SMITH K., TURFREY B.A. Studies on the phagocytic potential of secretory epithelial cells in experimental mastitis. *J. Comp. Pathol.*, 1980, **90**, 385-394.
- CHEUNG A.L., COOMEY J.M., BUTLER C.A., PROJAN S.J., FISCHETTI V.A. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 6462-6466.
- CHEUNG A.L., EBERHARDT K.J., CHUNG E., YEAMAN M.R., SULLAM P.M., RAMOS M., BAYER A.S. Diminished virulence of a *sar*-*agr*- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J. Clin. Invest.*, 1994, **94**, 1815-1822.
- CHEUNG A.L., EBERHARDT K., HEINRICHS J.H. Regulation of protein A synthesis by the *sar* and *agr* loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 2243-2249.
- CHIEN Y., CHEUNG A.L. Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 2645-2652.
- CHIEN Y., MANNA A.C., PROJAN S.J., CHEUNG A.L. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 37169-37176.
- CLEMENTS M.O., WATSON S.P., FOSTER S.J. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J. Bacteriol.*, 1999, **181**, 3898-3903.
- CRAVEN N., ANDERSON J.-C. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. *J. Dairy Res.*, 1984, **4**, 513-523.
- DEITCH E.A., HASKEL Y., CRUZ N., XU D., KVIETYS P.R. Caco-2 and IEC-18 intestinal epithelial cells exert bactericidal activity through an oxidant-dependent pathway. *Shock*, 1995, **4**, 345-350.
- DZIEWANOWSKA K., PATTI J.M., DEOBALD C.F., BAYLES K.W., TRUMBLE W.R., BOHACH G.A. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 4673-4678.
- DZIEWANOWSKA K., CARSON A.R., PATTI J.M., DEOBALD C.F., BAYLES K.W., BOHACH G.A. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 6321-6328.
- ELLINGTON J.K., REILLY S.S., RAMP W.K., SMELTZER M.S., KELLAM J.F., HUDSON M.C. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.*, 1999, **26**, 317-323.
- ELLINGTON J.K., ELHOFYA., BOST K.L., HUDSON M.C. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in *Staphylococcus aureus* invasion of normal osteoblasts. *Infect Immun.* 2001, **9**, 5235-5242.
- FERENS W.A., BOHACH G.A. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 2000, **135**, 225-230.
- FINLAY B.B., COSSART P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*, 1997, **276**, 718-725.
- FLOCK J.-I., HIENZ S.A., HEIMDAHL A., SCHENNINGS T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 1876-1878.
- FOSTER T.J., O'REILLY M., PHONIMDAENG P., COONEY J., PATEL A.H., BRAMLEY A.J. Genetic studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: properties of coagulase and gamma-toxin, alpha-toxin, beta-toxin and protein A in the pathogenesis of *S. aureus* infections. In: Novick R.P. (Eds.), *Molecular biology of the Staphylococci*. VCH Publishers: New York, 1990, 403-420.
- FOWLER T., WANN E.R., JOH D., JOHANSSON S., FOSTER T.J., HÖÖK M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell. Biol.*, 2000, **79**, 672-679.
- FOWLER T., JOHANSSON S., WARY K.K., HOOK M. Src kinase has a central role in *in vitro* cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Microbiol.*, 2003, **5**, 417-426.
- FROMAN G., SWITALSKI L.M., SPEZIALE P., HOOK M. Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 1987, **14**, 6564-6571.
- GRESHAM H.D., LOWRANCE J.H., CAVER T.E., WILSON B.S., CHEUNG A.L., LINDBERG F.P. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 3713-3722.
- HAGGAR A., HUSSAIN M., LÖNNIES H., HERRMANN M., NORRBY-TEGLUND A., FLOCK J.-I. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 2310-2317.
- HAMILL R.J., VANN J.M., PROCTOR R.A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.*, 1986, **54**, 833-836.
- HAUCK C.R. Cell adhesion receptors-signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, 2002, **191**, 55-62.
- HEBERT A., SAYASITH K., SENECHAL S., DUBREUIL P., LAGACE J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **1**, 57-62.

- HEYER G., SABA S., ADAMO R., RUSH W., SOONG G., CHEUNG A., PRINCE A. *Staphylococcus aureus* agr and sarA functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 127-133.
- HORWITZ A., DUGGAN K., BUCK C., BECKERLE M.C., BURRIDGE K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. *Nature*, 1986, **320**, 531-533.
- HUDSON M.C., RAMP W.K., NICHOLSON N.C., WILLIAMS A.S., NOUSIAINEN M.T. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.*, 1995, **19**, 409-419.
- HUFF S., MATSUKA Y.V., MCGAVIN M.J., INGHAM K.C. Interaction of N-terminal fragments of fibronectin with synthetic and recombinant D motifs from its binding protein on *Staphylococcus aureus* studied using fluorescence anisotropy. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 15563-15570.
