

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interregional
le 12 avril 2013

par Mr AUBIN Guillaume

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 6 mai 1987 tient lieu de :

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Analyses génotypiques et phénotypiques
de souches de *Staphylococcus aureus* responsables
d'infections ostéo-articulaires sur matériel

Président :

Monsieur le Pr. Alain REYNAUD, Professeur de Bactériologie
Faculté de Pharmacie – Nantes

Membres du jury :

Monsieur le Pr. David BOUTOILLE, Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales
Faculté de Médecine – Nantes

Monsieur le Pr. François GOUIN, Professeur de Chirurgie Orthopédique
Faculté de Médecine – Nantes

Monsieur le Pr. Didier LEPELLETIER, Professeur d'Hygiène Hospitalière
Faculté de Médecine – Nantes

Monsieur le Dr. Stéphane CORVEC, Maître de conférences de Bactériologie
Faculté de Médecine – Nantes (Directeur de Thèse)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ANNEXES	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
Introduction	9
1^{ère} partie : Revue bibliographique	11
I Les infections ostéo-articulaires d'origine bactérienne.....	12
I.1 Physiopathologie.....	12
a Portes d'entrée.....	12
b Physiopathologie de l'infection osseuse.....	13
c Site de l'infection	15
d Facteurs favorisants.....	16
d.i Facteurs de l'hôte	16
d.ii Facteurs bactériens	17
d.iii La réponse immunitaire de l'hôte	18
I.2 Les différents types d'infections ostéo-articulaires.....	18
a Les infections primitives	18
a.i Arthrite septique	18
a.ii Ostéomyélite infectieuse	20
a.iii Spondylodiscite infectieuse	22
b Les ostéites secondaires	23
b.i Ostéite.....	24
b.ii Ostéite du pied chez le diabétique	25
b.iii Infections ostéo-articulaires sur matériel.....	26
II Les infections ostéo-articulaires complexes (I.O.A.C.).....	27
II.1 Définition.....	27
II.2 Epidémiologie.....	27
II.3 Impact sociétal	28
II.4 Diagnostic des I.O.A.M.	29
a Arguments cliniques.....	29
b Arguments anatomopathologiques	29

c	Arguments microbiologiques	30
II.5	Physiopathologie des infections sur prothèse	30
a	Infections péri-opératoires.....	30
b	Infections d'origine hémotogène	30
c	Rôle du portage nasal de <i>S. aureus</i> dans les infections ostéo-articulaires sur prothèse.....	31
II.6	Classification des infections ostéo-articulaires sur prothèse	31
a	Infections précoces et retardées.....	32
b	Infections tardives	32
III	<i>Staphylococcus aureus</i>	33
III.1	Généralités	33
III.2	La capsule et la paroi de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
III.3	Les protéines d'adhérence exprimées à la surface de <i>S. aureus</i>	35
a	La protéine de liaison au collagène : Cna.....	36
b	Les protéines de liaison à la fibronectine A et B : FnBPA/FnBPB	36
c	La protéine A : SpA	37
d	Les protéines de liaison au fibrinogène : ClfA et ClfB	37
e	Les protéines "Serine-aspartate dipeptide repeat" : Sdr	38
f	Bone sialoprotein-binding protein : Bbp	38
III.4	Les protéines sécrétées par <i>Staphylococcus aureus</i>	39
a	Les sidérophores du système Isd	39
b	La leucocidine de Panton et Valentine	39
c	Entérotoxines, TSST-1 (toxine du choc staphylococcique) et exfoliatines	39
III.5	Le gène régulateur accessoire <i>agr</i>	40
IV	Gènes impliqués dans la formation du biofilm chez <i>Staphylococcus aureus</i>	41
IV.1	Généralités	41
IV.2	Formation du biofilm.....	41
IV.3	Rôle du locus <i>agr</i>	43
IV.4	Autres gènes impliqués.....	43
2^{ème}	partie : Etude expérimentale.....	46
I	Introduction	47
II	Matériel et méthodes	48
II.1	Caractéristiques des souches de <i>S. aureus</i> sélectionnées pour l'étude	48
a	Souches de <i>S. aureus</i> responsables d'I.O.A. sur matériel.....	48
b	Souches de <i>S. aureus</i> responsables de portage nasal	48

II.2	Extraction de l'ADN.....	49
a	Extraction de l'ADN génomique pour les réactions de PCR	49
b	Extraction de l'ADN génomique pour l'analyse sur puces à ADN.....	49
c	Dosage de l'ADN.....	49
II.3	Génotypage.....	49
a	Electrophorèse en champs pulsés (P.F.G.E).....	49
b	Multi Locus Sequence Typing (M.L.S.T.)	50
c	Puces à ADN Alere	50
II.4	Analyse phénotypique : étude de la formation du biofilm.....	52
a	Technique à la résazurine	52
b	Technique au Crystal violet.....	53
c	Interprétation des résultats	54
d	Biofilm Ring Test®	54
II.5	Inactivation du gène de la bone-binding sialoprotein <i>bbp</i>	55
a	Sélection d'un isolat clinique transformable	55
b	Construction du plasmide pMAD: Δ bbp.....	55
c	Electroporation du plasmide et inactivation du gène <i>bbp</i>	57
III	Résultats	59
III.1	Caractéristiques cliniques et paracliniques des infections	59
III.2	Typage moléculaire	62
a	Electrophorèse en champs pulsés	62
b	Multilocus-Locus Sequence Typing.....	62
III.3	Etude de la production de biofilm	65
III.4	Génotypage.....	67
III.5	Recombinaison homologue	71
a	Sélection d'isolats cliniques transformables	71
b	Construction du vecteur plasmidique pMAD.....	72
IV	Discussion.....	73
V	Conclusion - Perspectives	80
	Bibliographie.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Coupe sagittale d'un os long.	13
Figure 2 : Evolution d'une ostéomyélite aiguë (9)	14
Figure 3 : Evolution d'une ostéomyélite chronique (11)	15
Figure 4 : Anatomie vasculaire des grosses articulations de l'enfant (25)	21
Figure 5 : Vue sagittale à l'IRM montrant une destruction du plateau vertébral lié à un abcès épidual causé par <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (26)	22
Figure 6 : Microbiologie des différents types d'infections ostéo-articulaires (11)	24
Figure 7 : Evolution du nombre de poses et de révisions de prothèse totale de hanche et de genou aux Etats-Unis entre 2005 et 2030 (2)	28
Figure 8 : <i>Staphylococcus aureus</i> en microscopie optique et microscopie électronique	33
Figure 9 : Structure de la paroi de <i>Staphylococcus aureus</i> (52)	35
Figure 10 : Structure des MSCRAMMs chez <i>Staphylococcus aureus</i> (20)	36
Figure 11 : Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction de la densité bactérienne (55)	40
Figure 12 : Le cycle de développement du biofilm bactérien (74)	42
Figure 13 : Processus à l'origine de l'adhérence et de la fixation des bactéries à la surface d'un biomatériau (61)	44
Figure 14 : Procédure de dépistage du portage nasal de <i>Staphylococcus aureus</i> en application au C.H.U. de Nantes	48
Figure 15 : Principe et description de la puce à ADN Alere pour le génotypage de <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Figure 16 : Carte du plasmide pMAD (103)	56
Figure 17 : Représentation schématique du phénomène de recombinaison homologue	57
Figure 18 : Stratégie utilisée pour inactiver le gène <i>bbp</i> chez <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220 et chez les isolats cliniques (104)	58
Figure 19 : Représentation graphique de la répartition des âges de la population étudiée.	59
Figure 20 : Répartition graphique des indications de pose de matériel	60
Figure 21 : Représentation graphique des signes locaux conduisant au diagnostic d'infection ostéo-articulaire.	60

Figure 22 : Représentation graphique de la prise en charge chirurgicale des I.O.A.M. à <i>S. aureus</i>	60
Figure 23 : Dendrogramme des pulsotypes des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> responsables d'I.O.A. sur matériel.....	63
Figure 24 : Dendrogrammes des pulsotypes des <i>Staphylococcus aureus</i> colonisants et appartenant au CC398.....	64
Figure 25 : Comparaison des résultats obtenus avec deux techniques d'évaluation de la production de biofilm (résazurine et crystal violet) sur une sélection de souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	65
Figure 26 : Cinétique d'apparition d'un biofilm sur une sélection de souches de <i>Staphylococcus aureus</i> responsables d'infection ostéo-articulaire sur matériel (technique Biofilm Ring test®).....	66
Figure 27 : Production de biofilm (résazurine) chez les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> ..	69
Figure 28 : Acquisition de la résistance au chloramphénicol des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220 et n°2 de notre série, après électroporation du plasmide pRMC2	71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales bactéries impliquées dans les arthrites septiques (23).....	19
Tableau II : Principales bactéries impliquées dans les spondylodiscites (26).....	23
Tableau III : Classification des infections ostéo-articulaires sur prothèse (51).....	32
Tableau IV : Principales protéines de surface de <i>Staphylococcus aureus</i> (20).....	38
Tableau V : Principales protéines sécrétées par <i>Staphylococcus aureus</i> (67).....	39
Tableau VI : Comparaison des différentes techniques de mise en évidence du biofilm bactérien, à l'aide de la résazurine.	53
Tableau VII : Tableau synoptique des caractéristiques génétiques, phénotypiques et cliniques des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> infectantes et colonisantes.	61
Tableau VIII : Comparaison des profils génotypiques des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> responsables d'infection ostéo-articulaire sur matériel (I.O.A.M.) ou de portage nasal.	68
Tableau IX : Analyse génotypique des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> infectants. Comparaison du patrimoine génétique entre les isolats de <i>S. aureus</i> appartenant au complexe clonal (CC) 8 et les autres.	70

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Position des amorces dans la PCR Bbp	94
-------------------------------------------------------	----

LISTE DES ABREVIATIONS

AIP	Peptide cyclique autoinducteur
BCC	Bouillon Cœur Cervelle
Bbp	Bone-binding sialoprotein
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Cna	Protéine de liaison au collagène
CRIOGO	Centre de Référence Interrégional pour la prise en charge des Infections ostéo-articulaires du Grand Ouest
EDS	Eau Distillée Stérile
FnBPs	Protéines liant la fibronectine
Ig	Immunoglobuline(s)
IOA	Infections Ostéo-Articulaires
IOAC	Infections Ostéo-Articulaires Complexes
IOAM	Infections Ostéo-Articulaires sur Matériel
Isd	Iron regulated Surface Determinants
ISO	Infection du Site Opératoire
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PSMs	Phenol-Soluble Modulins
PTG	Prothèse Totale de Genou
PTH	Prothèse Totale de Hanche
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SCN	Staphylocoque(s) à Coagulase Négative
Sdr	Serine-aspartate dipeptide repeat
SpA	Protéine A
ST	Sequence Type
TNF	Tumor Necrosis Factor
TS	Trypticase Soja
TSB	Bouillon Trypticase Soja
vWF	Facteur de Von Willebrand

Introduction

Les infections ostéo-articulaires complexes (I.O.A.C.) restent l'une des complications les plus graves de la chirurgie orthopédique. Elles engendrent une morbidité et une surmortalité importantes (1). Malgré l'optimisation des procédures d'antibioprophylaxie et de lutte contre les infections associées aux soins, le risque d'infection au niveau d'une prothèse persiste (1). Ainsi, la population touchée par ces infections ne cesse de croître en raison de l'augmentation du nombre de prothèses posées (2).

L'amélioration du traitement des infections sur prothèse repose sur l'identification précise et rapide du ou des micro-organismes incriminés. Cet examen de Biologie Médicale, basé sur un faisceau d'arguments, nécessite le plus souvent des prélèvements multiples et étagés, pour un même patient. La mise en évidence des bactéries en cause est obtenue par mise en culture de prélèvements liquidiens, tissulaires et osseux (3). Un antibiogramme sera réalisé, le plus précocement possible, afin de permettre au clinicien d'adapter l'antibiothérapie.

D'un point de vue épidémiologique, *Staphylococcus aureus* demeure l'une des principales étiologies d'infections sur matériel prothétique. Son éradication constitue toujours un réel défi thérapeutique (4).

A ce jour, les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces infections semblent différer en fonction du caractère précoce, retardé ou tardif de l'infection et de sa présentation clinique, aiguë ou chronique (1). Par ailleurs, au sein de la population générale, environ 25 % des individus peuvent être porteurs asymptomatiques de *S. aureus* (5). Le rôle de cette colonisation dans le développement des I.O.A.C. demeure à préciser.

Le génome de *S. aureus* comporte un large panel de facteurs de virulence, dont des facteurs d'adhérence, qui pourraient jouer un rôle primordial dans le développement de ces infections. La capacité à former un biofilm, à persister dans le tissu osseux sous forme métaboliquement moins active (variants à colonies naines), ainsi que l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques, sont des éléments à étudier afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués.

L'arrivée de nouvelles techniques de Biologie moléculaire nous a permis d'envisager l'étude de la phylogénie des souches de *S. aureus* sélectionnées, leur potentiel de virulence, ainsi que l'éventuelle relation et/ou imputabilité de souches de colonisation dans les sepsis.

L'objectif de ce travail de thèse était d'une part, de caractériser 57 souches de *S. aureus* isolées lors d'I.O.A.C. et, d'autre part, de décrire précisément les particularités de celles issues des fosses nasales d'autres patients, non infectés, consultant dans la même filière de soins : la chirurgie orthopédique.

Les résultats et les perspectives de ce travail devraient permettre d'améliorer la prévention et la prise en charge de ces infections, et donc la morbidité et les coûts afférents.

1^{ère} partie : Revue bibliographique

I Les infections ostéo-articulaires d'origine bactérienne

Les infections ostéo-articulaires (I.O.A.) rassemblent une extrême diversité de situations cliniques en fonction du site atteint, du ou des germes en cause, du terrain et de la présence ou non de matériel étranger. Leur évolution est d'ailleurs très variable. Avant d'envisager les différentes situations cliniques d'I.O.A. (arthrite septique, ostéomyélite, spondylodiscite, ostéite ou ostéo-arthrite post-opératoire avec ou sans matériel d'ostéosynthèse, infection de pied diabétique et infection sur prothèse articulaire), nous décrirons d'abord les différents éléments qui favorisent leur survenue.

I.1 Physiopathologie

Quel que soit son mode d'expression, une I.O.A. doit toujours être considérée comme une infection grave pouvant engager à un stade précoce le pronostic vital, et à un stade tardif, le pronostic fonctionnel, avec un passage possible à la chronicité.

a Portes d'entrée

Les micro-organismes incriminés peuvent gagner le site de l'infection par trois voies :

- La dissémination par voie sanguine à partir d'un foyer septique à distance, au cours d'une bactériémie. C'est le mode de contamination majoritairement rencontré (6). La cause de la dissémination hématogène n'est pas toujours évidente (geste chirurgical sur le foyer septique, endoscopie urologique ou gynécologique ; ou autres localisations du foyer septique : dentaire, sinusien, rhinopharyngé, cutané, urinaire, endocardique, ...).
- L'inoculation directe du germe par effraction constitue la deuxième voie d'infection. L'effraction peut être accidentelle ou iatrogène, médicale ou chirurgicale, à la suite d'une plaie pénétrante, d'une ponction articulaire, d'une infiltration de corticostéroïdes, d'une arthroscopie, ou encore d'une arthrographie.
- Enfin, la contamination par contiguïté peut se faire à partir d'un foyer septique voisin de l'os ou de l'articulation : cellulite, abcès des parties molles, ostéomyélite, ou bursite septique (6).

b Physiopathologie de l'infection osseuse

L'os sain est un tissu bien vascularisé, hormis la région métaphysaire (Figure 1) qui est le lieu d'un ralentissement circulatoire, particulièrement chez l'adolescent (7).

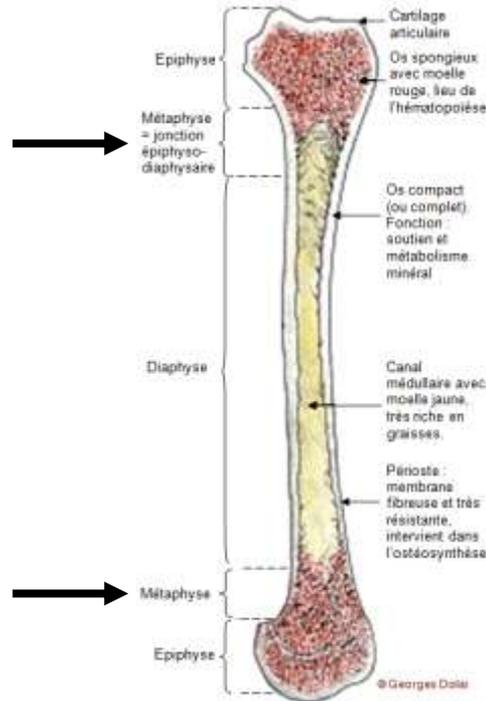


Figure 1 : Coupe sagittale d'un os long.

Les flèches noires indiquent les parties de l'os où la circulation sanguine est ralentie.

En revanche, en cas d'infection et indépendamment du mode de pénétration, les bactéries déclenchent une réaction inflammatoire suppurée qui se développe soit dans la région sous-périostée (formant un abcès sous-périosté précoce qui évolue vers les parties molles), soit dans la cavité médullaire. Ces réactions s'accompagnent rapidement d'une hyperhémie diffuse (artériolaire, capillaire et veinulaire) responsable d'une augmentation du débit sanguin et de la perméabilité capillaire. Il s'ensuit une transsudation plasmatique responsable d'un œdème et d'une hyperpression locale (Figure 2, page 16 - 8).

Dans la cavité médullaire, ces réactions entraînent une compression des capillaires et des sinusoides, responsable de thromboses veineuses et artériolaires. L'ischémie provoque des zones d'infarctissement de la moelle grasseuse et hématopoïétique qui évolueront secondairement vers la formation d'abcès bordés par une réaction d'ostéoporose. Les thrombi septiques peuvent être à l'origine de métastases, soit à distance, soit dans des territoires osseux de voisinage expliquant la possibilité de pandiaphysite.

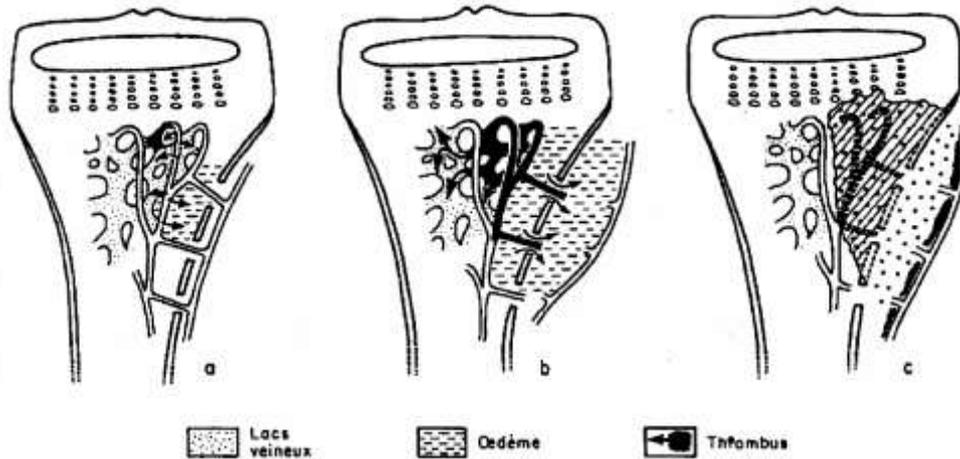


Figure 2 : Evolution d'une ostéomyélite aiguë (9)

- Thrombose débutant au niveau d'une boucle capillaire métaphysaire et entraînant un œdème en amont.
- Extension de la thrombose le long des axes vasculaires : décollement du périoste et suppression de son apport vasculaire.
- Apparition du pus et nécrose du territoire dévascularisé, formation du séquestre, et apparition des premières lamelles osseuses sous le périoste décollé.

Plus tardivement se constituent des foyers de nécrose osseuse (Figure 2). Les petits foyers, toujours nombreux, peuvent être résorbés par l'action des ostéoclastes. Si le fragment d'os nécrosé est plus volumineux, la résorption est impossible et il se forme un séquestre osseux septique, première étape du passage à la chronicité. Ces réactions se produisent très rapidement. L'expérimentation animale montre qu'en 72 heures une ostéomyélite aiguë staphylococcique peut, en l'absence d'un traitement antibiotique efficace, avoir constitué des séquestres (10). Au contact des séquestres, le périoste réagit en produisant un os neuf. Cette réaction de néo-ostéogénèse peut atteindre une épaisseur considérable. Dans les ostéomyélites chroniques, cet os néoformé est creusé de multiples cavités comportant de petits séquestres dans lesquels des bactéries vivantes peuvent persister indéfiniment. En parallèle, l'accumulation de pus dans la cavité articulaire va entraîner une distension capsulaire qui interfère avec la nutrition du cartilage, induisant l'apoptose de nombreux chondrocytes. Ce processus enzymatique de destruction chondrocytaire persiste longtemps, même après stérilisation de l'articulation par un traitement antibiotique (Figure 3, page 17). Enfin, à partir de ces foyers abcédés, des trajets fistuleux vont se former à travers les parties molles pour tenter d'assurer un drainage qui reste toujours très insuffisant (11).

Chez le nourrisson, avant 12-18 mois, l'existence d'anastomose vasculaire entre métaphyse et épiphyse peut expliquer l'atteinte articulaire précoce par contiguïté, ce réseau dit interphysaire étant essentiellement décrit au niveau des grosses articulations : hanche, genou,

épaule et coude (12). Chez l'enfant et l'adolescent, ces anastomoses disparaissent, et le cartilage de croissance constitue une barrière naturelle à l'atteinte articulaire en cas d'ostéite juxtamétaphysaire, sauf au niveau de la hanche (13).

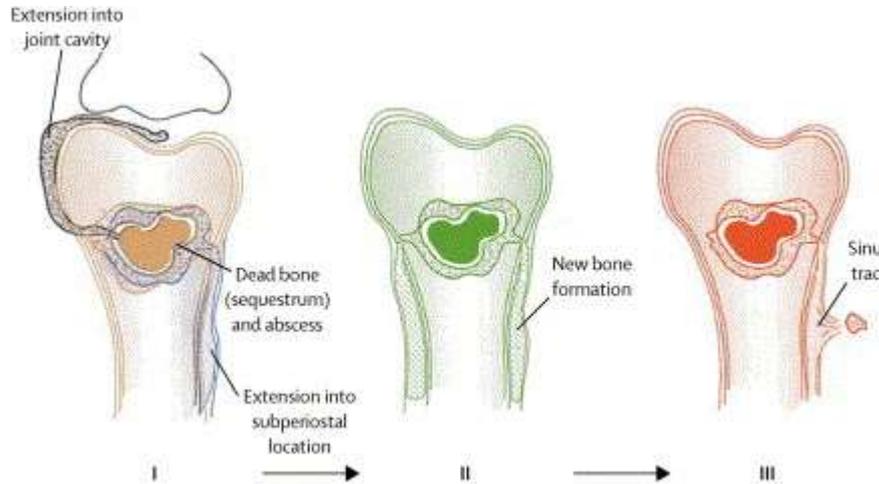


Figure 3 : Evolution d'une ostéomyélite chronique (11)

- I. A partir du séquestre se forme une aire d'os mort et dévascularisé.
La progression de l'infection intramédullaire vers une localisation intracapsulaire peut conduire à une arthrite septique.
La progression de l'infection vers une localisation subpériostale peut conduire à une élévation du périoste.
- II. Nouvelle formation osseuse résultant de l'élévation massive du périoste.
- III. Extension du séquestre et de la nécrose à travers l'os cortical créant une fistule qui ira s'écouler par la peau.

c Site de l'infection

Tous les os peuvent être atteints, principalement les os longs, mais les I.O.A. surviennent majoritairement au niveau des membres inférieurs, avec en premier lieu le genou puis la hanche. Au niveau de l'articulation, c'est la chondro-épiphyse, structure anatomique pluri-tissulaire située à chacune des deux extrémités d'un os long (Figure 1, page 15), qui se trouve au cœur de l'infection (arthrite septique). Son rôle est essentiel non seulement car elle est porteuse du potentiel de croissance en longueur de l'os, mais son développement détermine également le volume et la forme de la surface articulaire (14). Il est donc aisé de comprendre la gravité des séquelles fonctionnelles notamment en terme de déséquilibre de croissance que peuvent engendrer les infections articulaires. L'ostéomyélite aiguë cible la métaphyse osseuse, partie de l'os la plus richement vascularisée. A l'extrémité des vaisseaux métaphysaires, le réseau vasculaire se termine en de fines boucles sinusoidales, siège d'un important ralentissement circulatoire qui favorise la greffe bactérienne locale en cas de

bactériémie (6). De plus, le risque d'embolisation septique est maximal au niveau de la métaphyse des os longs, car ils ont le potentiel de croissance le plus élevé et le réseau vasculaire développé en proportion (14). Les I.O.A. peuvent également survenir au niveau du rachis définissant les spondylodiscites. La structure des zones de croissance vertébrales est un peu différente de celle des chondroépiphyses, mais la physiopathologie de ces infections reste similaire à celle des infections atteignant les membres (15).

d Facteurs favorisants

Le développement de l'infection est multifactoriel et dépend de l'interaction entre l'agent pathogène et les réactions de défense de l'organisme (8).

d.i Facteurs de l'hôte

Toutes les bactériémies physiologiques n'aboutissent pas à une I.O.A. Les processus physiopathologiques dépendent non seulement de la virulence et de l'inoculum bactérien, mais également de facteurs locaux et généraux, comme le statut circulatoire et les défenses immunitaires de l'hôte (8). Les facteurs généraux reconnus comme favorisant la survenue d'une I.O.A. sont de manière non exhaustive : le diabète, l'éthylisme chronique, un âge supérieur à 60 ans, la toxicomanie, et l'immunodépression qui peut être d'origine pathologique (V.I.H.) ou iatrogène (corticothérapie à fortes doses et/ou prolongée, chimiothérapie anti-cancéreuse, ...) (16). Une I.O.A. peut donc survenir sur un os ou une articulation antérieurement sains, ou compliquer l'évolution d'une articulation antérieurement lésée par un processus dégénératif (arthrose, rhumatisme inflammatoire comme la polyarthrite rhumatoïde, tendinopathie), par une chirurgie (traumatisme articulaire, mise en place d'un matériel prothétique articulaire), ou par un microtraumatisme sans effraction (15). La polyarthrite rhumatoïde est l'élément le plus fréquemment retrouvé, probablement car elle associe plusieurs facteurs de risque, à savoir des atteintes articulaires et un traitement immunosuppresseur (16). En effet, l'incidence des arthrites septiques est multipliée par un facteur d'environ dix chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, mais aussi chez ceux porteurs d'une prothèse articulaire (17). En pédiatrie, quelques particularités physiopathologiques peuvent expliquer certaines spécificités des I.O.A. qui les différencient nettement des infections retrouvées chez l'adulte. Tout d'abord, un mode d'inoculation principalement bactériémique dont les agents sont variables selon l'âge, alors que chez l'adulte la contamination est plus souvent traumatique ou chirurgicale et survient sur des

terrains particuliers (diabète, prothèse, maladie rhumatismale) (13). Le jeune nourrisson présente une anatomie vasculaire et tissulaire qui favorise l'extension articulaire (anastomoses entre les réseaux métaphysaire et épiphysaire) expliquant la prédominance de ces infections avant l'âge de 5 ans (12). Toutefois, le pronostic des I.O.A. chez l'enfant est globalement bon car un terrain généralement sain et un os richement vascularisé permettant la diffusion des antibiotiques réduisent le risque d'échec thérapeutique et le passage à la chronicité (moins de 5 % des cas) (13). A l'opposé, l'évolution est plus souvent médiocre chez l'adulte avec un passage fréquent à la chronicité, la survenue d'abcès et de séquestres intra-osseux dont la prise en charge est alors chirurgicale (18).

d.ii Facteurs bactériens

La majorité des I.O.A. d'origine bactérienne sont liées à *S. aureus*. Le pouvoir pathogène de cette bactérie a donc été naturellement le mieux étudié, essentiellement grâce à des modèles expérimentaux (6). Les facteurs de virulence identifiés peuvent également être partagés par d'autres espèces bactériennes, ce qui en fait un bon modèle d'étude (19).

L'étape déterminante de l'infection est l'adhérence initiale de la bactérie aux tissus de l'hôte à l'aide de récepteurs bactériens appelés adhésines (20). En plus de ces protéines d'adhérence, *S. aureus* possède la capacité à survivre dans le cytoplasme des ostéoblastes et des cellules endothéliales après internalisation (synthèse d'exotoxines et d'hydrolases), échappant ainsi à la phagocytose et à l'action des antibiotiques (15). La bactérie, restée viable dans le compartiment intracellulaire, peut alors induire une apoptose des cellules endothéliales (8). L'action d'autres protéines (protéine A, polysaccharide capsulaire, toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), leucocidine de Panton et Valentine (PVL)...), lorsqu'elles sont présentes, a également un impact sur la fréquence de survenue des I.O.A. et leur sévérité (6). La bactérie elle-même, par le biais de ses enzymes et de ses toxines, va pouvoir léser les tissus osseux et cartilagineux (21).

Enfin, *S. aureus* est capable de s'organiser en biofilm, comme d'autres espèces telles que les staphylocoques à coagulase négative ou le bacille pyocyanique. Au sein du biofilm, des réseaux de communication intercellulaire et des signaux de passage en phase stationnaire de croissance (quiescence) se mettent alors en place conduisant à la formation de variants colonies naines. Ces microcolonies peuvent se maintenir de façon prolongée dans la matrice osseuse, à l'abri des défenses immunitaires et des antibiotiques. Cet échappement peut aboutir à une infection subaiguë et des rechutes infectieuses (22).

d.iii La réponse immunitaire de l'hôte

Le système immunitaire va également participer aux lésions cellulaires par le recrutement de monocytes/macrophages et de polynucléaires neutrophiles lors de la réaction inflammatoire (8). En effet, ces cellules ont des effets bénéfiques qui permettent de réduire la mortalité due au sepsis en facilitant la clairance bactérienne (8). Néanmoins, elles vont aussi entraîner une intensification de la sévérité des atteintes articulaires, d'une part, en libérant des radicaux libres oxygénés et des protéases lysosomales et, d'autre part, en entretenant la production en cascade de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (8). Lorsque des superantigènes sont sécrétés par la bactérie (TSST-1, P.V.L., entérotoxines de *S. aureus*), la réponse inflammatoire de l'hôte se trouve accentuée, avec une proportion accrue de lymphocytes T activés (8,15).

I.2 Les différents types d'infections ostéo-articulaires

a Les infections primitives

Les I.O.A. qui surviennent de manière primitive regroupent deux grands types de pathologies différentes : les arthrites septiques, qui sont des infections des articulations et, les ostéomyélites, qui sont des infections des métaphyses ou des épiphyses au contact des cartilages de croissance. La distinction entre ces deux entités cliniques est habituelle mais une infection primitivement osseuse peut contaminer l'articulation, de même qu'une infection articulaire peut se compliquer d'une ostéomyélite (11,23).

a.i Arthrite septique

L'arthrite septique correspond à l'infection d'une articulation par une bactérie. Elle se distingue ainsi des arthrites post-infectieuses ou réactionnelles qui sont également d'origine infectieuse, mais pour lesquelles le germe se développe à distance de l'articulation.

Tous les individus peuvent être atteints mais la prévalence des arthrites septiques est plus importante chez l'enfant et les personnes âgées, notamment s'ils sont de sexe masculin (15).

Dans l'arthrite septique, le plus souvent, la bactérie diffuse par voie hématogène à partir d'un foyer infectieux à distance, ce qui explique l'importance de la recherche d'une porte d'entrée, apparente ou non. En fonction de l'âge du patient et de la source de l'infection, l'épidémiologie des arthrites septiques diffère (tableau I, page 21).

Tableau I : Principales bactéries impliquées dans les arthrites septiques (23)

	Tous patients confondus	Age	Groupes à risque
Origine hématogène	<i>S. aureus</i>	<p>< 2 mois : <i>S. aureus</i> et <i>S. agalactiae</i></p> <p>2 mois – 5 ans : <i>S. aureus</i>, <i>S. pyogenes</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>Kingella kingae</i>, <i>H. influenzae</i></p> <p>Après 5 ans : <i>S. aureus</i>, <i>S. pyogenes</i></p> <p>Adulte jeune : <i>N. gonorrhoeae</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Arthrite rhumatoïde : <i>S. aureus</i> - Toxicomanie intraveineuse : <i>S. aureus</i>, pathogènes opportunistes, bacille à Gram négatif - Sujets âgés et patients avec maladie chronique : <i>S. agalactiae</i> - Patients immunodéprimés : Bacilles à Gram négatif
Pathologie d'inoculation directe	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pasteurella multocida</i> et <i>Capnocytophaga canimorsus</i> après une morsure animale - <i>Streptobacillus moniliformis</i> après morsure de rat - <i>Eikenella corrodens</i> après morsure humaine - <i>Borrelia burgdorferi</i> en cas de piqûre de tique (maladie de Lyme) - <i>P. acnes</i>, Staphylocoques à coagulase négative (injections de corticoïdes) 		

S. aureus : *Staphylococcus aureus* ; *S. agalactiae* : *Streptococcus agalactiae* ; *S. pneumoniae* : *Streptococcus pneumoniae* ; *H. influenzae* : *Haemophilus influenzae* ; *N. gonorrhoeae* : *Neisseria gonorrhoeae*, *P. acnes* : *Propionibacterium acnes*.

L'atteinte de la synoviale est généralement responsable d'une arthrite pure, sans infection osseuse. La riche vascularisation des diarthroses, notamment par de nombreuses branches artérielles péri-articulaires qui traversent la capsule fibreuse favorise cette atteinte. La pénétration du germe est suivie d'une réaction inflammatoire avec une hyperhémie locale et une réaction cellulaire riche en polynucléaires. La multiplication bactérienne dans l'articulation engendre un épanchement purulent qui contient des enzymes protéolytiques libérées par les polynucléaires neutrophiles (collagénases et élastases, principalement) et responsables de la destruction articulaire. Si une atteinte osseuse épiphysaire ou métaphysaire est associée, il s'agit d'une ostéo-arthrite qui se rencontre plutôt chez le nourrisson (réseau interphysaire entre métaphyse et épiphyse) (12).

L'arthrite septique est donc considérée, à juste titre, comme une urgence diagnostique et thérapeutique, puisqu'en l'absence d'un traitement antibiotique précoce et adapté, le risque d'envahissement septique loco-régional voire général est élevé, mettant en jeu le pronostic vital du patient, ainsi que le pronostic fonctionnel de l'articulation touchée. La morbidité revêt surtout la forme de séquelles articulaires fonctionnelles invalidantes consécutives à l'atteinte voire la destruction complète du revêtement cartilagineux (chondrolyse, fibrose).

Chez le nourrisson et l'enfant, une atteinte des cartilages de croissance est possible avec pour conséquence des troubles de la croissance osseuse (12,13). Le degré de destruction articulaire (synoviale, cartilage, os) dépend pour une large part du délai de la mise en route d'un traitement adapté (24).

a.ii Ostéomyélite infectieuse

Il s'agit d'une infection uni- ou plurifocale qui peut toucher n'importe quel os en croissance et n'importe quel segment. L'ostéomyélite se développe habituellement près du genou et loin du coude, c'est-à-dire proche des cartilages en croissance. Le foyer est généralement unique.

L'ostéomyélite infectieuse est généralement monomicrobienne. Classiquement due à *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Escherichia coli* peuvent également être impliqués chez les nourrissons. Plus tard, dans l'enfance, *Streptococcus pyogenes* et *Haemophilus influenzae* deviennent plus communs bien que l'incidence de *H. influenzae* ait diminué depuis la généralisation de la vaccination contre cette bactérie. Chez l'adulte, *S. aureus* reste le pathogène impliqué dans l'immense majorité des cas. Néanmoins, d'autres micro-organismes peuvent être identifiés, notamment à la faveur d'une immunodépression : *Enterococcus* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Mycobacterium* spp., bactéries anaérobies et espèces fongiques (11).

Dans sa forme aiguë, l'ostéomyélite survient habituellement chez l'enfant et l'adolescent ; elle se localise surtout au niveau des métaphyses fertiles des os longs (principalement fémur et tibia) après un épisode de bactériémie. En effet, le réseau vasculaire osseux est particulièrement développé chez l'enfant en croissance, notamment au niveau des grosses articulations des os longs. Les extrémités de ces os, métaphyse et épiphyse, sont vascularisées à partir d'un triple réseau : métaphysaire, périphérique, et épiphysaire (Figure 4, page 23). Le débit sanguin diffère nettement selon le réseau vasculaire, et c'est la métaphyse osseuse, la plus richement vascularisée, qui est susceptible d'être soumise à de fréquents embolus bactériens (25). Il n'est pas rare de noter dans les antécédents récents d'une ostéomyélite aiguë hématogène un traumatisme local ou la notion d'une infection cutanée ayant servi de porte d'entrée à la bactérie. La guérison est habituellement obtenue si un traitement antibiotique et une immobilisation sont débutés précocement. Dans le cas contraire, l'infection peut s'étendre en direction de la diaphyse (pandiaphysite), du périoste (abcès sous-

périosté et fistulisation à la peau) ou de l'épiphyse et de l'articulation. Dans ce dernier cas, chez l'enfant de plus d'un an, l'infection est stoppée par le cartilage de conjugaison (15).

La diffusion de l'infection aiguë à l'articulation aboutit au tableau classique d'ostéoarthrite du jeune nourrisson. Une mauvaise prise en charge thérapeutique sera à l'origine de complications, allant du trouble de la croissance à la destruction du cartilage articulaire, laissant autant de séquelles définitives qui pourront peser sur toute la vie socioprofessionnelle de l'adulte.

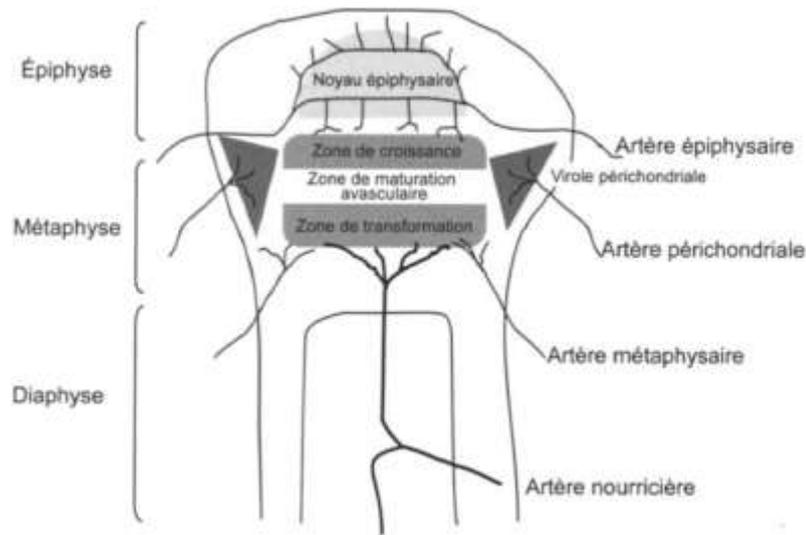


Figure 4 : Anatomie vasculaire des grosses articulations de l'enfant (25)

Chez l'adulte, l'ostéomyélite aiguë est beaucoup plus rare. Habituellement diaphysaire, elle s'accompagne rarement d'abcès sous-périosté ou d'une diffusion à l'ensemble de la diaphyse. L'ostéomyélite est souvent chronique et apparaît fréquemment à la suite d'une inoculation directe, après fracture ouverte ou plaie infectée (11). Dans ce contexte, la survenue d'abcès (abcès de Brodie) et de séquestres intra-osseux n'est pas rare. En effet, la thrombose des vaisseaux nourriciers suite au processus septique et le décollement du périoste par le liquide purulent peuvent entraîner une nécrose osseuse menant à la formation d'un séquestre. Ce processus entretient une suppuration qui conduira à une fistulisation à la peau.

La guérison est souvent difficile à obtenir, même avec une prise en charge chirurgicale adaptée. L'usage emploie d'ailleurs le terme de « rémission » lors d'une ostéomyélite (11).

a.iii Spondylodiscite infectieuse

La spondylodiscite infectieuse est une infection d'un ou de plusieurs disques intervertébraux et des deux vertèbres adjacentes. L'infection peut concerner le corps vertébral, le disque, les zones para-vertébrales, et/ou le canal rachidien. L'atteinte est généralement lombaire (60 à 70 % des cas), plus rarement thoracique ou cervicale, et porte sur un seul étage (80 % des cas) (26). L'atteinte de plusieurs segments est plus fréquente au cours des spondylodiscites tuberculeuses (23 % *versus* 9 % des spondylodiscites à bactéries pyogènes), de même que l'atteinte thoracique (figure 5 - 26).

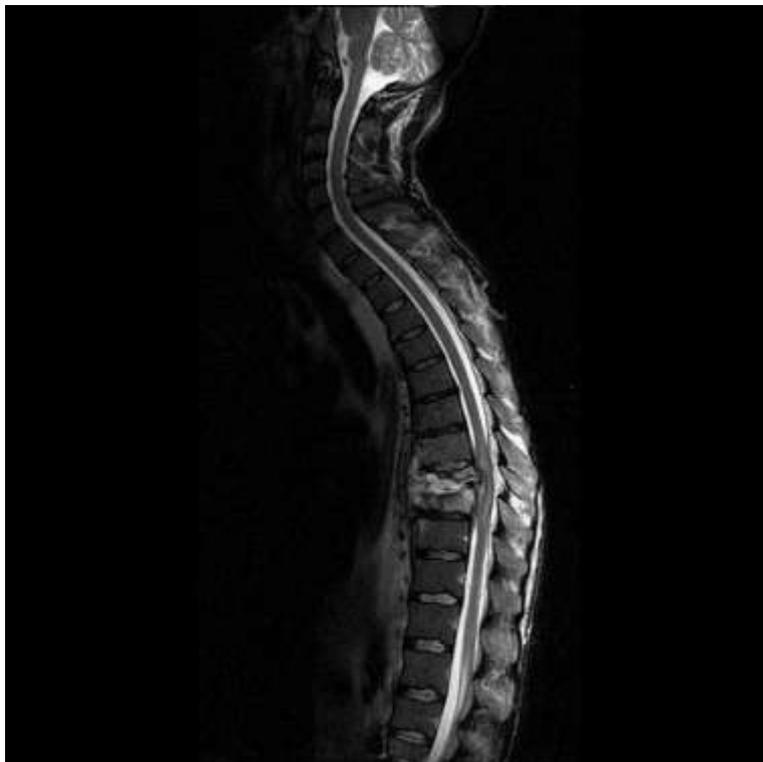


Figure 5 : Vue sagittale à l'IRM montrant une destruction du plateau vertébral lié à un abcès épidual causé par *Mycobacterium tuberculosis* (26)

La contamination hématogène est la plus fréquente (60 à 80 %), en particulier chez l'enfant, du fait d'une bonne vascularisation des disques chez les sujets jeunes alors qu'elle est plus rare chez l'adulte (26). Elle peut provenir d'une dissémination à partir d'un foyer primaire (endocardite, abcès, infections urinaire, pulmonaire ou pelvienne, toxicomanie par voie intra-veineuse), ou faire suite à un geste chirurgical à distance (chirurgies pelvienne, urinaire, vasculaire, cardiaque ou viscérale) compliqué d'une infection régionale. L'inoculation directe au niveau disco-vertébral peut se produire à la suite d'un geste local :

ponction, infiltration, discographie, laminectomie, discectomie, ou chirurgie rachidienne (26). L'inoculation par contiguïté à partir d'une infection de voisinage comme un abcès adjacent ou une greffe aortique infectée est plus rare, retrouvée dans environ 3 % des cas (15).

Ces infections sont en général monomicrobiennes même s'il peut arriver qu'elles soient polymicrobiennes en cas de pathologie chronique ou d'immunodépression. Les principaux pathogènes en cause sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Principales bactéries impliquées dans les spondylodiscites (26)

Spondylodiscite d'origine hémotogène	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> (40 %) - Entérobactéries (20 à 30 %) - Streptocoques/entérocoques - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - <i>Brucella</i> spp.
Spondylodiscite post-opératoire	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - Staphylocoques à coagulase négative - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Propionibacterium acnes</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> - Streptocoques

En l'absence de traitement, qui associe antibiothérapie adaptée, immobilisation et rééducation, l'évolution d'une spondylodiscite peut se faire vers l'extension locale, avec diffusion vers les muscles para-vertébraux et le canal médullaire (épidurite, abcès), associée à des lésions neurologiques parfois irréversibles (26,27).

b *Les ostéites secondaires*

Les ostéites par inoculation hémotogène (spondylodiscite) ou par inoculation directe (infection de matériel orthopédique, infection post-traumatiques secondaires à une fracture ouverte ou pied diabétique) sont essentiellement liées à *Staphylococcus aureus*, premier pathogène responsable de ce type d'infections (Figure 6, page 26).