- HUGHES P.E., PFAFF M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.*, 1998, **8**, 359-364.
- HUMPHRIES M.J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, **28**, 311-39.
- HYNES R.O. Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell*, 1987, **48**, 549-554.
- HYNES R.O. Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, **69**, 11-25.
- ISBERG R.R., FALKOW S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature*, 1985, **317**, 262-264.
- ISBERG R.R. Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol. Biol. Med.*, 1990, **7**, 73-82.
- ISBERG R.R., LEONG J.M. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, 1990, **60**, 861-871.
- JETT B.D., GILMORE M.S. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells : role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 4697-4700.
- JEVON M., GUO C., MA B., MORDAN N., NAIR S.P., HARRIS M., HENDERSON B., BENTLEY G., MEGHJI S. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 2677-2681.
- JI G., BEAVIS R.C., NOVICK R.P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 12055-12059.
- JI G., BEAVIS R., NOVICK R.P. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, 1997, **276**, 2027-2030.
- JÖNSSON K., SIGNÄS C., MÜLLER H.-P., LINDBERG M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus* : the complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem.*, 1991, **202**, 1041-1048.
- KAHL B., HERRMANN M., EVERDING A.S., KOCH H.G., BECKER K., HARMS E., PROCTOR R.A., PETERS G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.*, 1998, **177**, 1023-1029.
- KAHL B.C., GOULIAN M., VAN WAMEL W., HERRMANN M., SIMON S.M., KAPLAN G., PETERS G., CHEUNG A.L. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 5385-5392.
- KARAVOLOS M.H., HORSBURGH M.J., INGHAM E., FOSTER S.J. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2003, **149**, 2749-2758.
- KIDD V.J. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, **60**, 533-573.
- KINTARAK S., WHAWELL S.A., SPEIGHT P.M., PACKER S., NAIR S.P. Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 5668-5675.
- KUUSELA P., VARTIO T., VUENTO M., MYHRE E.B. Binding sites for streptococci and staphylococci in fibronectin. *Infect. Immun.*, 1984, **45**, 433-436.
- LAMMERS A., NUIJTEN P.J., SMITH H.E. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, **180**, 103-109.
- LINA G., JARRAUD S., JI G., GREENLAND T., PEDRAZA A., ETIENNE J., NOVICK R.P., VANDENESCH F. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 1998, **28**, 655-662.
- LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKY L., MATSUDAIRA P., DARNELL J. Biologie moléculaire de la cellule. DeBoeck Université : Bruxelles, 1997, 1344 p.
- LOWY F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339**, 520-532.
- MAMO W., JONSSON P., FLOCK J.I., LINDBERG M., MÜLLER H.-P., WADSTRÖM T., NELSON L. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis : immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine*, 1994, **12**, 988-992.
- MASSEY R.C., KANTZANOU M.N., FOWLER T., DAY N.P., SCHOFIELD K., WANN E.R., BERENDT A.R., HÖÖK M., PEACOCK S.J. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell. Microbiol.*, 2001, **3**, 839-851.

- MAXE I., RYDÉN C., WADSTRÖM T., RUBIN K. Specific attachment of *Staphylococcus aureus* to immobilized fibronectin. *Infect. Immun.*, 1986, **54**, 695-704.
- MCELROY M.C., CAIN D.J., TYRRELL C., FOSTER T.J., HASLETT C. Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of *Staphylococcus aureus* in a rat model of pneumonia. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 3865-3873.
- MEMPEL M., SCHNOPP C., HOJKA M., FESQ H., WEIDINGER S., SCHALLER M., KORTING H.C., RING J., ABECK D. Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br. J. Dermatol.*, 2002, **146**, 943-951.
- MENZIES B.E., KOURTEVA I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 5994-5998.
- MENZIES B.E., KOURTEVA Y., KAISER A.B., KERNODLE D.S. Inhibition of staphylococcal wound infection and potentiation of antibiotic prophylaxis by a recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 2002, **185**, 937-943.
- MILLER R.A., BRITIGAN B.E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, **10**, 1-18.
- MIYAMOTO S., TERAMOTO H., COSO O.A., GUTKIND J.S., BURBELO P.D., AKIYAMA S.K., YAMADA K.M. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell. Biol.*, 1995, **131**, 791-805.
- MORFELDT E., JANZON L., ARVIDSON S., LOFDAHL S. Cloning of a chromosomal locus (exp) which regulates the expression of several exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, **211**, 435-440.
- MORFELDT E., TAYLOR D., VON GABAIN A., ARVIDSON S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.*, 1995, **14**, 4569-4577.
- MORFELDT E., TEGMARK K., ARVIDSON S. Transcriptional control of the agr-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 1996, **21**, 1227-1237.