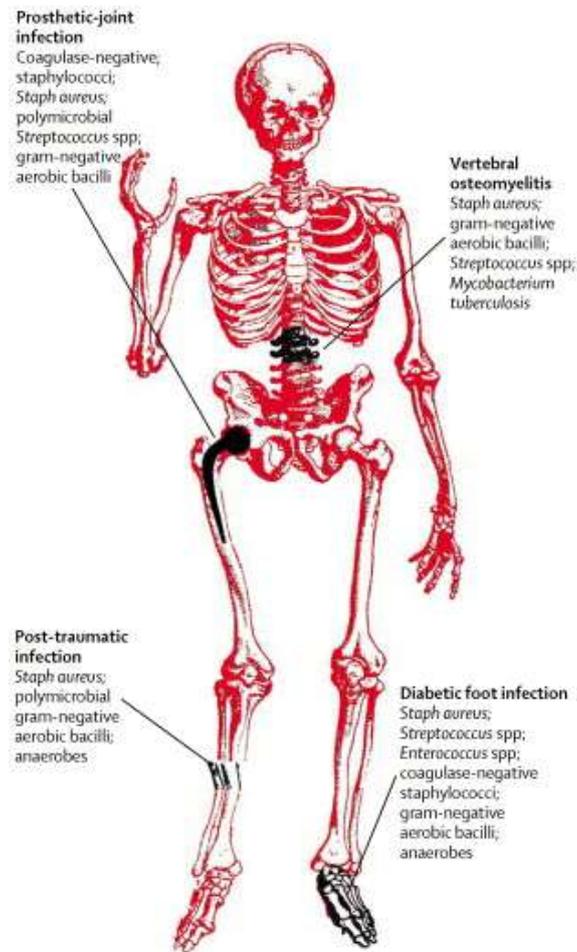


Figure 6 : Microbiologie des différents types d'infections ostéo-articulaires (11)

b.i Ostéite

L'ostéite est définie comme un « terme générique regroupant les infections osseuses traumatiques ou survenant après un geste chirurgical ». Elle est dite aiguë si elle évolue depuis moins d'un mois, ou chronique au-delà de ce délai (28). Les ostéites post-chirurgicales sont dites précoces ou tardives selon leur délai d'apparition par rapport au geste chirurgical, sachant que depuis l'antibioprophylaxie chirurgicale systématique, la plupart des infections post-opératoires sont plutôt de révélation tardive (après trois mois) (1).

Les ostéites résultent donc généralement d'une inoculation directe du germe. La contamination se fait soit à l'occasion d'un traumatisme à partir de la flore cutanée ou de l'environnement (tellurique, hydrique, ...), comme dans le cas des fractures ouvertes ; soit à l'occasion d'une intervention chirurgicale ou pendant la période post-opératoire précoce à

travers la cicatrice opératoire. L'écologie microbienne sera différente selon le contexte clinique.

Le risque de développer une infection sur fracture ouverte augmente avec le stade de gravité de la fracture, mesuré par la classification de Gustilo (3). Cette classification prend en compte les lésions musculaires et vasculaires associées à la fracture et attribue au grade I un risque d'infection entre 0 et 2 %, au grade II un risque entre 1 et 7 %, et au grade III un risque entre 10 et plus de 50 %. En cas de mise en place de matériel, la pathogénèse rejoint alors celle des infections sur prothèse.

b.ii Ostéite du pied chez le diabétique

Le diabète expose le patient à de nombreuses complications dont l'ostéite du pied est une des plus fréquentes et des plus sévères (29). L'atteinte des structures ostéo-articulaires est due à l'extension en profondeur des phénomènes infectieux secondaires à une plaie du pied : il s'agit, par définition, d'une ostéite, parfois d'une ostéoarthrite (l'ostéomyélite n'est effective qu'avec l'atteinte de la médullaire, dont les petits os du pied sont peu pourvus). Outre l'altération de la microcirculation, qui aboutit à une baisse de l'oxygénation tissulaire périphérique, la neuropathie diabétique et l'hyperpression jouent un rôle prépondérant sur l'évolution défavorable de l'ulcération (30). L'indolence de la plaie liée à la neuropathie retarde son diagnostic et sa prise en charge. Par conséquent, la persistance de forces de pression ou de friction s'exerçant sur l'ulcération, lors de la marche, facilite la survenue et la diffusion de l'infection (29). Les désordres immunitaires et les anomalies de perfusion tissulaire (micro- et macro-angiopathies) rencontrés au cours du diabète participent également à l'extension des dégâts tissulaires (31).

La présence d'une ostéite augmente les risques d'intervention chirurgicale, avec amputation mineure (sous la cheville) ou majeure (au-dessus de la cheville), notamment en cas d'une ischémie associée. La suppression de l'appui sur la plaie du pied diabétique raccourcit de manière significative le délai de cicatrisation et diminue le risque d'infection secondaire. Le diagnostic précoce de ce type d'infection et sa prise en charge énergique sont autant de facteurs qui limitent le risque d'évolution défavorable (29,32).

Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement, à partir du grade 2 de la classification du Consensus International (31).

Les bactéries aérobies à Gram positif sont les plus fréquentes. *S. aureus* est la bactérie la plus souvent mise en évidence, de façon isolée ou au sein d'une population polymicrobienne, lors

d'infections superficielles ou profondes. Les streptocoques β -hémolytiques sont également retrouvés, le plus souvent dans le cadre d'infections polymicrobiennes.

Les bacilles aérobies à Gram négatif, essentiellement de la famille des entérobactéries (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.), se rencontrent généralement, en cas d'infections chroniques ou déjà traitées. *Pseudomonas aeruginosa* est volontiers isolé après des hospitalisations de longue durée, l'application de pansements humides, des bains de pieds ou le port de bottes en caoutchouc (15).

Les bactéries anaérobies strictes, le plus souvent cocci à Gram positif mais aussi bacilles à Gram négatif (*Prevotella* spp., *Bacteroides* spp.) sont souvent associées à des germes aérobies. Les bactéries à Gram positif anaérobies strictes sont présentes, en règle générale, dans des plaies peu profondes alors que celles à Gram négatif anaérobies sont associées à une nécrose ischémique ou à une atteinte profonde (33,34).

b.iii Infections ostéo-articulaires sur matériel

Les I.O.A. survenant sur un matériel implanté, qu'il s'agisse de matériel d'ostéosynthèse (plaque, clou, vis, tige...) ou de prothèse ostéo-articulaire, constituent des pathologies graves aussi bien sur le plan fonctionnel (mise en jeu du devenir de l'articulation) que vital (possibilité de dissémination hématogène). Ces infections engendrent souvent des difficultés diagnostiques et thérapeutiques, une importante morbidité et un coût médical élevé lié en partie à la nécessité d'interventions et d'hospitalisations itératives, ainsi que d'antibiothérapies de longue durée (1,3).

Ce paragraphe, au cœur du sujet de cette thèse sera développé lors du chapitre suivant.

II Les infections ostéo-articulaires complexes (I.O.A.C.)

II.1 Définition

Les infections ostéo-articulaires dites complexes (I.O.A.C.) recouvrent essentiellement les infections sur matériel prothétique ou d'ostéosynthèse, ainsi que les infections post-traumatiques (fractures ouvertes). Elles peuvent mettre en jeu le pronostic vital mais, beaucoup plus souvent, le pronostic fonctionnel. Leur prise en charge demeure complexe et fait appel à plusieurs disciplines : Chirurgiens (orthopédique et plastique), Bactériologistes, Infectiologues, Radiologues, ainsi que les Anesthésistes, Rééducateurs fonctionnels, Rhumatologues, Hygiénistes et Pharmaciens.

II.2 Epidémiologie

Le remplacement d'une articulation par une prothèse, quel qu'en soit le motif, est de plus en plus fréquent lorsque celle-ci devient douloureuse ou fonctionnellement instable. En 2010, en France, ces interventions ont représenté 128843 arthroplasties de hanche et 66305 arthroplasties de genou (35). L'antibioprophylaxie adaptée et les blocs opératoires équipés de flux laminaires ont respectivement réduit les risques d'infection du site opératoire (I.S.O.), après remplacement de la hanche et du genou, à moins de 1 et 2 % (1). Toutefois, ce risque est susceptible d'augmenter de 20 %, lors d'une reprise ou d'une révision de prothèse (36). Malgré des progrès considérables dans la prévention et le traitement de ces infections, le nombre absolu de patients dont la prothèse s'est infectée s'élève. Ces infections peuvent faire l'objet de complications, responsables d'une morbidité significative (4).

Globalement, les principaux micro-organismes responsables d'infections sur prothèse de hanche ou de genou sont les staphylocoques à coagulase négative (30-43 %) et *Staphylococcus aureus* (12-23 %), suivis par les streptocoques (9-10 %), les entérocoques (3-7 %), les bacilles à Gram négatif (6-15 %) et les bactéries anaérobies strictes (2-4 %). Des infections polymicrobiennes sont observées dans environ 10 % des cas. Enfin, aucune bactérie n'est isolée dans 10 à 30 % des cas, compte tenu des difficultés du diagnostic biologique et de l'exposition préalable aux antibiotiques. Le rôle des techniques de Biologie moléculaire demeure à préciser (37,38). Un P.H.R.C. inter-régional, dont le service de Bactériologie-Hygiène du CHU de Nantes est l'investigateur principal (Dr. P. Bémer), est d'ailleurs en cours actuellement.

II.3 Impact sociétal

Les projections américaines estiment que le nombre de poses de prothèse totale de hanche (P.T.H.) et de genou (P.T.G.) devrait augmenter respectivement de 174 et 673 % d'ici 2030 (Figure 7). Parallèlement, le nombre de révisions de ces prothèses devrait doubler, dans les 10 années à venir (2). Ainsi, le coût de la prise en charge des infections sur prothèse dépasse 50000 dollars par patient et augmente de 250000 millions de dollars par an, impactant considérablement les budgets nationaux, en matière de Santé (39). Trois facteurs expliquent l'augmentation du nombre d'infections ostéo-articulaires sur matériel (I.O.A.M.) : le nombre croissant de poses de prothèse chez des patients âgés, l'allongement de la durée de vie avec une prothèse et l'amélioration de l'expertise des Bactériologistes dans la détection et l'identification des bactéries potentiellement impliquées (4). En France, la prise en charge adéquate des I.O.A.M., enjeu majeur de Santé publique, a conduit le Ministère de la Santé à identifier, dès 2008, des centres de référence régionaux regroupant les compétences des différentes spécialités concernées. Le C.H.U. de Nantes est ainsi centre associé au centre de référence de Tours, au sein du C.R.I.O.G.O. (Centre de Référence Interrégional pour la prise en charge des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest).

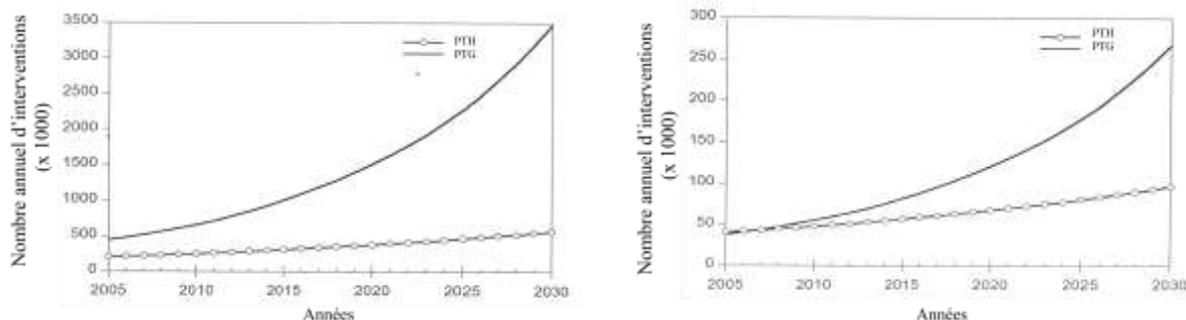


Figure 7 : Evolution du nombre de poses et de révisions de prothèse totale de hanche et de genou aux Etats-Unis entre 2005 et 2030 (2)

II.4 Diagnostic des I.O.A.M.

a Arguments cliniques

L'existence d'une fistule ou de pus, à proximité de la prothèse ou de l'implant, affirme l'infection, jusqu'à preuve du contraire. Dans le mois qui suit la mise en place d'une prothèse articulaire, les signes cliniques suivants sont évocateurs d'une infection :

- douleur d'intensité anormale ou sa réapparition après intervalle libre,
- écoulement purulent de la plaie opératoire,
- désunion, nécrose ou inflammation cicatricielle.

L'existence de signes généraux (fièvre, frissons) augmente la probabilité d'une infection. L'existence d'une douleur et/ou la présence d'un descellement radiologique, surtout si la prothèse a été posée récemment, doivent faire rechercher une infection. Lorsqu'on constate un intervalle libre long, entre la pose de la prothèse et la survenue de signes infectieux en regard de celle-ci, il convient de rechercher un foyer infectieux à distance (infection de nature « hémotogène »). Chez un patient porteur d'une prothèse articulaire ou d'un matériel d'ostéosynthèse, en présence d'un sepsis et en l'absence d'un autre point d'appel infectieux à l'examen clinique, il faudra évoquer une infection du matériel. L'absence de signes inflammatoires cliniques, locaux et généraux, ne permet pas d'éliminer une infection sur prothèse (3,40).

b Arguments anatomopathologiques

Il est recommandé, dans tous les cas, de réaliser un examen anatomopathologique intéressant le tissu osseux et la synoviale (3). Histologiquement, une infection sur matériel se définit par la présence de plus de cinq polynucléaires neutrophiles par champ microscopique, à fort grossissement (x 400), dans au moins cinq champs séparés, sur le prélèvement osseux. L'intérêt de l'examen histologique réside aussi dans sa capacité à pouvoir orienter plus spécifiquement le diagnostic vers une infection à mycobactérie ou vers une infection fongique (41).

c Arguments microbiologiques

Les infections ostéo-articulaires sur prothèse peuvent être diagnostiquées chez un patient qui présente des signes cliniques d'infection et au moins l'un des critères suivants :

- Présence d'au moins un prélèvement positif (un prélèvement par ponction articulaire ou un prélèvement péri-opératoire ou une hémoculture) avec une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée, et pour lequel la question d'une contamination ne se pose pas (*S. aureus*, entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*...) ou bien avec une bactérie exceptionnellement rencontrée pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (*Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Pasteurella*).
- Présence d'au moins trois prélèvements positifs (trois prélèvements péri-opératoires ou deux prélèvements péri-opératoires + un prélèvement par ponction articulaire réalisée quelques jours avant la chirurgie) avec la (les) même(s) bactérie(s) appartenant à la flore cutanée (ex : staphylocoque à coagulase négative (SCN), *Propionibacterium acnes*, corynébactérie...), et dont l'isolement pose la question d'une éventuelle contamination (3,42).

II.5 Physiopathologie des infections sur prothèse

L'inoculation du matériel peut être d'origine exogène (péri-opératoire ou post-opératoire) ou hématogène (à distance du geste chirurgical) (43).

a Infections péri-opératoires

Les infections exogènes débutent généralement pendant la chirurgie ou immédiatement après, en cas d'anomalies de guérison de la plaie, notamment en raison d'un large hématome. Plus rarement, les infections exogènes apparaissent tardivement, au décours d'une arthrocentèse ou d'une perforation cutanée, spontanée ou traumatique, causée par le matériel (37).

b Infections d'origine hématogène

Si le risque s'avère plus élevé en post-opératoire immédiat, les infections d'origine hématogène sont retrouvées à tout moment, après la chirurgie. En effet, la présence d'un corps étranger diminue localement les défenses immunitaires (44). L'accumulation de granulocytes

autour de la prothèse conduit à une altération de leur fonction, probablement due à une phagocytose « frustrée », menant à une dégranulation et donc à la production de formes réactives de l'oxygène. Cette immunodépression locale favorise l'ensemencement préférentiel de l'implant. De plus, la présence du matériel diminue l'inoculum nécessaire à l'infection. Ainsi, que ce soit sur modèle animal ou chez l'Homme, la quantité de bactéries nécessaires pour former un abcès à *S. aureus* est 10000 fois inférieure, en présence de matériel étranger (45).

c Rôle du portage nasal de Staphylococcus aureus dans les infections ostéo-articulaires sur prothèse

S. aureus est fréquemment retrouvé dans les flores commensales. Il colonise ainsi environ 20 à 35 % de la population adulte, selon les études (46). La population générale se divise en 3 groupes : les porteurs permanents (20 %), les porteurs intermittents (30 %) et les non porteurs (50 %). Bien que le nez soit la principale niche écologique de *S. aureus*, les colonisations extra-nasales au niveau de la peau, de la gorge et des intestins sont bien documentées (47). Le portage nasal de *S. aureus* est considéré comme un facteur de risque de développer une infection après la pose d'une prothèse (48). Toutefois, une étude récente montre que ce portage ne présage pas systématiquement d'une infection du site opératoire avec la même souche de *S. aureus* (49). A la différence de la chirurgie cardiaque (50), l'intérêt d'une décontamination nasale systématique, avant la pose de prothèse, reste à démontrer.

II.6 Classification des infections ostéo-articulaires sur prothèse

Classiquement, les infections sur prothèse sont classées en fonction du délai entre l'apparition des manifestations cliniques et la date de la chirurgie. Elles sont alors étiquetées comme « précoces », « retardées » ou « tardives ». Il est recommandé de parler d'infection précoce si elle survient dans le premier mois post-opératoire, d'infection retardée entre le 2^{ème} et le 6^{ème} mois, et d'infection tardive plus de 6 mois après la chirurgie (Tableau III, page 34 - 3).

Tableau III : Classification des infections ostéo-articulaires sur prothèse (51)

	Infection précoce	Infection retardée	Infection tardive
Délai après chirurgie	< 1 mois	1 mois – 6 mois	> 6 mois
Pathogénèse probable	Inoculation péri-opératoire	Inoculation péri-opératoire	Dissémination hémotogène
Pathogènes fréquemment impliqués	<i>Staphylococcus aureus</i> Staphylocoques à coagulase négative Bacilles à Gram négatif	Flore cutanée : Staphylocoques à coagulase négative <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Streptocoques Entérobactéries

a Infections précoces et retardées

Les infections précoces et retardées sont typiquement des infections d'origine exogène. Le premier type est associé principalement à des micro-organismes virulents comme *S. aureus* ou *Escherichia coli*, alors que les infections retardées sont principalement dues à des bactéries moins virulentes, comme les SCN ou *P. acnes* (51).

b Infections tardives

Les infections tardives apparaissent classiquement après une période asymptomatique. Leur origine est généralement hémotogène. La porte d'entrée habituelle est cutanée. Toutefois, une origine urinaire, respiratoire, intestinale voire dentaire peut être rencontrée. Souvent, aucune porte d'entrée évidente ne peut être évoquée. Il s'agit alors d'une bactériémie primaire ou d'une infection primaire déjà guérie lorsque les symptômes de l'infection sur prothèse apparaissent. *S. aureus* est la bactérie la plus fréquemment responsable d'infections sur prothèse d'origine hémotogène.

III *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une bactérie pathogène majeure de l'Homme. Elle a la capacité d'entraîner un large panel d'infections suppuratives et de maladies toxiques (52). Ces infections peuvent être circonscrites à un organe ou disséminer dans l'organisme, engageant alors le pronostic vital (52). Malgré l'utilisation optimale d'antibiotiques efficaces, la morbidité et la mortalité des infections staphylococciques graves restent élevées (52). L'étude de la physiopathologie de ces infections montre que certaines comorbidités de l'hôte (diabète, immunodépression...) sont des facteurs de risque de développer une infection grave (53). Toutefois, *S. aureus* exprime de nombreux facteurs de virulence liés à la bactérie ou excrétés dans son environnement : des protéines de surface, qui initient la colonisation des tissus de l'hôte, des facteurs inhibant la phagocytose et des toxines qui altèrent les cellules, provoquant ainsi des pathologies spécifiques (54).

Le but de cette partie est d'envisager succinctement les principaux facteurs de virulence identifiés à ce jour chez *S. aureus*.

III.1 Généralités

Les staphylocoques ont été identifiés pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle. En 1880, Pasteur a isolé ce germe bactérien, dénommé « vibron pyogénique », à partir de pus d'anthrax et chez un patient souffrant d'une ostéomyélite. En 1883, Sir Alexander Ogston, chirurgien anglais, donne le nom de staphylocoque pour ce genre bactérien qui ressemble à des grains (*kokkos* en grec) rassemblés sous forme de grappe (staphule). En 1884, Rosenbach donne une première classification à partir de la couleur des colonies observées après culture sur milieu gélosé : blanches ou dorées (Figure 8 - 55).

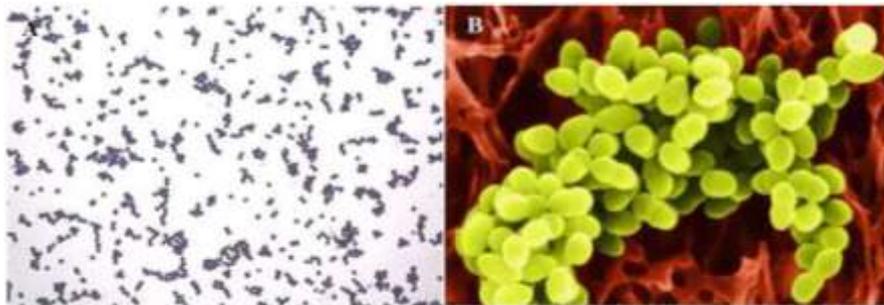


Figure 8 : *Staphylococcus aureus* en microscopie optique et microscopie électronique Organisation en grappe de *S. aureus* observé en microscopie optique après coloration de Gram (X 1000) (A) et en microscopie électronique (X 3025) (B) (56).

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de la famille des *Micrococcaceae*. Parmi les 43 espèces et sous-espèces de staphylocoques décrites, *S. aureus* est une espèce particulière. Elle s'oppose aux autres espèces d'un point de vue phénotypique et clinique. *S. aureus* produit une enzyme appelée coagulase (capable de coaguler le plasma) qui le distingue des autres espèces regroupées en staphylocoques à coagulase négative (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*...) (57). D'un point de vue clinique, *S. aureus* est l'espèce la plus pathogène et sa virulence a été reconnue dès l'ère pasteurienne. A l'opposé, le rôle pathogène des SCN n'a été établi que dans les années 80 et concerne principalement des infections subaiguës favorisées par la présence de matériel étranger (58).

Toutefois, *S. aureus* est également une bactérie commensale. En effet, elle peut coloniser la peau ou la muqueuse d'un hôte sans causer de dommage ni de réaction inflammatoire pendant des années. Son pouvoir pathogène peut s'exprimer à partir d'un site colonisé, et entraîner une infection et une réaction inflammatoire dont l'importance dépendra de l'état clinique de l'hôte, de la porte d'entrée et des capacités intrinsèques d'invasion de l'isolat de *S. aureus* incriminé. Cette bactérie, à multiples facettes, est responsable d'une grande variété d'infections dont l'expression clinique dépend de la capacité de l'isolat à produire des facteurs de virulence et à interagir avec l'hôte (53).

III.2 La capsule et la paroi de *Staphylococcus aureus*

Les polysaccharides capsulaires sont présents chez 90 % des isolats cliniques de *S. aureus* et sont classés en 11 sérotypes. Les sérotypes 5 et 8 sont les principaux rencontrés en pathologie humaine (59). Ces polysaccharides capsulaires permettent à *S. aureus* de mieux résister à la phagocytose (53). Associés aux polysaccharides excrétés dans le milieu extérieur, ils majorent les propriétés d'adhérence de *S. aureus*.

Comme tout cocci à Gram positif, la paroi de *S. aureus* est constituée d'acides lipoteichoïques et de peptidoglycane (Figure 9, page 37). Ces acides lipoteichoïques interviennent également dans l'adhérence grâce à leur domaine hydrophobe et servent de molécule d'ancrage à certaines adhésines par des liaisons électrostatiques, alors que le peptidoglycane lie de manière covalente la plupart des protéines d'adhérence (52).

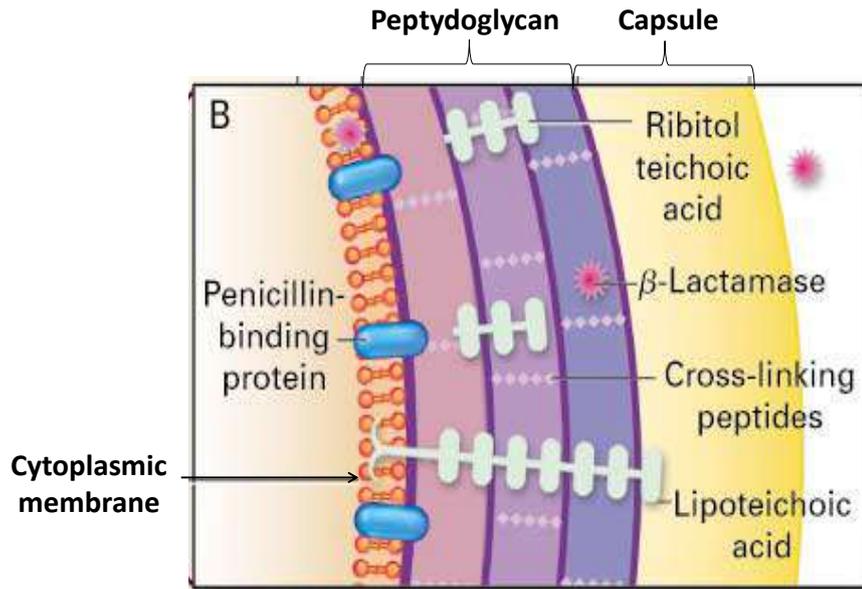


Figure 9 : Structure de la paroi de *Staphylococcus aureus* (52)

III.3 Les protéines d'adhérence exprimées à la surface de *S. aureus*

L'adhérence bactérienne est un processus indispensable avant toute invasion des tissus de l'hôte. Elle évite la clairance bactérienne par des phénomènes mécaniques et permet l'action secondaire des toxines. L'adhérence de *S. aureus* est médiée par des forces physico-chimiques (notamment des liaisons hydrophobes des acides lipoteichoïques) mais aussi par des liaisons spécifiques aux différentes molécules du plasma, aux cellules de l'hôte et aux éléments de la matrice extra-cellulaire grâce à l'expression de nombreuses adhésines (Figure 10, page 38).

Les adhésines de *S. aureus* sont principalement des protéines ancrées dans la paroi bactérienne. Elles sont regroupées au sein d'une famille appelée MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Ces protéines ont en commun plusieurs domaines : l'extrémité N-terminal constituée par le domaine S (peptide signal permettant l'acheminement de la protéine avant son insertion dans la membrane cellulaire) ; des domaines uniques ou répétées (A, B, C, D ou R, contenant le site de liaison au ligand) ; et une séquence à l'extrémité C-terminal constituée d'une région W, d'une région M (permettant l'ancrage dans la membrane cytoplasmique) encadrant le motif LPXTG (liaison covalente au peptidoglycane) (Figure 10 - 20).

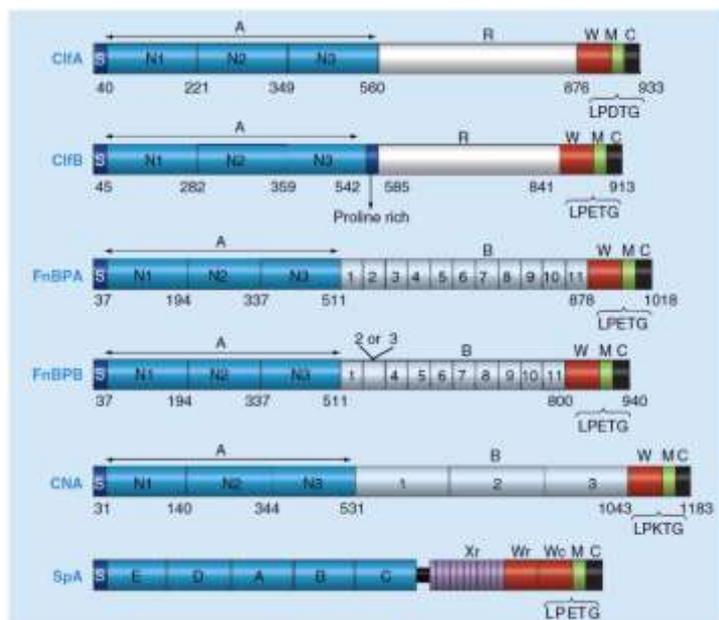


Figure 10 : Structure des MSCRAMMs chez *Staphylococcus aureus* (20)

ClfA : Clumping factor A, ClfB : Clumping factor B, FnBPA : Fibronectin Binding Protein A, FnBPB : Fibronectin Binding Protein B, Cna : Protéine de liaison au collagène, Spa : Protéine A.

Ces adhésines permettent à *S. aureus* de se lier aux protéines de la matrice extracellulaire telles que le fibrinogène, la fibronectine, le collagène, mais aussi la vitronectine, la laminine, la thrombospondine, la sialoprotéine osseuse, l'élastine, ou le facteur Von Willebrand.

a La protéine de liaison au collagène : Cna

Cette adhésine, ayant pour ligand la forme monomérique du collagène, permet également l'adhérence au tissu cartilagineux. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (Tableau IV, page 40). En modèle animal, la protéine Cna se révèle être un facteur de virulence impliqué dans l'endocardite, l'ostéomyélite, l'arthrite et la kératite. Son expression est prédominante à la phase exponentielle de croissance de la bactérie. Sa prévalence est importante parmi les isolats cliniques (60).

b Les protéines de liaison à la fibronectine A et B : FnBPA/FnBPB

Ces adhésines, ayant pour ligands la fibronectine et l'élastine, jouent un rôle prédominant dans la colonisation du tissu de l'hôte. Les récepteurs à la fibronectine

contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. En participant au développement d'un biofilm, ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers. Ces protéines permettent à la bactérie de coloniser l'endothélium et d'envahir les tissus grâce à la liaison entre la fibronectine et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des cellules de l'hôte. Elles induisent des réponses endothéliales pro-inflammatoires et pro-coagulantes, mais également l'activation et l'agrégation plaquettaire. En modèle animal, ces facteurs de virulence semblent impliqués dans les mécanismes conduisant à l'endocardite (61).

c La protéine A : SpA

Plusieurs ligands de la protéine A ont été décrits : IgG, IgM, facteur de Von Willebrand (vWF) et récepteur du TNF α (Tableau IV, page 40). Ainsi, cette protéine possède de nombreuses activités :

- Après s'être liée aux IgG, elle empêche la reconnaissance du fragment Fc des Ig par les polynucléaires neutrophiles, interférant ainsi avec la phagocytose.
- Elle entrave la voie classique d'activation du complément.
- Elle altère la prolifération des lymphocytes B, en se fixant aux IgM.
- En permettant la fixation des bactéries aux plaquettes *via* le vWF, elle provoque des dégâts vasculaires.
- Sa liaison au récepteur du TNF α dans les voies aériennes supérieures est un facteur primordial de la pathogénèse des pneumonies.
- Son rôle d'adhésine, au début de l'infection intra-vasculaire, en fait un composant essentiel dans la formation de biofilm (62).

d Les protéines de liaison au fibrinogène : ClfA et ClfB

La protéine ClfA provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Elle participe également à l'échappement au système immunitaire, inactivant les composés C3b et iC3b du complément et inhibant la phagocytose. En modèle animal, ce facteur a montré son implication dans l'arthrite de la souris, ainsi que dans l'endocardite du rat et du lapin (52). Cette protéine, exprimée à tous les stades de la croissance bactérienne, est retrouvée chez presque tous les isolats cliniques étudiés.

Comme ClfA, la protéine ClfB permet l'agrégation plaquettaire (Tableau IV). Elle exerce un rôle majeur dans les phénomènes d'adhérence à l'origine de colonisation des narines (52).

e Les protéines "Serine-aspartate dipeptide repeat" : Sdr

Trois protéines ont été décrites : SdrC, SdrD et SdrE. Chaque protéine Sdr conférerait une adhérence à un tissu cellulaire spécifique (Tableau IV). Ainsi, SdrC améliore l'adhérence aux cellules de mammifère exprimant la β -neurexine. SdrC et SdrD contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux cellules squameuses. SdrD pourrait avoir un rôle dans l'interaction entre la bactérie et le système immunitaire. SdrD et/ou SdrE pourraient être plus fréquemment présentes chez les souches de *S. aureus* responsables d'infections osseuses (63). SdrE peut induire l'agrégation plaquettaire. Les trois gènes à l'origine de leur synthèse ne sont pas toujours présents mais *S. aureus* possède toujours au moins deux de ces gènes, disposés en tandem. Le gène *sdrC* est présent chez la plupart des isolats. Aux USA, les isolats possédant les trois gènes sont plus fréquemment des SARM que des SASM (*Staphylococcus aureus* Sensibles à la Méricilline) (63).

f Bone sialoprotein-binding protein : Bbp

Cette protéine confère à la bactérie un tropisme pour le tissu osseux (Tableau IV). Ainsi, il a été montré que Bbp joue un rôle dans la physiopathologie de l'ostéomyélite, avec production d'anticorps anti-Bbp chez l'hôte. Son implication dans les I.O.A. sur matériel est moins claire (64,65).

Tableau IV : Principales protéines de surface de *Staphylococcus aureus* (20)

Abréviation	Nom complet de la protéine	Ligands
Bbp	Protéine de liaison à la sialoprotéine de l'os	Sialoprotéine de l'os
ClfA	Protéine de liaison au fibrinogène A	Chaîne γ du fibrinogène – Fibrine
ClfB	Protéine de liaison au fibrinogène B	Chaînes α et β du fibrinogène – cytokératine 10
Cna	Protéine de liaison au collagène	Collagène
FnBPA	Protéine de liaison à la fibronectine A	Fibronectine, fibrinogène, élastine
FnBPB	Protéine de liaison à la fibronectine B	Fibronectine, élastine
Sdr	Les protéines "Serine-aspartate dipeptide repeat"	divers
Spa	Protéine A	Facteur de Von Willebrand, IgG, IgM

III.4 Les protéines sécrétées par *Staphylococcus aureus*

a Les sidérophores du système Isd

Le fer est indispensable à la croissance des staphylocoques. La bactérie capte le fer grâce aux récepteurs de surface cellulaire du système Isd (Iron regulated Surface Determinants). L'une des méthodes de défense de l'hôte est la diminution de la fraction disponible du fer (fixation à la lactoferrine et à la transferrine). Ainsi, *S. aureus* s'adapte en sécrétant des sidérophores, capables de « capturer » et de transporter le fer dans la bactérie. La quantité de sidérophores produits dépend de l'origine des souches. Certaines souches virulentes de *S. aureus* pourraient produire deux types de sidérophores : un premier, dont la production serait contrôlée par des gènes chromosomiques et un second, dont la synthèse en quantité plus importante est assurée par des gènes plasmidiques (53).

b La leucocidine de Panton et Valentine

Si le rôle des gènes codant pour la leucocidine de Panton et Valentine (*pvl*) est avéré dans les abcès cutanés et les pneumopathies nécrosantes, leur présence chez 66,3 % des souches de *S. aureus* responsables d'ostéomyélite aiguë hémotogène a été associée à un risque accru de bactériémie, d'inflammation systémique sévère et d'hospitalisation en soins intensifs (65,66).

c Entérotoxines, TSST-1 (toxine du choc staphylococcique) et exfoliatines

Les différentes toxines présentées dans le tableau V sont impliquées dans les toxémies staphylococciques : choc toxique staphylococcique pour la TSST-1, syndrome d'exfoliation généralisé (ou syndrome de la peau ébouillantée) pour les exfoliatines, toxi-infections alimentaires pour les entérotoxines (67).

Tableau V : Principales protéines sécrétées par *Staphylococcus aureus* (67)

Superantigènes	Cytoxines	Enzymes
Entérotoxines A à E	Hémolysines (α , β , δ , et γ)	Protéases
Toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1)	Leucocidine de Panton et Valentine	Nucléases
Toxines exfoliatives (ET A, B et D)		Lipases Hyaluronidases Collagénases

III.5 Le gène régulateur accessoire *agr*

La virulence, perçue comme une stratégie de survie pour une bactérie donnée, n'est pas simplement une propriété associée à un seul déterminant, mais doit plutôt être considérée comme la résultante d'une combinaison d'attributs, incluant les adhésines, les invasives, et les toxines, dont l'expression est régulée avec succès par un polymorphisme approprié des gènes régulateurs. Ainsi, le locus du gène régulateur accessoire (*agr*), associé au système du quorum-sensing chez *S. aureus*, est connu pour orchestrer l'expression de gènes de toxines et de molécules d'adhérence (68).

Certaines données récentes ont identifié des ensembles de gènes de virulence distincts, associés au polymorphisme du locus *agr*, chez les souches de *S. aureus* responsables d'infections sur implant (68). En fonction du type de locus *agr*, les isolats baseraient leur stratégie de survie sur diverses adhésines alternatives, ou bien sur un ensemble d'adhésines. Ainsi, à partir de l'analyse de 200 souches de *S. aureus* isolées d'I.O.A.M., Montanaro et al observaient que les isolats appartenant à l'*agr* de type III possédaient généralement la protéine Bbp (absente, en général, des isolats possédant l'*agr* des types I et II) et la protéine Cna (Figure 11 - 68).

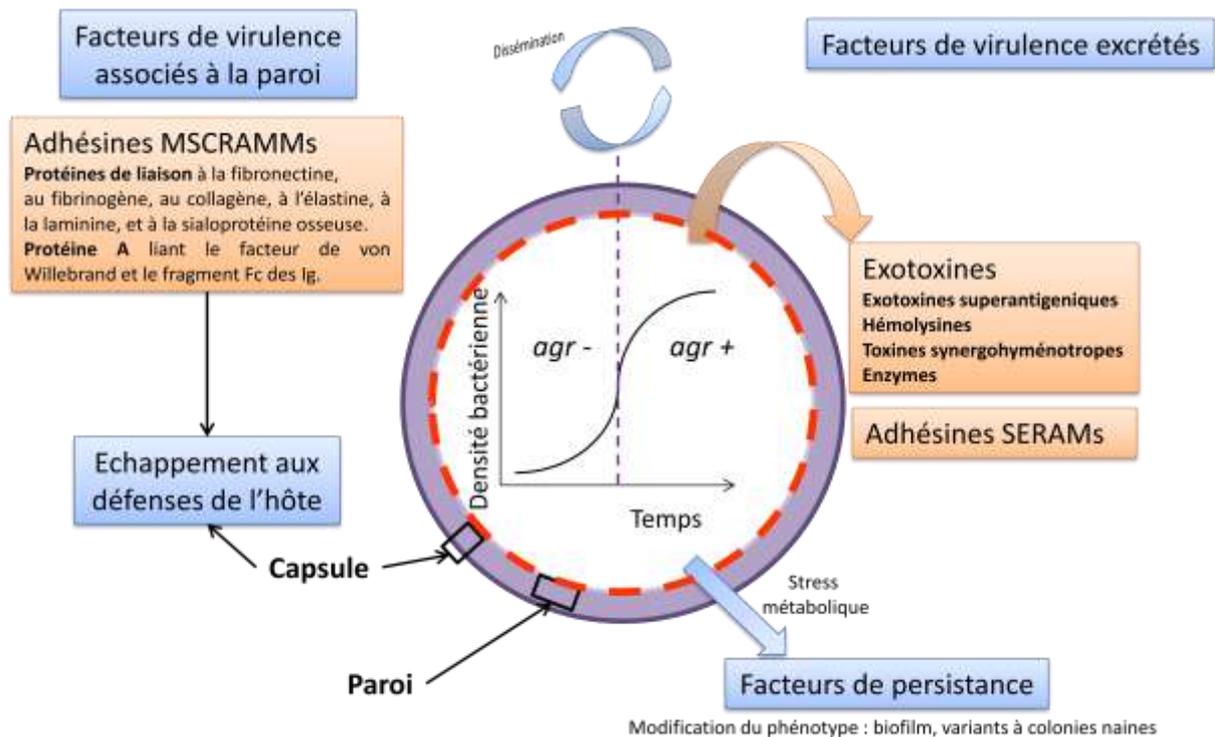


Figure 11 : Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par *Staphylococcus aureus* en fonction de la densité bactérienne (55)

IV Gènes impliqués dans la formation du biofilm chez *Staphylococcus aureus*

IV.1 Généralités

Les infections associées aux prothèses articulaires sont typiquement provoquées par des micro-organismes produisant du biofilm (4). A l'intérieur du biofilm, ces micro-organismes sont entourés d'une matrice polymérique, se développant au sein de communautés organisées, complexes, avec une hétérogénéité structurale et fonctionnelle. Après les premières phases d'adhérence, lorsque la densité microbienne devient importante, le volume libéré de médiateurs de communication intercellulaire est suffisant pour activer des gènes impliqués dans la production de biofilm. Ce phénomène est appelé quorum-sensing. Au sein du biofilm, les bactéries sont protégées des antibiotiques et des défenses immunitaires. Elles sont ainsi plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries planctoniques (69). Cette résistance est due à une croissance limitée des bactéries, au sein du biofilm (ralentissement du métabolisme). Elles sont alors en phase stationnaire de croissance, probablement en raison d'une diminution de la pénétration des composés nécessaires à leur métabolisme, comme le glucose ou l'oxygène (1).

IV.2 Formation du biofilm

Dans les infections associées à du matériel, après la phase de colonisation initiale grâce aux adhésines, *S. aureus* peut produire un biofilm. Au sein du biofilm, les bactéries se recouvrent elles-mêmes d'une matrice extracellulaire (« slime »), qui les maintient ensemble et les attache fermement à la surface de l'implant (1). Cette matrice autoproduite comporte des polysaccharides, des protéines et de l'ADN extracellulaire. Dans les études initiales avec des SCN, la production de « slime » était considérée comme un facteur de virulence, en particulier chez *S. epidermidis* (70). Puis, un fort pourcentage de souches de *S. aureus* s'est révélé capable de produire ce matériel extracellulaire visqueux, à condition qu'une source d'hydrate de carbone soit ajoutée dans le milieu de culture (71).

La formation du biofilm se déroule en 4 étapes :

- fixation initiale des bactéries,
- accumulation de plusieurs couches de bactéries,
- maturation du biofilm,
- détachement de quelques cellules planctoniques du biofilm, pour initier une nouvelle formation de biofilm, à un autre niveau (Figure 12).

Les premières interactions avec le matériel sont donc non spécifiques, principalement de nature hydrophobe. La fixation initiale se fait grâce à des protéines spécifiques, les autolysines (72). Chez *S. aureus*, l'autolysine/adhésine est AtlA. La fixation initiale sur le matériel est également assurée par les MSCRAMMs, qui interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte, recouvrant la surface du matériel. Les protéines liant la fibronectine (FnBPs), exprimées à la surface de la bactérie, sont également nécessaires à *S. aureus* pour permettre l'adsorption aux ostéoblastes (72).

Dans un second temps, l'adhérence intercellulaire est due à la production de PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), qui est composée de β -1,6 glucosaminylglucane linéaire, dont la synthèse est régulée par le locus d'adhérence intercellulaire *ica* (opéron *icaABCD*). Initialement découvert et étudié chez des souches de *S. epidermidis* puis chez des souches de *S. aureus*, ce locus a longtemps été considéré comme codant pour un facteur de virulence, ce qui n'est plus le cas actuellement (73).

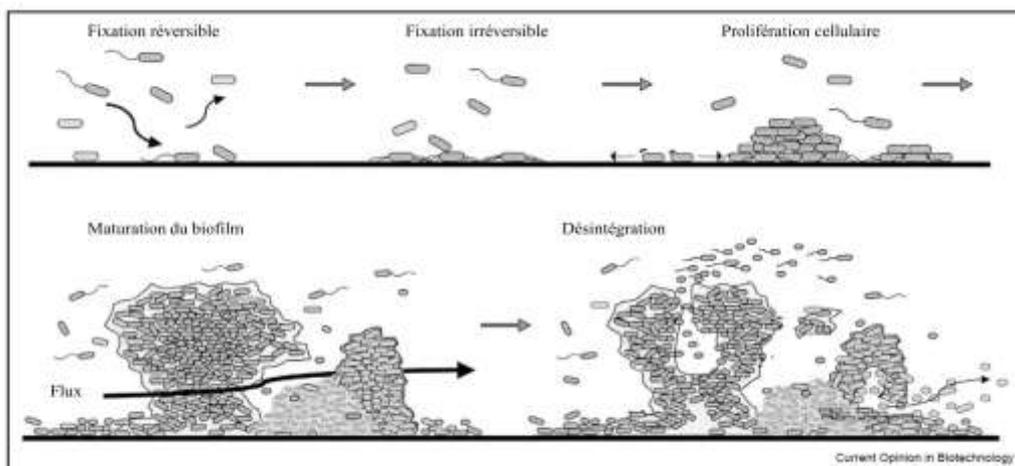


Figure 12 : Le cycle de développement du biofilm bactérien (74)

IV.3 Rôle du locus *agr*

Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'expression de l'opéron *ica* dépend de nombreuses conditions environnementales, comme la composition du milieu de culture. Ainsi, la présence d'éthanol, le taux de sel ou de fer dans le milieu font varier la production de biofilm (75). Le stress environnemental n'est pas le seul facteur faisant varier cette production. En effet, la densité bactérienne régule aussi la production de biofilm, au moyen de molécules signal, dites autoinductrices, exprimées par le système de quorum-sensing. Chez les staphylocoques, le système de régulation *agr* est activé, pendant la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire, par un mécanisme d'auto-régulation impliquant une protéine phéromone modifiée, témoin de la densité bactérienne (76). Chez *S. aureus*, le système de quorum-sensing *agr* contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence, comme les toxines staphylococciques, les adhésines au collagène, à la fibronectine ou au fibrinogène, ainsi que la synthèse des polysaccharides capsulaires de surface, perturbant la phagocytose (77).