- MOSHER D.F., PROCTOR R.A. Binding and factor XIII_a-mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science*, 1980, **209**, 927-929.
- NOVICK R.P., ROSS H.F., PROJAN S.J., KORNBLUM J., KREISWIRTH B., MOGHAZEH S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.*, 1993, **12**, 3967-3975.
- NOVICK R.P., PROJAN S.J., KORNBLUM J., ROSS H.F., JI G., KREISWIRTH B., VANDENESCH F., MOGHAZEH S. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.*, 1995, **248**, 446-458.
- OGAWA S.K., YURBERG E.R., HATCHER V.B., LEVITT M.A., LOWY F.D. Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.*, 1985, **50**, 218-224.
- OTEY C.A., PAVALKO F.M., BURRIDGE K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit *in vitro*. *J. Cell. Biol.*, 1990, **111**, 721-729.
- OZERI V., ROSENSHINE I., MOSHER D.F., FÄSSLER R., HANSKI E. Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol. Microbiol.*, 1998, **30**, 625-637.
- OZERI V., ROSENSHINE I., BEN-ZE'EV A., BOKOCH G.M., JOU T.S., HANSKI E. *De novo* formation of focal complex-like structures in host cells by invading Streptococci. *Mol. Microbiol.*, 2001, **41**, 561-573.
- PALMA M., HAGGAR A., FLOCK J.I. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.*, 1999, **9**, 2840-2845.
- PATTI J.M., ALLEN B.L., MCGAVIN M.J., HÖÖK M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994, **48**, 585-617.
- PEACOCK S.J., FOSTER T.J., CAMERON B.J., BERENDT A.R. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology*, 1999, **145**, 3477-3486.
- PEACOCK S.J., DAY N.P.J., THOMAS M.G., BERENDT A.R., FOSTER T.J. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J. Infect.*, 2000, **41**, 23-31.
- PENG H.L., NOVICK R.P., KREISWIRTH B., KORNBLUM J., SCHLIEVERT P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 1988, **170**, 4365-4372.
- PEPE J.C., MILLER V.L. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 6473-6477.
- PIERSCHBACHER M.D., RUOSLAHTI E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 1984a, **309**, 30-33.
- PIERSCHBACHER M.D., RUOSLAHTI E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984b, **19**, 5985-5988.
- PROCTOR R.A., PRENDERGASTE., MOSHER D.F. Fibronectin mediates attachment of *Staphylococcus aureus* to human neutrophils. *Blood*, 1982, **59**, 681-687.
- PROCTOR R.A., CHRISTMAN G., MOSHER D.F. Fibronectin-induced agglutination of

- Staphylococcus aureus* correlates with invasiveness. *J. Lab. Clin. Med.*, 1984, **104**, 455-469.
- PROCTOR R.A., BALWIT J.M., VESGA O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect. Agents Dis.*, 1994, **3**, 302-312.
- PROCTOR R.A., VAN LANGEVELDE P., KRISTJANSSON M., MASLOW J.N., ARBEIT R.D. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, **20**, 95-102.
- QAZI S.N.A., COUNIL E., MORRISSEY J., REES C.E.D., COCKAYNE A., WINZER K., CHAN W.C., WILLIAMS P., HILL P.J. agr Expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 7074-7082.
- QAZI S.N.A., HARRISON S.E., SELF T., WILLIAMS P., HILL P.J. Real-time monitoring of intracellular *Staphylococcus aureus* replication. *J. Bacteriol.*, 2004, **186**, 1065-1077.
- QUIE P.G. Microcolonies (G-variants) of *Staphylococcus aureus*. *Yale J. Biol. Med.*, 1969, **41**, 394-403.
- QUE Y.-A., FRANÇOIS P., HAEFLIGER J.-A., ENTENZA J.-M., VAUDAUX P., MOREILLON P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun.*, 2001, **69**, 6296-6302.
- RECSEI P, KREISWIRTH B, O'REILLY M, SCHLIEVERT P, GRUSS A, NOVICK RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol. Gen. Genet.*, 1986, **202**, 58-61.
- REILLY S.S., HUDSON M.C., KELLAM J.F., RAMP W.K. *In vivo* internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone*, 2000, **26**, 63-70.
- ROHDE M., MÜLLER E., CHHATWAL G.S., TALAY S.R. Host cell caveolae act as an entry-point for group A streptococci. *Cell Microbiol.*, 2003, **5**, 323-342.
- ROZALSKA B., WADSTRÖM T. Protective opsonic activity of antibodies against fibronectin-binding proteins (FnBPs) of *Staphylococcus aureus*. *Scand. J. Immunol.*, 1993, **37**, 575-580.
- SARAVIA-OTTEN P., MULLER H.P., ARVIDSON S. Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. *J. Bacteriol.*, 1997, **179**, 5259-5263.