Néanmoins, le rôle du système *agr* sur la production de biofilm reste controversé. L'expression du système *agr* devrait réduire la production de biofilm mais, selon O'Gara, son influence sur la capacité à produire un biofilm peut varier de manière opposée (positivement ou négativement), reflétant peut-être ainsi la réponse du système de quorum-sensing aux influences de l'environnement extérieur (78).

IV.4 Autres gènes impliqués

Les conditions de production d'un biofilm demeurent complexes et il a été montré qu'elles dépendaient d'autres mécanismes de régulation, comme le gène *sar* qui code pour SarA (staphylococcal accessory regulator), une protéine staphylococcique qui participe à l'augmentation de la production de biofilm, en influençant la transcription d'*ica* et la production de poly-*N*-acétylglucosamine (79). Un autre système de régulation en lien avec le système *agr*, impliqué dans la formation de biofilm, est constitué par la cible du peptide activant RNAIII, dont l'augmentation induit la croissance en biofilm (80). Enfin, le biofilm peut également être sous l'influence d'une voie indépendante de l'opéron *ica*, basée sur des protéines concourant à l'adhérence bactérienne, comme la protéine associée au biofilm Bap (81).

Un autre composant contribue à la fixation initiale des bactéries et à la phase d'accumulation, lors de la formation du biofilm : l'ADN extracellulaire (ADNe). Chez *S. epidermidis*, l'ADNe présent dans le biofilm est identique à l'ADN génomique et provient de la lyse, par l'autolysine AtlE, d'une petite sous-population bactérienne (82). Chez *S. aureus*, la lyse cellulaire est due aux hydrolases de la muréine, contrôlées par les opérons *cidA* et *IrgA*, codant respectivement pour des protéines similaires aux holines et antiholines, et régulant la lyse cellulaire de façon analogue à celle observée lors de la lyse cellulaire par les bactériophages (83).

La libération d'ADNe, participant au développement et à la stabilisation du biofilm, peut aussi avoir un rôle important dans les mécanismes à l'origine des transferts de gènes. Ces échanges favorisent une potentielle dissémination rapide de facteurs de virulence ou de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment en cas de pression de sélection (Figure 13 - 74).

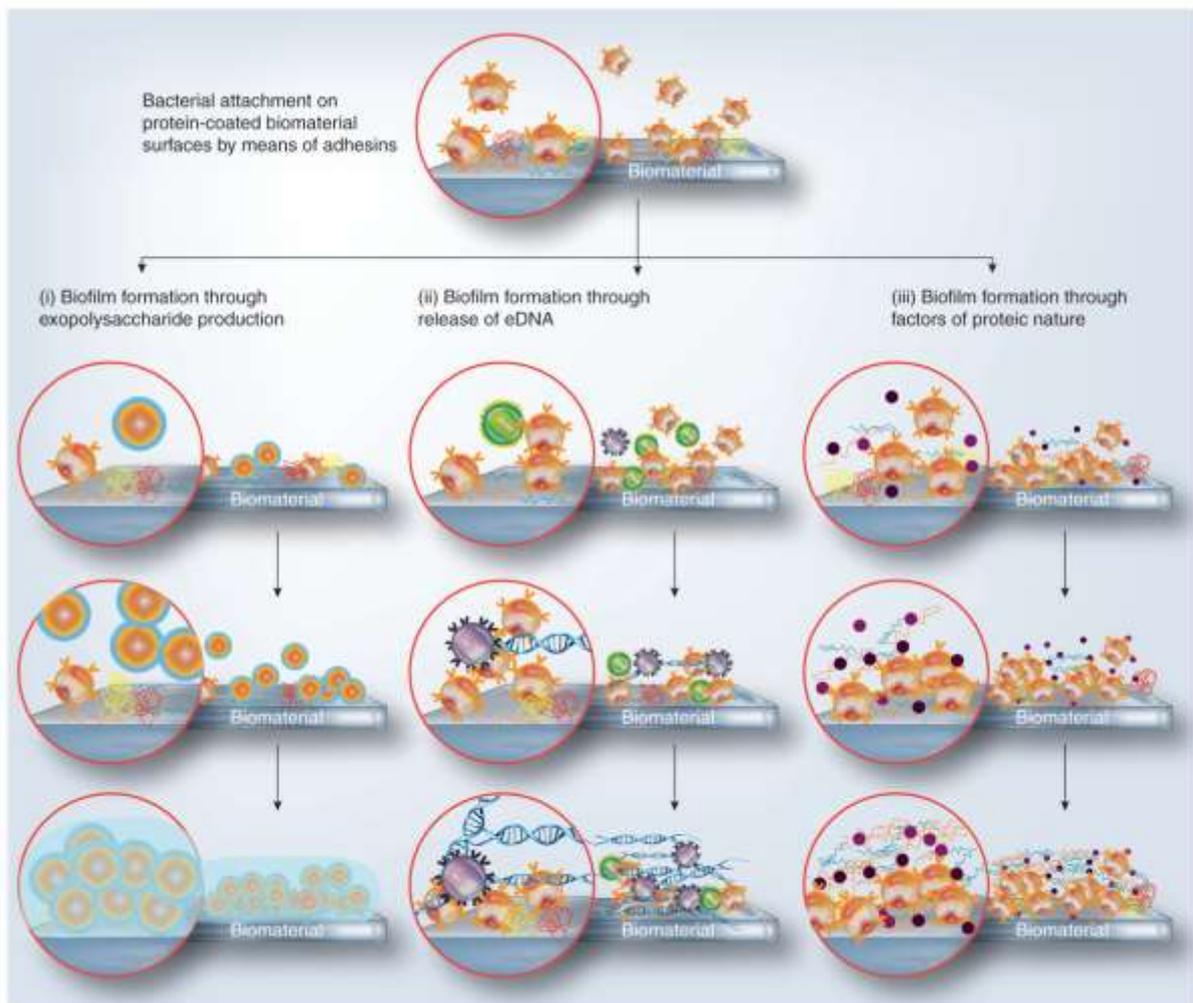


Figure 13 : Processus à l'origine de l'adhérence et de la fixation des bactéries à la surface d'un biomatériau (61)

Au sein d'un biofilm, les bactéries sont résistantes aux antibiotiques, aux désinfectants, à la phagocytose, ainsi qu'aux mécanismes immunitaires de l'hôte. Cet échappement des bactéries à la surveillance du système immunitaire et au traitement antibiotique impacte nécessairement la prise en charge globale des patients. Par conséquent, le traitement nécessite, dans un premier temps, un geste chirurgical complet comportant un débridement extensif de l'articulation, associé à un lavage rigoureux, l'excision de l'os et des tissus infectés, voire fréquemment, un changement du matériel prothétique puis, secondairement, un traitement antibiotique prolongé et adapté à la documentation microbiologique (61,84).

A ce jour, il ne semble pas exister, sur la base des données obtenues avec les outils disponibles, de corrélation entre une sous-population de souches de *S. aureus* et un déterminant génétique particulier, expliquant la pathogénèse des infections osseuses (8).

Les échecs de nombreuses tentatives, pour établir une relation entre un unique déterminant moléculaire et le devenir clinique, ont poussé récemment à une approche plus globale, non limitée aux membres d'un virulon bien défini (ensemble de 50 gènes accessoires codant pour des facteurs sécrétés ou exprimés à la surface bactérienne et facilitant la pathogénèse de *S. aureus* - 85), mais en considérant le génome entier, incluant les séquences codantes et non codantes. Pour les pathogènes responsables d'un large éventail de maladies, comme *S. aureus*, la complexité des mécanismes implique différentes stratégies d'infection, chacune adaptée à l'état des défenses immunitaires de l'hôte. Une meilleure compréhension du rôle des différentes adhésines et toxines, chez les clones les plus fréquents, ainsi que de leur « valeur ajoutée » en terme de virulence acquise, semble être l'approche la plus rationnelle pour élaborer, à terme, de nouvelles stratégies anti-infectieuses avec un impact plus large, venant en complément des antibiotiques.

Dans ce contexte, les infections sur prothèse sont particulièrement visées, en raison, d'une part, de l'impact sur la population, en termes de fréquence et de conséquences potentielles et, d'autre part, de l'immunodépression locale au sein des tissus, qui offre une opportunité de se développer à des bactéries supposées moins virulentes. Un implant, en tant que locus *minoris resistentiae*, représente donc un creuset où se créent les conditions d'apparition de nouvelles espèces émergentes (61,86).

2^{ème} partie : Etude expérimentale

I Introduction

De nombreuses études se sont intéressées, d'une part, aux mécanismes génétiques impliqués dans la formation du biofilm et, d'autre part, aux gènes associés aux processus physiopathologiques des infections osseuses à *S. aureus*. Néanmoins, ces études portaient généralement sur un effectif restreint d'échantillons, constituant des cohortes hétérogènes de souches de *S. aureus* avec l'investigation d'un nombre limité de gènes (8,61).

L'objectif de notre travail de Thèse était d'analyser les caractéristiques génétiques et phénotypiques d'un nombre significatif d'isolats cliniques de *S. aureus* responsables uniquement d'I.O.A. sur matériel, ou isolés dans les fosses nasales de patients ambulatoires de la même filière de soins. La découverte d'éventuels liens entre toutes les données recueillies devrait permettre d'établir un profil génétique de virulence des isolats responsables d'infections et de colonisation.

La première partie a consisté à typer, sur le plan moléculaire, deux cohortes de souches de *S. aureus* responsables, d'une part, d'I.O.A. sur matériel et, d'autre part, de colonisation nasale. Pour cela, trois techniques complémentaires ont été mises en œuvre :

- l'électrophorèse en champs pulsés,
- le M.L.S.T.,
- et enfin l'analyse de plus de 300 gènes de *S. aureus*, grâce à la technique innovante de puce à ADN (Aleré, Jouy-en-Josas, France), en collaboration avec l'équipe I.N.S.E.R.M. U1047 de l'Université de Montpellier (Pr. Jean-Philippe Lavigne).

Dans une seconde partie, nous avons adapté une technique à la résazurine, permettant d'estimer la capacité à produire du biofilm des différentes souches sélectionnées, dans nos conditions expérimentales.

Dans une dernière partie, l'analyse des premiers résultats nous a conduit à développer, au sein de l'équipe de recherche et en partenariat avec l'équipe « Signalisation et Réseaux de régulations bactériens » du C.N.R.S. d'Orsay (Dr. Philippe Bouloc), une investigation du rôle du gène *bbp*, dans la capacité à former un biofilm. Pour cela, la mise au point d'une technique d'inactivation d'un gène par recombinaison homologue a été initiée, à partir d'une sélection de souches de *S. aureus* fortement productrices de biofilm, dans nos conditions expérimentales.

II Matériel et méthodes

II.1 Caractéristiques des souches de *S. aureus* sélectionnées pour l'étude

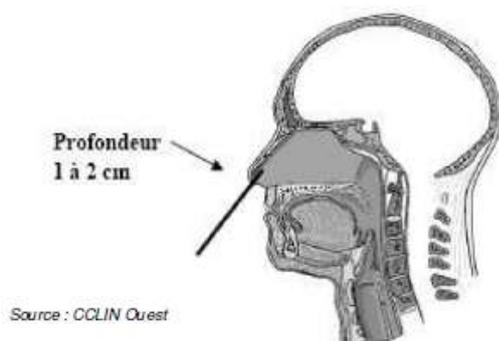
Les isolats de cette étude ont été conservés à -80°C, en milieu T.S.B. glycérolé à 10 %.

a Souches de S. aureus responsables d'I.O.A. sur matériel

L'exploration de la base de données du service de Bactériologie-Hygiène du C.H.U. de Nantes a permis de retrouver **57 souches** de *S. aureus* responsables d'I.O.A. sur matériel, entre 2007 et 2010. Un antibiogramme a été réalisé sur chaque souche grâce à la technique automatisée Vitek2® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les données cliniques des patients ont été recueillies à partir de leurs dossiers médicaux. L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide des logiciels Excel® et Epi-info®.

b Souches de S. aureus responsables de portage nasal

Cent patients ambulatoires consultant dans le service d'Orthopédie ont été dépistés, entre Janvier et Mars 2012, après avis favorable du Comité de Protection des Personnes et en accord avec la Direction de la Recherche Clinique du C.H.U. de Nantes. La technique de prélèvement est exposée dans la figure 14. Parmi ces 100 patients, **31 étaient colonisés par S. aureus**, au niveau des fosses nasales. Les souches ont été isolées sur milieu sélectif de type Chapman (87). L'identification des isolats mannitol positif a été effectuée par une technique d'agglutination de billes de latex sensibilisées (Phadebact®, Bactus AB, Norvège). En cas de résultats douteux, l'identification a été confirmée à l'aide du système Vitek2® (bioMérieux).



- Prélever à l'écouvillon humide (sérum physiologique ou eau stérile),
- Insérer l'écouvillon dans la narine antérieure du patient (1-2 cm) et recueillir les sécrétions nasales en effectuant 5 rotations complètes de l'écouvillon,
- Répéter la même procédure dans l'autre narine du patient sans changer d'écouvillon.

Figure 14 : Procédure de dépistage du portage nasal de *Staphylococcus aureus* en application au C.H.U. de Nantes

II.2 Extraction de l'ADN

a Extraction de l'ADN génomique pour les réactions de PCR

Elle a été réalisée à l'aide de la technique InstaGene[®] (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), selon les recommandations du fournisseur.

b Extraction de l'ADN génomique pour l'analyse sur puces à ADN

L'analyse sur biopuces à ADN nécessite une concentration d'ADN d'une grande pureté, de l'ordre de 200 ng/μL. Par conséquent, l'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'une culture fraîche sur gélose au sang, en optimisant le protocole du kit « QIAamp[®] DNA mini kit » (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ainsi, une étape préliminaire de lyse bactérienne par un mélange de lysostaphine à 2 mg/mL, de lysozyme à 10 mg/mL et de RNase A à 10 mg/mL (Sigma-Aldrich[®], Lyon, France) a été ajoutée, afin d'augmenter le rendement de l'extraction et la pureté de l'ADN.

c Dosage de l'ADN

La quantité d'ADN extrait a été évaluée et calibrée par spectrophotométrie U.V. à 260 nm (NanoDrop[®] 1000, Thermo scientific, Villebon-sur-Yvette, France). A cette longueur d'onde, une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 μg/mL d'ADN double brin. La pureté de l'ADN était confirmée par un rapport des absorbances à 260 et 280 nm compris entre 1,8 et 2.

II.3 Génotypage

a Electrophorèse en champs pulsés (P.F.G.E)

L'électrophorèse en champs pulsés permet la comparaison d'isolats de *S. aureus* en fonction de leur profil électrophorétique de macrorestriction (pulsotypes), après digestion par l'enzyme *SmaI* (ou *ApaI* pour les isolats appartenant au complexe clonal 398). Les impulsions initiales et finales étaient respectivement de 0,5 et 20 secondes. La durée de migration était de 20 h à 14°C, sous un voltage de 6 V/cm. L'analyse des profils a été réalisée à l'aide du logiciel FPQuest[®] v5.1, selon les critères de différenciation déterminés par Tenover (88).

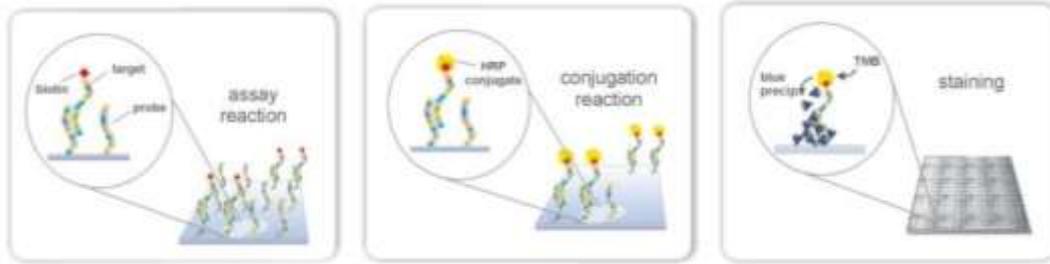
b Multi Locus Sequence Typing (M.L.S.T.)

Cette technique est basée sur le séquençage de sept gènes domestiques. Les conditions d'amplification génique et les amorces ont été décrites par Enright et al (89). Après séquençage des produits de PCR obtenus, un type de séquence (ST) ou profil allélique a été attribué à chaque souche. Tous les ST ayant cinq allèles communs ont été regroupés dans un même complexe clonal (CC). Une banque de données est disponible sur Internet (<http://saureus.mlst.net/>). Cette technique, moins sensible aux variations du génome que la technique de P.F.G.E., permet de faire de la macro-épidémiologie, ainsi que des comparaisons inter-laboratoires. Le M.L.S.T. est plutôt adapté à l'étude de la phylogénie des souches de *S. aureus*.

Le séquençage des amplicons a été réalisé par la plateforme de l'Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, dans le cadre de la Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, à l'aide de l'appareil 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Courtabœuf, France). Les résultats ont été analysés grâce au logiciel SeqScape Software[®] v2.5 (Applied Biosystems).

c Puces à ADN Alere

Les kits « StaphyType[®] » commercialisés par la société Alere permettent un génotypage. Ce « pathotypage » est rapide et fiable, grâce à une technique de « micro-array ». Ce test est basé sur une hybridation spécifique entre un produit marqué à la biotine et de courtes sondes nucléotidiques greffées sur la puce. En une seule manipulation, grâce à l'hybridation de l'ADN cible aux différentes sondes nucléotidiques de la puce, la présence de 334 des principaux gènes de résistance et de virulence de *S. aureus* est criblée. Le protocole utilisé pour la réalisation des puces était conforme aux instructions du fournisseur (30). La réaction de PCR était réalisée à partir d'une concentration calibrée en ADN bactérien (entre 200 et 300 ng/μL). Le produit de PCR correspond aux différentes séquences cibles marquées à la biotine ; il était ensuite déposé dans un puits contenant la puce. L'hybridation du produit de PCR sur la puce s'effectuait à 55°C, sous agitation, durant une heure. Après différents lavages, l'anticorps dirigé contre la biotine (streptavidine) et portant l'activité peroxydase était déposé à la surface de la puce (Figure 15, page 53). La révélation s'effectuait par ajout d'un substrat chromogénique de la peroxydase : le Seramun Grün (analogue de la 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine).



Au fond de chaque puits se trouve la puce à ADN.



Photo d'une puce à ADN après révélation :

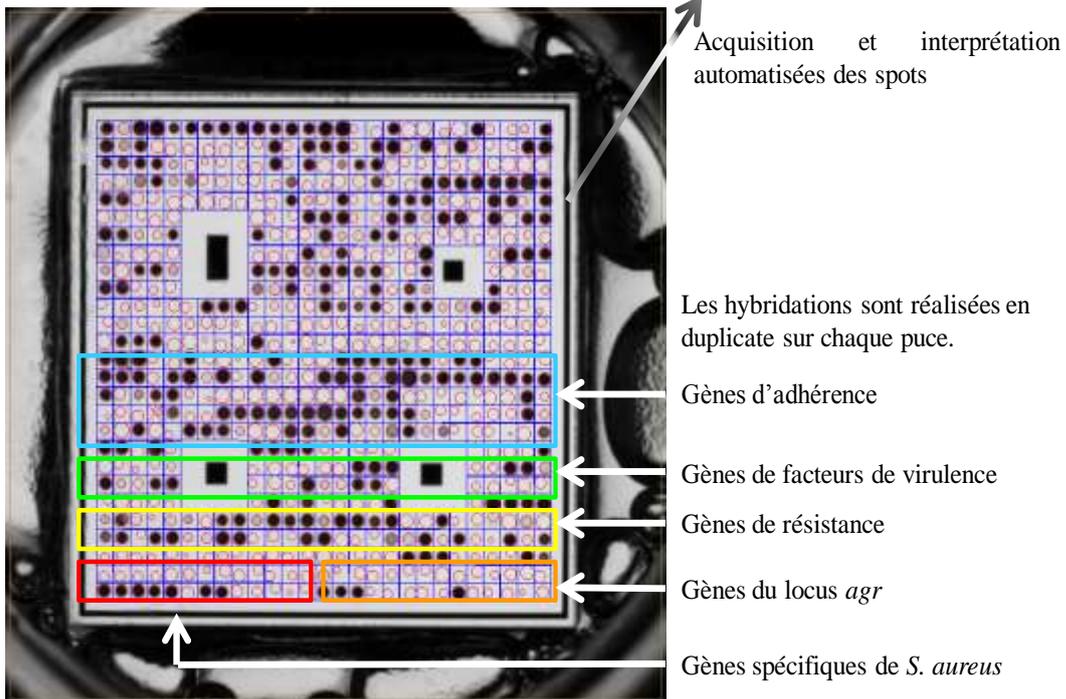


Figure 15 : Principe et description de la puce à ADN Alere pour le génotypage de *Staphylococcus aureus*.

II.4 Analyse phénotypique : étude de la formation du biofilm

Les tests utilisés ont permis d'évaluer *in vitro* la capacité d'adhérence des souches de *S. aureus* aux parois d'une cupule plastique. Pour chaque souche, quatre puits d'une plaque 96 puits ont étéensemencés. La souche de *S. epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) a été utilisée comme témoin positif. Quatre puits témoin négatif, contenant 200 µL de bouillon Trypticase-Soja (TSB), ont été utilisés en parallèle, sur chaque plaque.

Aucune standardisation n'existant pour ces techniques (90), le protocole a donc été mis au point à partir de plusieurs références bibliographiques (Tableau VI, page 55 (91–94)). Les isolats ont été systématiquement cultivés deux fois à 24 h d'intervalle, à partir des souches conservées à -80°C avant d'ensemencer 5 mL de bouillon T.S. Dans chaque cupule de la plaque 96 puits, une dilution au 1/100 d'une suspension bactérienne standardisée à 0,5 McFarland, obtenue à partir du bouillon précédent, a été déposée. La plaque a ensuite été incubée à 37°C pendant 24 h, avant d'être révélée par une des deux techniques suivantes.

a Technique à la résazurine

La résazurine, colorant non toxique soluble dans l'eau, est réduite par des réactions de transferts d'électrons associés à la respiration. Le produit de cette réaction, la résosfurine, molécule également soluble dans l'eau, est aisément mesurable par fluorospectrophotométrie (95). Lors de sa réduction, la résazurine change de couleur, allant du bleu au rose puis à l'incolore, au fur et à mesure que l'oxygène quitte le milieu.

La 1^{ère} étape de la réduction est due à la perte d'un atome d'oxygène faiblement lié à l'atome d'azote du noyau phénoxazine. Ce passage à la résosfurine rose est irréversible, y compris en présence d'oxygène atmosphérique, et il est en grande partie indépendant du potentiel d'oxydo-réduction et de la teneur en oxygène. La seconde étape de la réduction vers un état incolore est réversible en présence d'oxygène atmosphérique.

La résazurine est très stable dans un milieu de culture sans cellules, mais elle est rapidement réduite, en présence de cellules vivantes. Cette technique mesure donc les bactéries métaboliquement actives (96).

Les 96 puits de la plaque, préalablement incubée durant 24 h à 37°C, ont été lavés deux fois avec 200 µL de PBS (Phosphate Buffered Saline), puis 200 µL de bouillon T.S. ont été ajoutés, ainsi que 10 µL de résazurine (700 µM). Ensuite, la plaque a été incubée durant

30 minutes à température ambiante, avant mesure de la fluorescence avec un spectrofluorimètre (Packard Fluorocount™).

Chaque isolat a été testé dans trois plaques différentes, lors de trois expérimentations différentes.

Tableau VI : Comparaison des différentes techniques de mise en évidence du biofilm bactérien, à l'aide de la résazurine.

	Toté et al (91)	Sandberg et al (92)	Peeters et al (93)	Nyame et al (94)	Notre étude
Conservation des bactéries	Congélation à -80°C	non précisé	non précisé	Congélation	Congélation à -80°C
Milieu d'ensemencement	TSB à 37°C	TSB 37°C	TSB	TSB après repiquage sur gélose TS	TSB 37°C après 2 repiquages
Standardisation de l'inoculum	10 ⁶ CFU/mL	10 ⁸ CFU/mL	non précisé	DO à 0,025	10⁸ CFU/mL (0,5 McF)
Dilution de l'inoculum standardisé	non	1/100	non précisé	non	1/100
Type de plaque	fond plat	fond plat	fond rond	fond rond	fond plat
Volume d'inoculum par puits	100 µL	200 µL	100 µL puis 4 h d'incubation puis lavage 100 µL d'eau physiologique puis 100 µL de TSB	500 µL	200 µL
Nombre de duplicates	8, blanc: TSB	non précisé	non précisé	4	4, blanc : TSB
Durée d'incubation	72 h à 37°C sous agitation et changement milieu toutes les 24h	18 h à 37°C sous agitation	24 h	24 h	24 h à 37°C sans agitation
Lavage	PBS (X2)	non précisé	eau physiologique	PBS (X3)	PBS (X2)
Volume de milieu par puits	200 µL de TSB	200 µL de TSB	100 µL d'eau physiologique	résazurine pure	200 µL de TSB
Volume de résazurine par puits	10 µL (0,5 µg par puits)	10 µL (à différentes concentrations)	20 µL	200 µL 50 ng/µL	10 µL (700 µM)

b ***Technique au Crystal violet***

Cette technique de référence, initialement décrite par Christensen (97), est basée sur la coloration du cytoplasme des bactéries ayant adhéré à la surface de la plaque. Le crystal violet est un colorant basique, qui se lie aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire. Cette technique met en évidence la biomasse, que les bactéries soient vivantes ou mortes (93).

Après 24 h d'incubation, les bactéries n'ayant pas adhéré aux parois du puits ont été éliminées par deux lavages successifs avec 200 µL d'eau distillée stérile (EDS). La coloration des bactéries adhérentes a été réalisée par addition de 200 µL de crystal violet à 1 %. Après 10 minutes d'incubation, quatre lavages avec 200 µL d'EDS ont été effectués successivement, afin d'éliminer l'excès de crystal violet. L'ajout de 200 µL d'éthanol absolu libère le crystal

violet. La mesure à 560 nm de l'absorbance de la solution d'éthanol ainsi obtenue a permis d'évaluer l'adhérence cellulaire.

Les résultats obtenus avec la technique à la résazurine ont été confirmés, pour quelques isolats caractéristiques, par cette technique de référence, lors de trois expérimentations différentes.

c Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats obtenus a été adaptée de celle proposée par Stepanovic et al (98). Une valeur seuil « y » a été définie à partir de la moyenne « x » et de la moyenne des écarts-types « σ » des valeurs des puits nonensemencés (T.S.B. seul).

Nous obtenons alors la formule : $y = x + 3 \times \sigma$

En fonction de la moyenne des valeurs obtenues « b », quatre catégories de comportement vis-à-vis de la production de biofilm ont été définies :

Production inférieure au seuil :	$b < y$
Faiblement producteur :	$y < b \leq 1,5 \times y$
Modérément producteur :	$1,5 \times y < b \leq 3 \times y$
Fortement producteur :	$b > 3 \times y$

d Biofilm Ring Test[®]

Le BioFilm Ring Test[®] permet de déterminer des cinétiques de formation de biofilm de façon simple et rapide, sans lavage ni coloration, en microplaques 96 puits (99). Le principe repose sur la co-incubation d'une suspension bactérienne calibrée avec des microbilles magnétiques, dont la mobilité est freinée par la formation du biofilm. Un indice de formation de biofilm (B.F.I.), reflet de la mobilité des microbilles après aimantation, permet de suivre la formation du biofilm au cours du temps. Plus les microbilles sont immobilisées par le biofilm en formation, plus ce B.F.I. diminue.

Les souches étudiées sont cultivées en bouillon Cœur Cerveau (B.C.C.) jusqu'en phase stationnaire, puis ajustées à 3 McF et diluées au 1/250^{ème} dans du B.C.C. filtré pour obtenir les suspensions bactériennes initiales (recommandations fournisseur). Les mesures réalisées en duplicate, ont été effectuées à 4 temps : 0 heure, 1 heure, 2 heures et 5 heures sur une sélection d'isolats appartenant au CC8 et au CC30.

II.5 Inactivation du gène de la bone-binding sialoprotein *bbp*

La stratégie adoptée pour inactiver le gène *bbp* est résumée dans la Figure 18, page 60.

a Sélection d'un isolat clinique transformable

Afin de savoir si nos isolats cliniques étaient transformables, nous avons utilisé le vecteur plasmidique pRMC2 (100), contenant le gène *cat* codant pour la chloramphénicol-acétyl-transférase, que nous avons électroporé dans nos isolats cliniques d'intérêt, sensibles au chloramphénicol. Afin de maîtriser et valider cette étape, nous l'avons initialement réalisée sur une souche de *S. aureus* RN4220 avirulente, qui accepte l'ADN étranger (101). La C.M.I. (concentration minimale inhibitrice) de chloramphénicol vis-à-vis de cette souche était de 8 mg/L (102).

Préparation des cellules électrocompétentes

Les bactéries étaient cultivées en B.C.C., à 37°C, puis centrifugées à froid. Dans la glace, le culot était lavé trois fois avec du tampon H.E.P.E.S., puis finalement resuspendu dans 2,5 mL du même tampon. Ensuite, 250 µL de glycérol étaient ajoutés, pour une conservation des bactéries préparées, à -80°C, après 2 h de refroidissement dans la glace.

Electroporation

Un microlitre de plasmide pRMC2 (130 ng/µL) était ajouté à 100 µL de bactéries préalablement préparées, puis le mélange était transféré dans la cuve d'électroporation. Une fois le choc électrique appliqué, le contenu de la cuve était placé dans 800 µL de B.C.C. glucosé et incubé à 37°C, sous agitation, pendant 1 à 3 heures.

Sélection des souches transformées

Les bactéries étaient alors étalées sur une gélose contenant 50 mg/L de chloramphénicol, incubée ensuite à 37°C pendant 24 à 48 h. Les bactéries ayant accepté le plasmide se développaient sur la gélose.

b Construction du plasmide pMAD: Δ bbp

pMAD (103) est un vecteur plasmidique thermosensible, construit à partir du plasmide pRN5101. Il se caractérise par plusieurs propriétés (Figure 16, page 58) :

- Un gène de résistance à l'ampicilline : *bla*
- Un gène de résistance à l'érythromycine : *ermC*

- Un gène codant pour une β -galactosidase thermostable (*bgaB*) permettant de sélectionner les bactéries qui ont perdu le plasmide, par une discrimination blanc/bleu sur gélose additionnée de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside).

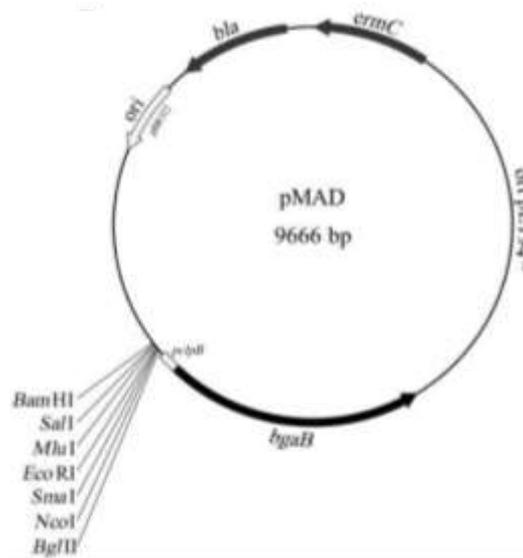


Figure 16 : Carte du plasmide pMAD (103)

Ce plasmide est modifié par assemblage isothermique selon la méthode de Gibson (104,105). Cette méthode permet, en une seule réaction, et grâce à l'action concertée d'une 5' exonucléase, d'une ADN-polymérase, et d'une ADN-ligase, l'assemblage de multiples fragments d'ADN possédants des extrémités homologues (20 à 200 paires de bases).

Dans notre cas, les fragments à assembler sont :

- Le plasmide pMAD ;
- Un tag, c'est-à-dire une séquence connue d'ADN, permettant d'identifier les construits après séquençage ;
- Nos deux fragments d'intérêts nécessaires à la recombinaison homologue aboutissant à l'inactivation du gène *bbp*.

Ces fragments d'intérêt doivent comporter entre 600 et 1000 paires de base. Ils sont amplifiés à l'aide d'amorces comportant une queue de nucléotides homologues aux extrémités des autres fragments d'ADN. Leur concentration doit atteindre un minimum de 50 ng/ μ L après purification.

Après 45 minutes d'incubation à 50°C, 10 μ L de ce mélange sont mis au contact de souches de *E. coli* préalablement traitées pour devenir « ultracompétentes » selon la méthode d'Inoue et al (106). Un choc thermique à 42°C permet aux souches de *E. coli* d'intégrer le plasmide.

Les souches de *E. coli* sont ensuiteensemencées sur une gélose contenant de l'ampicilline (100 mg/mL), incubées à 37°C, durant une nuit. Le lendemain, les clones résistants à l'ampicilline seront susceptibles de posséder le vecteur plasmidique assemblé.

Une PCR de contrôle est alors effectuée sur plusieurs clones afin de vérifier que le plasmide possède l'insert. Enfin, une étape de séquençage est réalisée pour prouver que l'insert est dans le bon sens au sein du plasmide.

c Electroporation du plasmide et inactivation du gène *bbp*

Le plasmide est alors électroporé dans la souche de laboratoire *S. aureus* RN4220. En effet, cette souche ne possède pas de système de restriction capable de dégrader l'ADN étranger. Cette étape permet donc de « préparer » le plasmide à l'électroporation dans une souche clinique de *S. aureus*.

L'inactivation de gène *bbp* se fait grâce à un mécanisme de recombinaison homologue (Figure 17). Le plasmide étant thermosensible, un changement de température permet de provoquer le mécanisme.

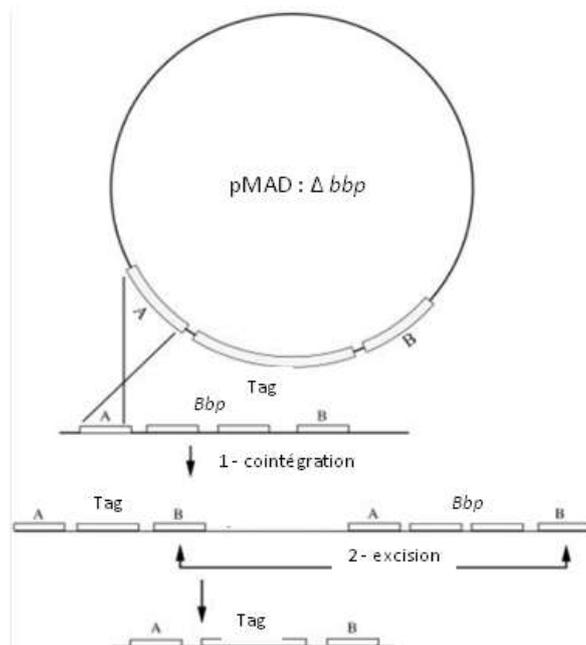


Figure 17 : Représentation schématique du phénomène de recombinaison homologue

A et B représentent les séquences d'ADN situées en amont et en aval du gène *bbp*. Les traits croisés indiquent les événements de recombinaison. L'intégration de pMAD grâce aux séquences homologues peut se faire en A ou en B. Le recombinant subit un second événement de recombinaison, régénérant le plasmide pMAD. En fonction de la séquence homologue où se produit la seconde recombinaison, le marqueur Tag restera dans le chromosome (B) ou sera excisé avec le plasmide (A). Le remplacement du gène s'effectue seulement si le second événement de recombinaison se produit en B (adapté de Arnaud et al - 103).

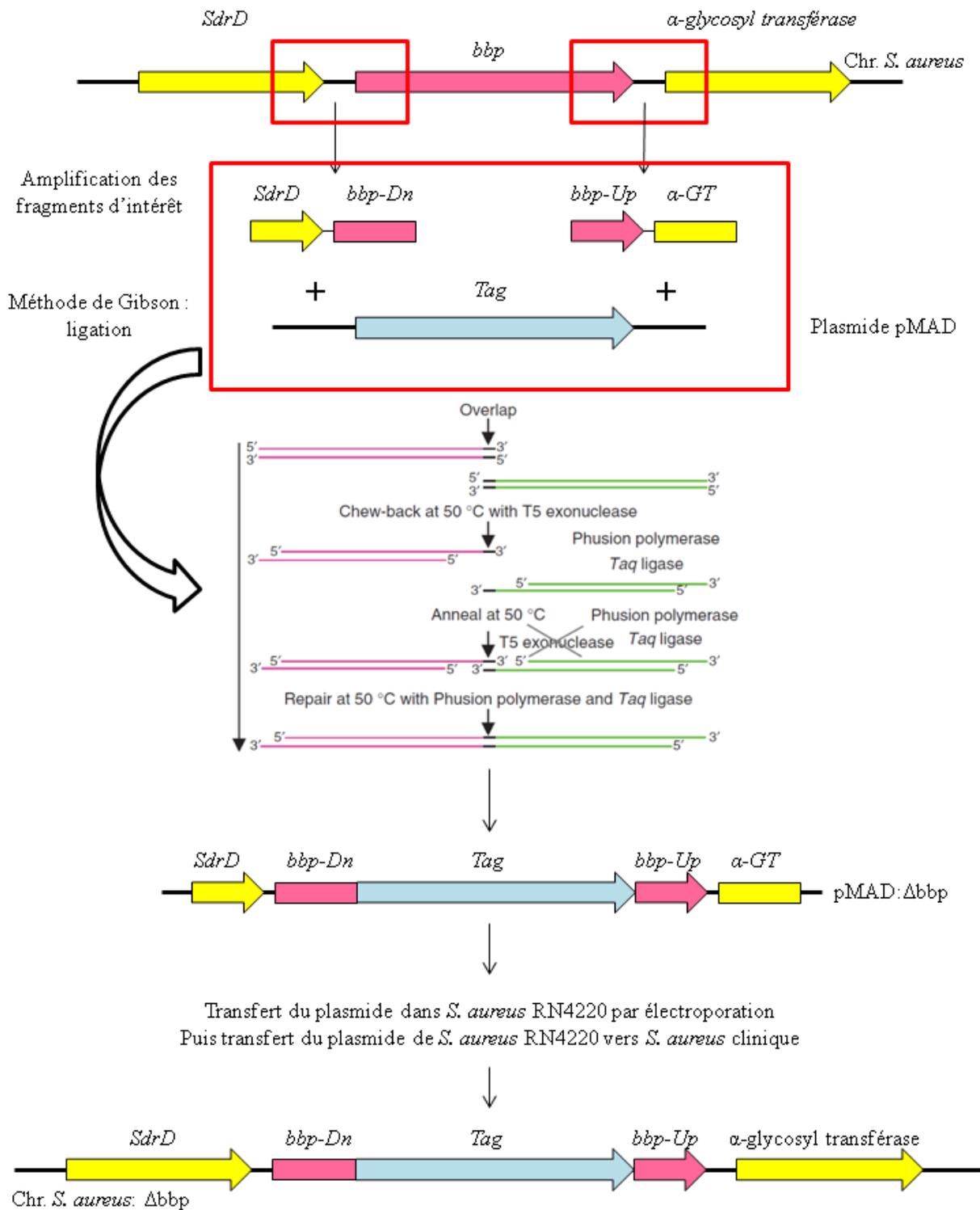


Figure 18 : Stratégie utilisée pour inactiver le gène *bbp* chez la souche de *Staphylococcus aureus* RN4220 et chez les isolats cliniques (104).

III Résultats

III.1 Caractéristiques cliniques et paracliniques des infections

Les 57 isolats de *S. aureus* provenaient de 55 patients, dont 29 femmes et 26 hommes. L'âge médian était de 73 ans (21-96 ans – Figure 19). Neuf patients étaient immunodéprimés (traitement immunosuppresseur, chimio/radiothérapie, néoplasie ou antécédent de néoplasie cinq ans auparavant). La principale indication de pose de matériel était l'arthrose (Figure 20, page 62). Au plan clinique, la répartition des différents symptômes locaux est représentée figure 21, page 62. La modification de la plaie opératoire accompagnée d'une fistulisation à la peau était la conséquence locale de l'I.O.A.M la plus fréquente.

Sur le plan chirurgical, ces I.O.A.M. étaient principalement prises en charge par un débridement extensif puis lavage de l'articulation (Figure 22, page 62). Les isolats étaient responsables de 36 I.O.A. sur prothèse de hanche, 17 I.O.A. sur prothèse de genou et 4 I.O.A. sur matériel d'ostéosynthèse. La répartition du type d'infection était la suivante : 18 infections précoces, 9 infections retardées et 29 infections tardives. Un seul patient est décédé des suites de son infection.

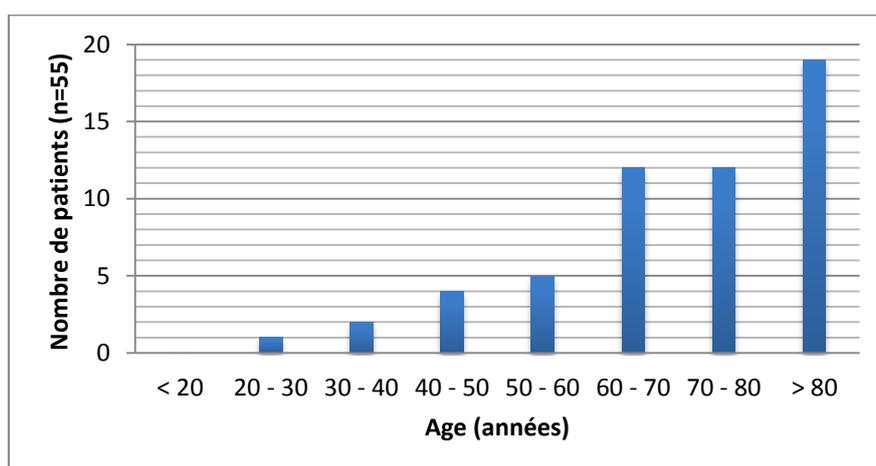


Figure 19 : Représentation graphique de la répartition des âges de la population étudiée.

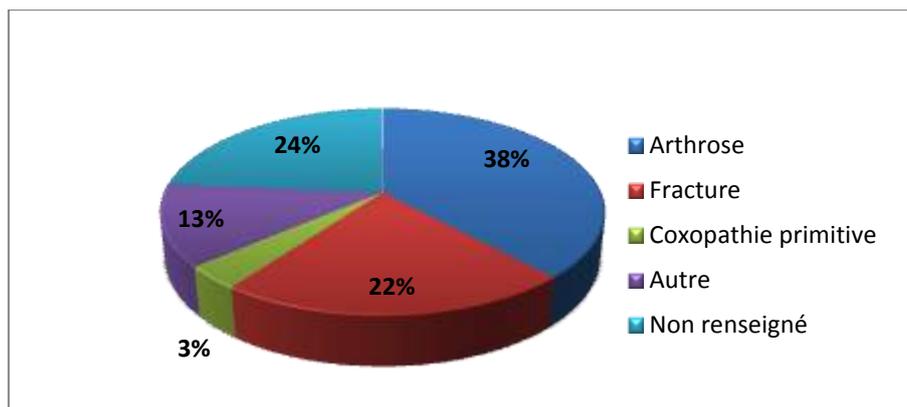


Figure 20 : Répartition graphique des indications de pose de matériel (n=55)

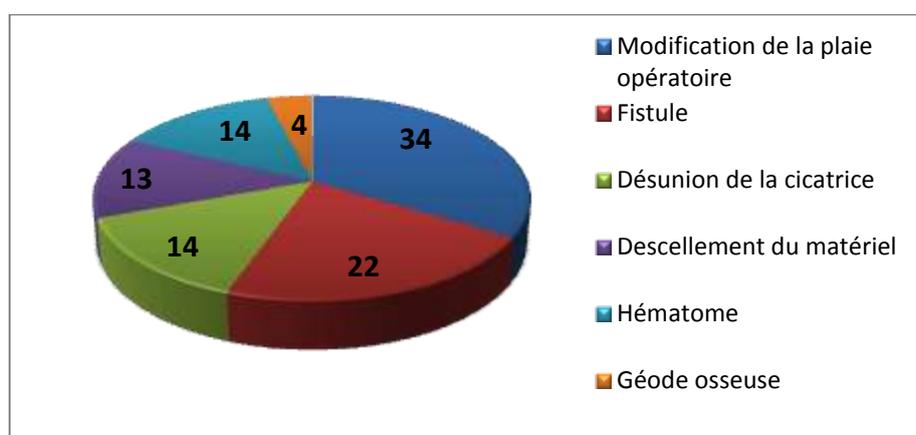


Figure 21 : Représentation graphique des signes locaux conduisant au diagnostic d'infection ostéo-articulaire.