- SCHALLER M.D., BORGMAN C.A., COBB B.S., VINES R.R., REYNOLDS A.B., PARSONS J.T. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, **89**, 5192-5196.
- SCHLAEPFER D.D., HAUCK C.R., SIEG D.J. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1999, **71**, 435-478.
- SCHENNINGS T., HEIMDAHL A., COSTER K., FLOCK J.I. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microb. Pathog.*, 1993, **15**, 227-236.
- SCHNEEWIND O., FOWLER A., FAULL K.F. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science*, 1995, **268**, 103-106.
- SEARS P.M., MCCARTHY K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2003, **19**, 171-185.
- SHOMPOLE S., HENON K.T., LIOU L.E., DZIEWANOWSKA K., BOHACH G.A., BAYLES K.W. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol. Microbiol.*, 2003, **49**, 919-927.
- SIELING P.A., ABRAMS J.S., YAMAMURA M., SALGAME P., BLOOMBERG R., REATH H., MODLIN R.L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection : *in vitro* modulation of T cell responses in leprosy. *J. Immunol.*, 1993, **150**, 5501-5510.
- SIGNÄS C., RAUCCI G., JÖNSSON K., LINDGREN P.-E., ANANTHARAMAIAH G.M., HÖÖK M., LINDBERG M. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* : use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, **86**, 699-703.
- SINHA B., FRANÇOIS P.P., NÜSSE O., FOTI M., HARTFORD O.M., VAUDAUX P., FOSTER T.J., LEW D.P., HERRMANN M., KRAUSE K.-H. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell. Microbiol.*, 1999, **1**, 101-117.
- SINHA B., FRANÇOIS P., QUE Y.-A., HUSSAIN M., HEILMANN C., MOREILLON P., LEW D., KRAUSE K.-H., PETERS G., HERRMANN M. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 6871-6878.
- SUH Y.A., ARNOLD R.S., LASSEGUE B., SHI J., XU X., SORESCU D., CHUNG A.B., GRIENGLING K.K., LAMBETH J.D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999, **401**, 79-82.
- SUTRA L., POUTREL B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994, **40**, 79-89.
- THORNBERRY N.A., LAZEBNIK Y. Caspases : enemies within. *Science*, 1998, **281**, 1312-1316.
- TON-THAT H., FAULL K.F., SCHNEEWIND O. Anchor structure of staphylococcal surface proteins. A branched peptide that links the carboxyl terminus of proteins to the cell wall. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 22285-22292.

- TUCKER K.A., REILLY S.S., LESLIE C.S., HUDSON M.C. Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **186**, 151-156.
- USUI A., MURAI M., SEKI K., SAKURADA J., MASUDA S. Conspicuous ingestion of *Staphylococcus aureus* organisms by murine fibroblasts in vitro. *Microbiol. Immunol.*, 1992, **36**, 545-550.
- VAN DE WATER L., DESTREE A.T., HYNES R.O. Fibronectin binds to some bacteria but does not promote their uptake by phagocytic cells. *Science*, 1983, **220**, 201-204.
- VAN NHIEU G.T., ISBERG R.R. The *Yersinia pseudotuberculosis* invasion protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 24367-24375.
- VAN NHIEU G.T., ISBERG R.R. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J.*, 1993, **5**, 1887-1895.
- VANN J.M., PROCTOR R.A. Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect. Immun.*, 1987, **55**, 2155-2163.
- VERBRUGH H.A., PETERSON P.K., SMITH D.E., NGUYEN B.-Y.T., HOIDAL J.R., WILKINSON B.J., VERHOEF J., FURCHT L.T. Human fibronectin binding to staphylococcal surface protein and its relative inefficiency in promoting phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and alveolar macrophages. *Infect. Immun.*, 1981, **33**, 811-819.
- VESGA O., GROESCHEL M.C., OTTEN M.F., BRAR D.W., VANN J.M., PROCTOR R.A. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J. Infect. Dis.*, 1996, **173**, 739-742.
- VONEIFF C., BETTIN D., PROCTOR R.A., ROLAUFFS B., LINDNER N., WINKELMANN W., PETERS G. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin. Infect. Dis.*, 1997, **25**, 1250-1251.
- WESSON C.A., LIOU L.E., TODD K.M., BOHACH G.A., TRUMBLE W.R., BAYLES K.W. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.*, 1998, **11**, 5238-43.
- WESSON C.A., DERINGER J., LIOU L.E., BAYLES K.W., BOHACH G.A., TRUMBLE W.R. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 2998-3001.
- YAMADA K.M. Fibronectins : structure, functions and receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1989, **1**, 956-996.
- YARWOOD J.M., SCHLIEVERT P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.*, 2003, **112**, 1620-1625.