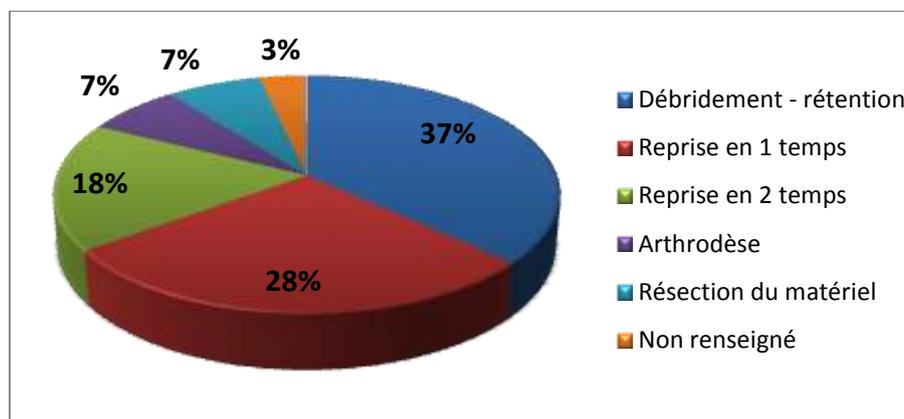


Figure 22 : Représentation graphique de la prise en charge chirurgicale des I.O.A.M. à *S. aureus* (n=57).

La correspondance entre le type d'infection et les complexes clonaux (CC) est présentée dans le tableau VII, page 63.

Tableau VII : Tableau synoptique des caractéristiques génétiques, phénotypiques et cliniques des souches de *Staphylococcus aureus* infectantes et colonisantes.

Complexes clonaux	- Portage nasal -												- IOA sur matériel -																
	Production de biofilm				Gènes détectés								Production de biofilm				Type d'infection					Gènes détectés							
	n	forte	modérée	faible	<i>cna</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>bbp</i>	<i>ebps</i>	<i>icaADC</i>	<i>pvl</i>	<i>mecA</i>	n	forte	modérée	faible	IP/R	IT	PTH	PTG	OS	<i>cna</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>bbp</i>	<i>ebps</i>	<i>icaADC</i>	<i>pvl</i>	<i>mecA</i>
CC8	5	3	1	1		5	5	5	5	5			10	4	5	1	5	5	4	3	3		10	10	9	10	10		1
CC30	7			7	6	7		7	7	7			14	2		12	7	7	11	3		14	13	1	13	14	14		
CC5	5		1	4		5	5	4	5	5			11	1	3	7	6	5	8	3		11	11	10	11	11		4	
CC45	2			2	2	2	1	2	2	2	1		9		4	5	5	4	4	5		9	9	8	9	9	9	1	
CC15	4	1	1	2		4	4	3	4	4			4		3	1	2	2	4			4	4	4	4	4			
CC1													2		1	1	1	1		1	1	2	2	1	2	2	2		
CC22													2		1	1	1	1	1	1		2	2	2	2	2	2		
CC97													1		1		1		1			1	1		1	1			
CC101													1		1		1		1			1	1	1	1	1			
CC398	4		3	1	4	4	4	4	4	4			1			1			1			1	1	1	1	1	1		
CC80													1	1			1	1				1	1	1	1	1			
CC12	1		1		1	1	1		1	1			1		1		1		1			1	1	1		1	1		
Total	28	4	7	17	13	28	20	25	28	28	0	1	57	8	20	29	29	28	35	18	4	29	56	42	52	57	57	1	5

IP/R : Infection précoce ou retardée.

IT : Infection tardive.

PTH : Prothèse totale de hanche.

PTG : Prothèse totale de genou.

OS : Ostéosynthèse.

Cna : Protéine de liaison au collagène.

FnbA : Protéine liant la fibronectine A.

FnbB : Protéine liant la fibronectine B.

Bbp : Protéine de liaison à la sialoprotéine osseuse.

Ebps : Protéine se liant à l'élastine.

Pvl : Leucocidine de Pantan et Valentine.

mecA : Gène à l'origine de la synthèse de la PLP_{2a}.

icaADC : Locus de l'adhérence intercellulaire.

III.2 Typage moléculaire

a Electrophorèse en champs pulsés

Cinq groupes de pulsotypes se distinguent parmi les isolats infectants dont deux groupes homogènes représentant 43,3 % des isolats (sous-populations D et E) et trois groupes avec une distribution plus hétérogène des pulsotypes. Quatre groupes apparaissent parmi les isolats colonisants (Figures 23 et 24, pages 65 et 66). Du fait de la méthylation des sites de restriction de l'enzyme *SmaI*, la restriction de l'ADN des souches de *S. aureus* appartenant au CC398 par cet enzyme était impossible en raison de leur probable origine animale (107) ; les résultats obtenus avec l'enzyme *ApaI* sont présentés en figure 24 et révèlent des pulsotypes semblables.

Malgré des profils très similaires au sein des sous-populations D et E des isolats infectants, aucun clone prédominant n'a émergé de notre série traduisant une diversité génétique des isolats impliqués dans les I.O.A.M. (Figure 23).

b Multilocus-Locus Sequence Typing

Les différents CC sont présentés dans le tableau VII, page 63. Dix-huit et 13 STs différents étaient respectivement présents au sein des cohortes infectantes et colonisantes. Lors de cette étude, la répartition des CC majoritaires (CC30, CC5 et CC8) était sensiblement la même dans nos deux cohortes. La proportion de souches de *S. aureus* appartenant au CC45 était plus importante parmi les isolats infectants (15,8 % vs 6,5 %). Quatre nouveaux ST, dont les séquences de chaque allèle ont été validées par le département des Maladies Infectieuses de l'Imperial College of London, ont été décrits. Il s'agissait de deux isolats infectants (ST2375, ST2376) et deux isolats colonisants (ST2377, ST2378). L'ensemble des isolats infectants ne dérivait pas phylogénétiquement d'un même ancêtre commun, malgré quelques parentés génétiques (profils de macrorestriction).

A noter que, parmi les isolats colonisants, 13 % appartenaient au CC398.

Figure 23 : Dendrogramme des pulsotypes des souches de *Staphylococcus aureus* responsables d'I.O.A. sur matériel.

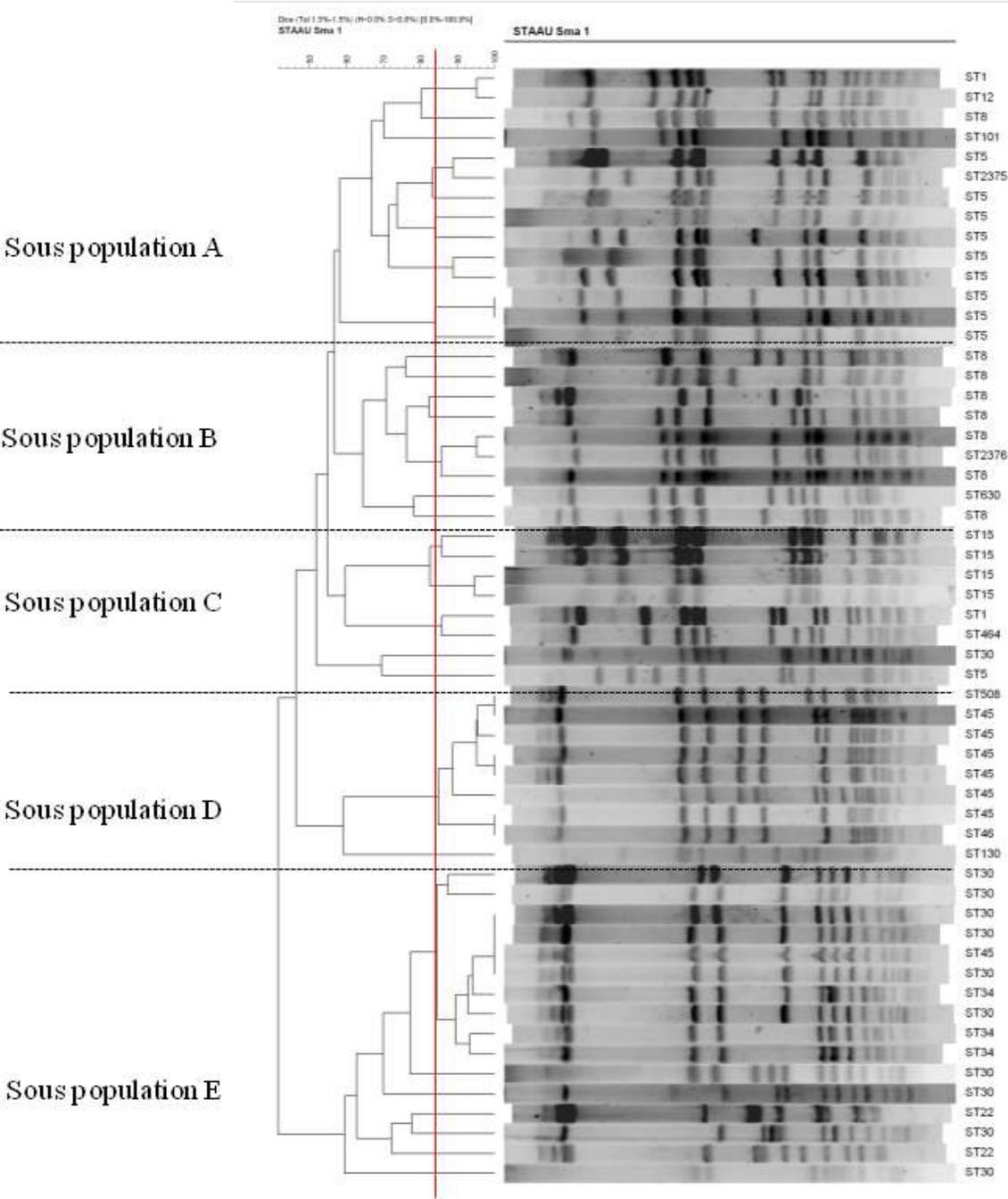
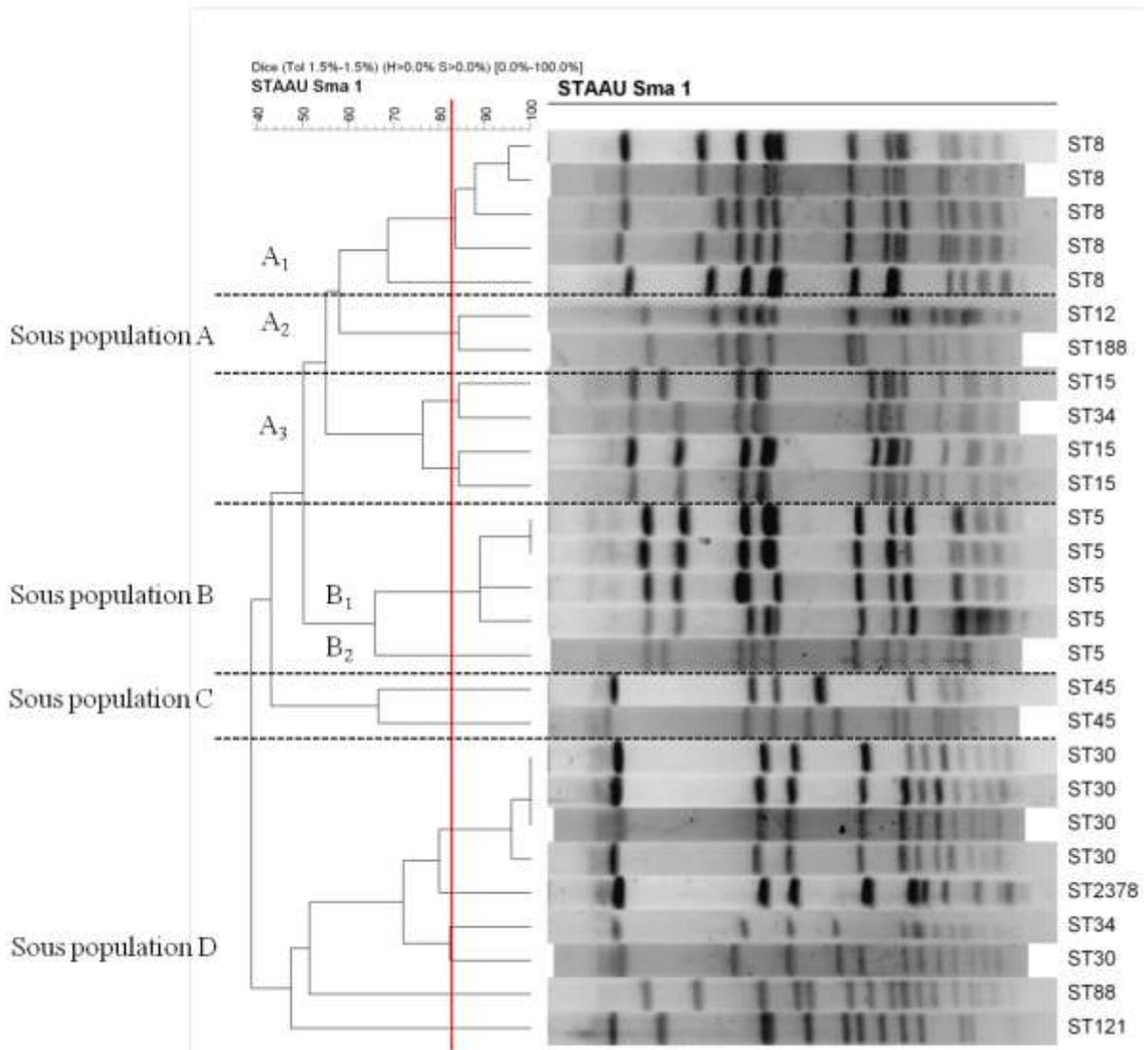
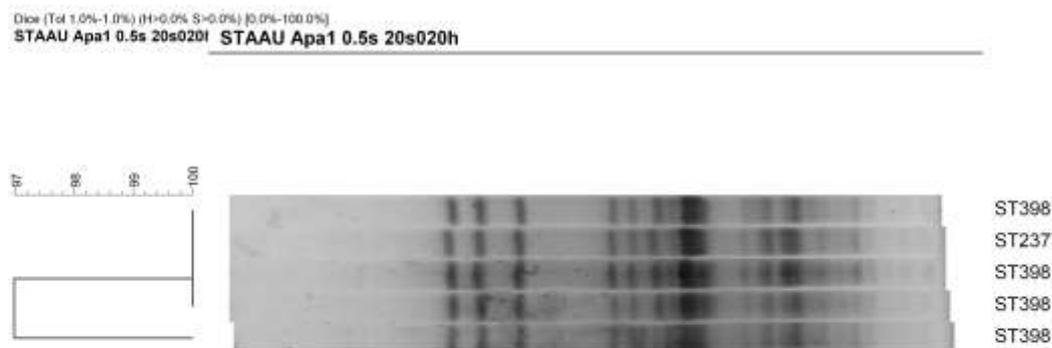


Figure 24 : Dendrogrammes des pulsotypes des *Staphylococcus aureus* colonisants et appartenant au CC398

Dendrogramme des pulsotypes des souches de *Staphylococcus aureus* de portage nasal.



Dendrogramme des pulsotypes des cinq souches de *S. aureus* appartenant au CC398.



III.3 Etude de la production de biofilm

La classification des isolats, en fonction de leur capacité à produire un biofilm, grâce à la technique à la résazurine mise au point, est présentée dans le tableau VII, page 63. Parmi les isolats infectants, nous avons respectivement 43,8 %, 42,2 % et 14 % d'isolats faiblement, modérément et fortement producteurs de biofilm. Parmi les isolats colonisants, cette répartition était de 61,2 %, 25,8 % et 13 %. Trois types de comportement parmi nos deux cohortes se distinguent clairement, sans différence significative dans leur répartition. Les souches de *S. aureus* responsables d'I.O.A.M. ne se caractérisaient donc pas par une tendance générale à produire plus de biofilm, dans nos conditions expérimentales. Ces résultats ont été confirmés par la technique au Crystal violet, sur une sélection d'isolats (Figure 25). Le coefficient de corrélation entre les deux techniques était de 0,9.

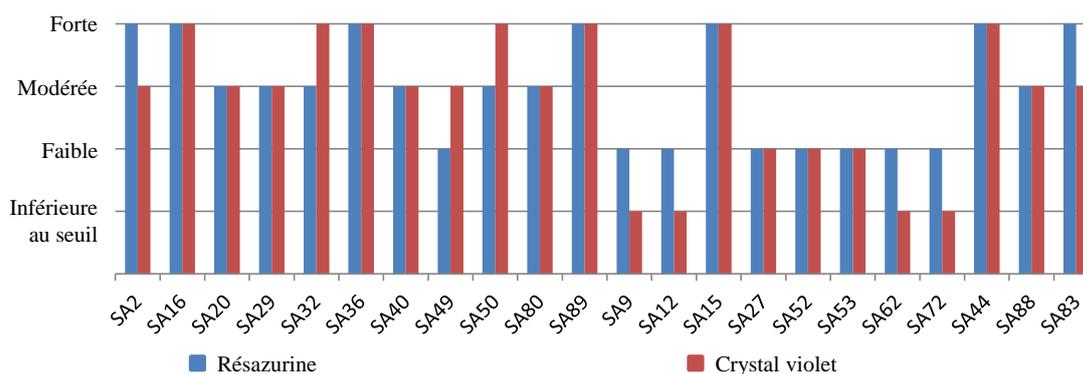
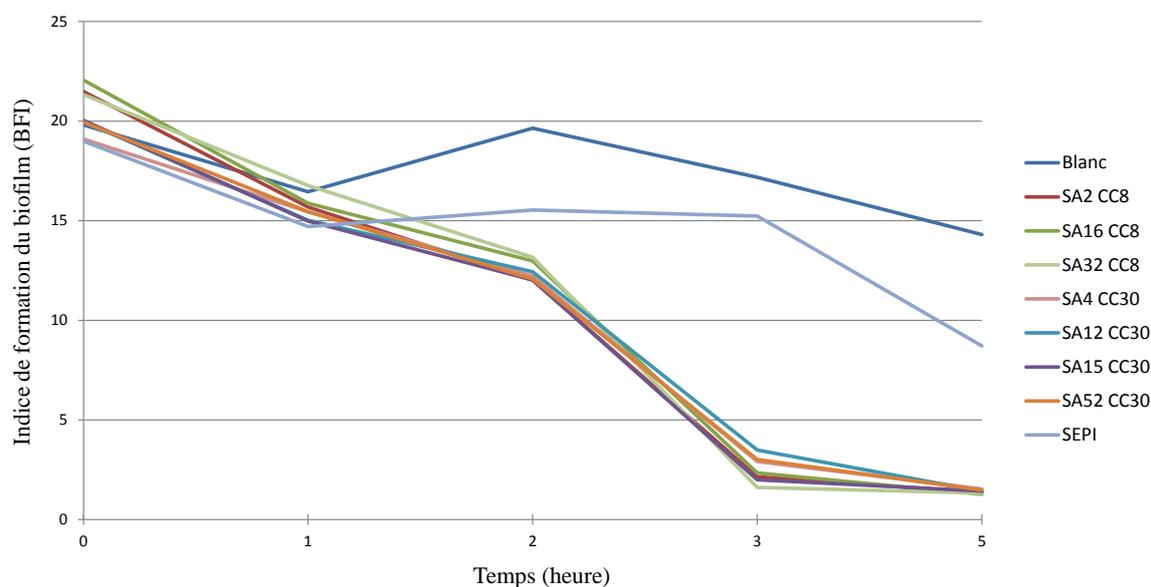


Figure 25 : Comparaison des résultats obtenus avec deux techniques d'évaluation de la production de biofilm (résazurine et crystal violet) sur une sélection de souches de *Staphylococcus aureus*.

Après cette première approche utilisant deux méthodologies « classiques » d'étude de la production de biofilm, nous avons utilisé une méthodologie innovante, le BioFilm Ring Test[®]. Cette méthode récente a permis de comparer les cinétiques de formation de biofilm sur une sélection de sept souches isolées d'I.O.A.M. (Figure 26).



SEPI : *Staphylococcus epidermidis* RP62A

Figure 26 : Cinétique d'apparition d'un biofilm sur une sélection de souches de *Staphylococcus aureus* responsables d'infection ostéo-articulaire sur matériel (technique Biofilm Ring test[®]).

La cinétique de formation du biofilm est sensiblement identique pour tous les isolats étudiés. A 3 heures, toutes les souches ont un indice de formation du biofilm inférieur à 2. Seule la souche de *Staphylococcus epidermidis* RP62A présente une cinétique de formation d'un biofilm plus lente.

Afin d'augmenter nos effectifs pour le calcul statistique, les isolats ont été regroupés par CC et non par ST.

Ainsi, la combinaison des résultats de cette 1^{ère} partie démontre que les souches de *S. aureus* appartenant au CC8 produisaient significativement plus de biofilm que celles des autres CC, dans les conditions expérimentales utilisées (index > 1,5 x seuil, p = 0,03, test exact de Fisher). De même, les souches de *S. aureus* appartenant au CC30 produisaient significativement moins de biofilm que celles des autres CC, dans nos conditions expérimentales (p < 0,01).

III.4 Génotypage

L'analyse descriptive des résultats obtenus pour les principaux gènes de résistance, de virulence, d'adhérence et de défense des isolats de *S. aureus* est présentée dans le tableau IX, page 72. Cinq isolats infectants et un isolat colonisant étaient résistants à la méticilline. Un seul isolat possédait le gène codant pour la leucocidine de Panton et Valentine et 26 % des isolats infectants avaient le gène de la TSST-1. Le locus *ica* était présent chez tous les isolats, alors que le gène *bap* était absent. Les gènes des adhésines *bbp*, *fnbA*, *clfA*, et *clfB* étaient retrouvés chez plus de 90 % des isolats infectants. Les gènes *fnbB* et *cna* étaient présents respectivement chez 71,9 % et 45.6 % des isolats infectants.

La comparaison des génotypes des isolats infectants et colonisants n'a révélé aucune différence statistique (Tableau VIII, page 70).

Tableau VIII : Comparaison des profils génotypiques des souches de *Staphylococcus aureus* responsables d'infection ostéo-articulaire sur matériel (I.O.A.M.) ou de portage nasal.

Gène ou allèle	Isolats d'IOAM (%) n=57	Isolats de portage nasal (%) n=31	p
Adhésines			
<i>fnbA</i>	57 (100.0)	31 (100.0)	NS
<i>fnbB</i>	41 (71.9)	22 (71.0)	
<i>clfA</i>	57 (100.0)	31 (100.0)	
<i>clfB</i>	57 (100.0)	31 (100.0)	
<i>cna</i>	26 (45.6)	15 (48.4)	
<i>spa</i>	54 (94.7)	31 (100.0)	
<i>sdrC</i>	56 (98.2)	30 (96.8)	
<i>sdrD</i>	52 (91.2)	25 (80.6)	
<i>bbp</i>	52 (91.2)	29 (93.5)	
<i>ebps</i>	57 (100.0)	31 (100.0)	
<i>map/eap</i>	54 (94.7)	30 (96.8)	
Toxines			
<i>eta</i>	0 (0.0)	2 (6.5)	NS
<i>etb</i>	0 (0.0)	1 (3.2)	
<i>tst</i>	15 (26.3)	7 (22.6)	
<i>egc cluster</i> (<i>seg/sei/sem/sen/seo/seu</i>)	36 (63.2)	15 (48.4)	
<i>Pvl</i>	1 (1.8)	0 (0.0)	
<i>hla</i>	52 (91.2)	31 (100.0)	
Autres gènes de virulence			
<i>icaA</i>	57 (100.0)	31 (100.0)	NS
<i>chp</i>	35 (61.4)	20 (64.5)	
Allèles du locus <i>agr</i>			
<i>agr</i> I	24 (42.1)	12 (38.7)	NS
<i>agr</i> II	16 (28.1)	10 (32.3)	
<i>agr</i> III	17 (29.8)	8 (25.8)	
<i>agr</i> IV	0 (0.0)	1 (3.2)	

NS : différence non significative statistiquement

La répartition des *loci agr* en fonction de la production de biofilm est présentée dans la figure 27, page 71. Les *loci agr* I et II étaient associés à une plus forte production de biofilm que le locus *agr* III ($p < 0,01$).

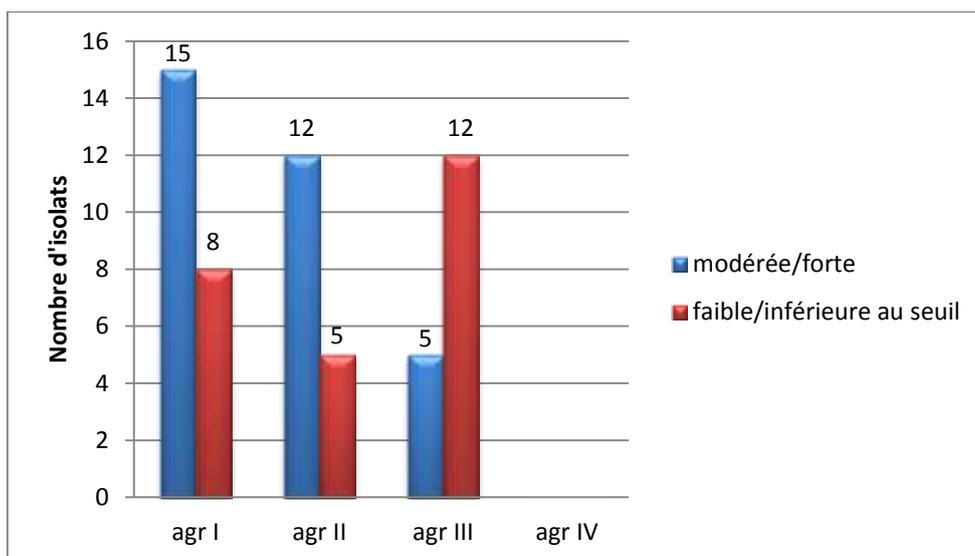
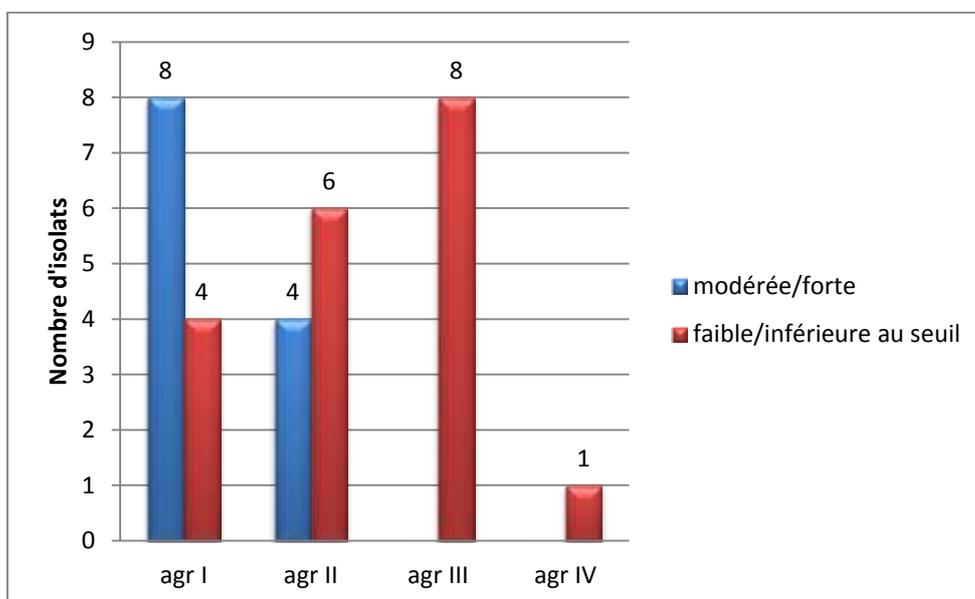
Production de biofilm chez les isolats infectants en fonction du locus *agr*Production de biofilm chez les isolats colonisants en fonction du locus *agr*

Figure 27 : Production de biofilm (résazurine) chez les souches de *Staphylococcus aureus*

Par ailleurs, l'analyse génotypique a montré que les souches de *S. aureus* appartenant au CC8 possédaient un allèle particulier des gènes *bbp* (allèle des souches COL et MW2) et *fnbB* (allèle de la souche COL) (Tableau IX, page 72). Ces allèles étaient significativement plus fréquents parmi les souches de *S. aureus* appartenant à ce CC ($p < 0,01$, test exact de Fisher). Il faut souligner que ces souches avaient un locus *agr* de type I.

Tableau IX : Analyse génotypique des isolats de *Staphylococcus aureus* infectants. Comparaison du patrimoine génétique entre les isolats de *S. aureus* appartenant au complexe clonal (CC) 8 et les autres.

	Gènes	Description du gène	CC8 n=10	Autres CC n=47	P
Gènes de résistance	blaZ	β-lactamase	7	30	NS
	fosB	Résistance à la fosfomycine	10	31	NS
	mecA	Résistance à la méticilline	1	4	NS
Gènes de toxine	entA	Entérotoxine A	6	21	NS
	TSST	Toxine du choc toxique staphylococcique	0	15	NS
	pvl	Leucocidine de Panton et Valentin	0	1	NS
Gènes d'hémolysine	lukF	Hémolysine γ, composant B	10	47	NS
	lukS	Hémolysine γ, composant C	10	43	NS
	scn	Staphylococcal Complement Inhibitor	9	41	NS
	aur	Aureolysine	10	38	NS
Type capsulaire	capsule-5		10	15	NS
Gènes d'adhésine	icaA	Intercellular Adhesion Protein A	10	47	NS
	icaC	Intercellular Adhesion Protein C	10	47	NS
	icaD	Biofilm PIA synthesis Protein D	10	47	NS
	bbp-all	Bone binding sialoprotein	9	42	NS
	<i>bbp</i> -COL+MW2	Bone binding sialoprotein, allèle des souches COL et MW2	9 (90%)	3 (6%)	p < 0,01
	cna	Collagen binding adhesin	0	26	NS
	clfA-all	Clumping factor A	10	47	NS
	clfB-all	Clumping factor B	10	46	NS
	<i>clfB</i> -COL + Mu50	Clumping factor B allèle des souches COL et Mu50	9	11	NS
	<i>clfB</i> -MW2	Clumping factor B allèle de la souche MW2	1	20	NS
	<i>clfB</i> -RF122	Clumping factor B allèle de la souche RF122	1	21	NS
	ebh	Fibronectin binding protein associée à la paroi	10	45	NS
	fib	Fibrinogen binding protein	10	21	NS
	<i>fnbA</i> -all	Fibronectin binding protein A	10	46	NS
	<i>fnbB</i> -COL	Fibronectin binding protein B, allèle de la souche COL	10 (100%)	0 (0%)	p < 0,01
	map	Protéine analogue du CMH II	10	44	NS
	<i>sdrC</i> -all	Binding protein C	9	47	NS
	<i>sdrD</i> -COL+MW2	Binding protein D, allèle des souches COL et MW2	7	8	NS
	<i>vwb</i> -all	Facteur de Von Willebrand	10	39	NS
	sasG	<i>S. aureus</i> surface protein G	10	40	NS
Gènes d'évasion	isaB	Antigène immunodominant B	10	47	NS
	mprF	synthetase	10	36	NS
	isdA	Hème/Transferrin binding protein	10	47	NS
	lmrP	Protéine de transport	10	47	NS

NS : Différence non significative statistiquement.

III.5 Recombinaison homologue

A la lumière des résultats précédents et en raison de l'affinité de la Bbp pour la matrice osseuse (108), nous avons choisi dans un premier temps, de nous intéresser plus précisément au rôle de cette adhésine. L'objectif de cette étude était de mettre en évidence un éventuel lien entre le gène *bbp* et la capacité plus importante à produire du biofilm. Pour cela, nous avons débuté l'étude de l'inactivation de ce gène, à partir d'une sélection de souches de *S. aureus* appartenant au CC8 et produisant beaucoup de biofilm.

a Sélection d'isolats cliniques transformables

Nous avons d'abord mis au point la technique d'électroporation au sein du laboratoire, en travaillant sur la souche RN4220 (101). Puis, une fois cet aspect technique maîtrisé, une électroporation du vecteur pRMC2, conférant la résistance au chloramphénicol, a été réalisée sur huit souches cliniques appartenant au CC8 (100). Deux isolats infectant (SA2 et SA32) ont accepté le vecteur. Ces isolats seront donc utilisés, par la suite, pour effectuer la recombinaison homologue. Le changement de caractère phénotypique des isolats ayant accepté le plasmide pRMC2 est présenté en figure 28.

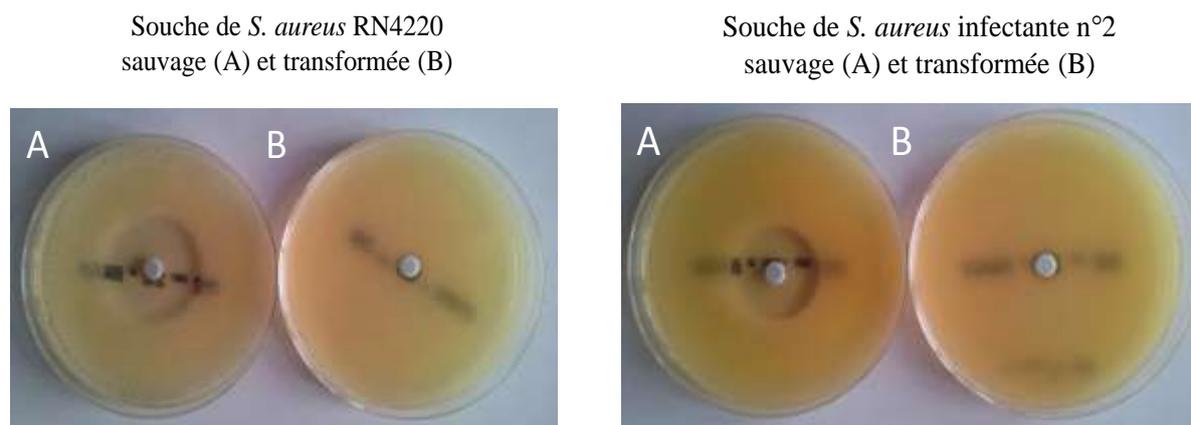


Figure 28 : Acquisition de la résistance au chloramphénicol des souches de *Staphylococcus aureus* RN4220 et n°2 de notre série, après électroporation du plasmide pRMC2

b Construction du vecteur plasmidique pMAD

L'assemblage isothermique est complexe. Il nécessite des fragments d'ADN en concentration suffisante.

La 1^{ère} étape est la définition des amorces permettant l'amplification par PCR de nos fragments d'intérêt. En effet, la PCR doit donner des fragments de taille très proche et définie. La séquence du gène *bbp* se terminant par des répétitions de dinucléotides, il est délicat de trouver des amorces ayant suffisamment d'affinité pour le gène avec une température d'hybridation optimale (Annexe 1, page 96). Après plusieurs essais, nous avons obtenu des produits de PCR de la taille attendue.

Nous avons donc procédé au mélange de Gibson puis, par choc thermique, incorporé le plasmide dans des souches de *E. coli* « ultracompétentes ». Après 24h d'incubation, nous avons observé des clones sur les géloses à l'ampicilline (100 mg/L).

Malheureusement, cet essai s'est avéré infructueux car aucun de nos clones ne possédait le plasmide avec son insert.

L'hypothèse la plus probable est que notre concentration d'ADN était insuffisante (environ 30 ng/ μ L).

Les résultats de ce travail ont été présentés, en partie, sous forme de **communications orales**, lors de l'**EBJIS** 2012 (*European Bone and Joint Infection Society*), à Montreux en Suisse et lors de la **RICAI** 2012 (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), à Paris, ainsi que sous forme de communications affichées à l'**ICAAC** 2012 (*Interscience conference on Antimicrobial agents and chemotherapy*), à San Francisco aux Etats-Unis.

Une première partie de ce travail a été soumise à la revue ***Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*** (Facteur d'impact : 2,6) sous le titre « Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: Genetic background comparison between nasal carriage and prosthetic joint infection isolates ».

IV Discussion

Les I.O.A.M. sont des complications infectieuses redoutables, parfois génératrices de séquelles importantes, nécessitant des traitements longs et coûteux. L'évolution des techniques chirurgicales, le respect des règles d'asepsie et la prescription d'une antibioprophylaxie péri-opératoire ont significativement réduit le risque d'infections post-opératoires. Cependant, malgré ces mesures, la hausse du nombre d'implantations de prothèses articulaires, du fait du vieillissement de la population, s'accompagne d'une augmentation du nombre d'infections (8).

Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux était de déterminer si les souches de *S. aureus* responsables d'I.O.A.M. présentaient un profil génétique et un pouvoir pathogène plus ou moins spécifiques. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces infections pourrait potentiellement permettre de retenir des facteurs pronostiques d'évolution ou d'aide à la prise en charge thérapeutique.

Notre travail fait suite à plusieurs observations tentant d'identifier, dans le patrimoine génétique des souches de *S. aureus*, des facteurs de virulence responsables de leur pouvoir pathogène. Cependant, ces observations étaient très hétérogènes, tant sur le plan des critères de sélection des souches étudiées, que sur le plan technique (68,109–112).

Pour notre étude, nous avons donc sélectionné, d'une part, 57 isolats cliniques de *S. aureus* issus spécifiquement d'I.O.A.M. et, d'autre part, 31 souches de *S. aureus* isolées dans les fosses nasales de patients consultants en Orthopédie. Par confrontation des résultats de techniques étudiant différentes propriétés de ces souches, nous avons cherché à mieux comprendre la physiopathologie de ce type d'infection.

Les I.O.A.M. à *S. aureus*, parfois compliquées, concernent généralement des patients présentant plusieurs facteurs de co-morbidité (17). Les patients inclus dans notre étude, présentaient une moyenne d'âge élevée (70,2 ans) et, dans la plupart des cas, d'autres pathologies associées, influençant les capacités de défenses immunitaires (obésité, diabète, polyarthrite rhumatoïde, arthrose, immunosuppression, ...). Ainsi, dans les I.O.A.M., il faut concevoir la relation hôte-pathogène comme une interface entre la bactérie et le matériel, dans un environnement plus ou moins favorable à l'expression de la virulence de la bactérie (67).

Nous avons d'abord voulu savoir si une sous-population caractéristique dominait parmi nos isolats infectants. Comme Schuenck et al l'ont rapporté, nos isolats infectants se répartissaient en cinq grandes sous-populations (A à E) (112). La distribution des pulsotypes ne différait pas significativement entre les isolats infectants et les isolats de portage nasal. Les souches de *S. aureus* responsables d'I.O.A.M. ne constituent donc pas une seule sous-population particulière.

En complément, la mise en œuvre d'une technique de macro-épidémiologie, telle que le M.L.S.T., nous a permis d'analyser les relations génétiques entre ces isolats, voire leur appartenance à de grands groupes dérivant d'ancêtres communs. La diversité observée dans notre étude était retrouvée dans celle d'Aamot et al, décrivant le patrimoine génétique de souches de *S. aureus* responsables d'I.O.A. (dont 75 % sur implant) et de souches de *S. aureus* colonisant les fosses nasales. Néanmoins, il est intéressant de souligner que notre cohorte infectante comportait significativement plus d'isolats appartenant au CC8 (17 % vs 4 % dans l'étude d'Aamot et al) (111). L'étude brésilienne de Schuenck et al, portant sur 73 *S. aureus*, dont 43,8 % responsables d'infections sur prothèse, retrouvait, sur l'ensemble de leur cohorte, 16,4 % de souches de *S. aureus* du groupe CC8. Ces isolats appartenaient tous au même clone : SARM BECC (Brazilian epidemic clonal complex)/ST239, absent de notre étude (112,113). Sur le plan phylogénique, aucun ST ou CC de *S. aureus* ne s'est donc révélé prédominant parmi nos souches responsables d'I.O.A.M.

Parmi nos isolats colonisants, il est surprenant de noter la présence de cinq isolats principalement retrouvés chez les animaux de rente : 4 isolats appartenant au CC398 et un isolat ST188 (114), correspondant à une prévalence plus forte que celles décrite dans la littérature (115,116). Concernant les quatre isolats CC398, il s'agissait de SASM qui possédaient notamment les gènes codant pour la protéine inhibitrice du chimiotactisme et le facteur staphylococcique inhibiteur du complément, suggérant non pas une origine animale, mais une origine humaine de ces souches, car ces facteurs de virulence montrent une activité uniquement contre le système immunitaire humain (117). La forte densité d'élevages de porcs, dans notre région, pourrait expliquer ces résultats. En effet, la proximité des porcs et les contacts étroits avec eux, notamment dans le cadre professionnel, semblent être un facteur majeur de colonisation de l'Homme par ces souches (118). Il convient néanmoins de rester prudent, car des modifications génétiques des souches et une meilleure adaptation à l'Homme sont toujours possibles, pouvant en modifier les caractéristiques épidémiologiques et de virulence.

Lors d'une I.O.A.M., il existe au départ des interactions entre le matériel implanté chez l'hôte et la bactérie. Ces interactions se font grâce aux MSCRAMMs, exprimées à la surface de la bactérie. Ce sont donc des facteurs capitaux dans la pathogénèse de ces infections.

Seuls 73,7 % de nos isolats possédaient le gène codant pour l'adhésine *fnbB*, alors que, l'étude d'Arciola et al, portant sur 127 I.O.A.M. à *S. aureus*, montrait une présence quasi systématique de cette adhésine (99 %) (109). De plus, contrairement à l'étude de Peacock et al, portant sur une population de 163 souches de *S. aureus* (incluant des isolats responsables d'arthrites septiques et d'ostéomyélites), nous n'avons pas constaté de différence dans la répartition des gènes codant pour FnbA et FnbB, entre nos cohortes infectantes et colonisantes (*fnbA* : 98,2 vs 100 % et *fnbB* : 73,7 % vs 71 % respectivement) (65).

Par contre, nos résultats rejoignent ceux de Campoccia et al qui comparaient la fréquence des gènes codant pour les adhésines Bbp et Cna parmi 200 isolats épidémiques et sporadiques issus d'I.O.A.M. Dans leur collection, le ribotype le plus fréquent était caractérisé par un arrangement apparié des gènes *bbp* et *cna* (110). En effet, nous avons observé que les isolats, appartenant au CC le plus fréquent (CC30), possédaient ces deux adhésines Cna et Bbp (61).

S. aureus est capable de sécréter, au cours de la phase stationnaire de croissance, des enzymes et des exotoxines. Dohin et al associent la présence du gène de la toxine de Pantone et Valentine dans les I.O.A. à *S. aureus* à un tableau clinique plus sévère (119). Dans ce travail, la toxine de Pantone et Valentine ne semble pas être un facteur de virulence primordial dans le développement d'une I.O.A.M., bien que Schuenk et al aient retrouvé 9,6 % de souches comportants le gène *pvl* (112). Cette différence pourrait s'expliquer par une écologie locale différente, notamment un fort pourcentage de SARM (40 %). Par ailleurs, la présence de la TSST-1 (26 %) n'est pas spécifique des I.O.A.M à l'image des données (11 %) issues de l'étude d'Aamot et al (111).

La caractéristique essentielle des bactéries isolées d'I.O.A.M. est leur capacité à s'organiser, voire survivre et se développer, au contact d'un matériel étranger, dans un environnement hostile (120). La colonisation du matériel, implique une adhérence réversible puis irréversible des bactéries sur le support inerte, et enfin la mise en place de mécanismes de

régulation aboutissant à la formation de communautés bactériennes structurées, entourées d'une matrice protectrice d'exopolymères, appelée biofilms (69).

Les méthodes d'étude de la production d'un biofilm restent rudimentaires comparées à la complexité des mécanismes impliqués (120). D'une part, la technique de référence met en évidence la biomasse des bactéries ayant adhéré au support à l'aide du crystal violet (97). D'autre part, la technique à la résazurine, mise au point dans ce travail, présente l'intérêt de mettre en évidence uniquement les bactéries métaboliquement actives (92). Même si la corrélation entre ces deux techniques est excellente, cette dernière présente l'avantage d'être plus fine dans sa distinction entre les classes « modérément » et « fortement » productrices de biofilm. Techniquement plus aisée, la méthode à la résazurine est également un peu moins longue et emploie des réactifs moins toxiques, pour le manipulateur.

Les résultats obtenus grâce à la technologie d'immobilisation de microbilles magnétiques, Biofilm Ring test[®], ne concordent pas avec ceux issus des deux premières techniques. Néanmoins, le principe de détection est fondamentalement différent (99). De plus, la formation du biofilm *in vitro* varie considérablement d'un milieu de culture à l'autre. Certaines souches, capables de produire du biofilm dans un milieu pauvre en glucose, en acides aminés, ou de faible osmolarité, n'en forment plus dans un autre type de milieu (93). Il n'est donc pas surprenant que certains isolats soient détectés positifs par l'une des méthodes et pas par l'autre. A la lumière de nos résultats avec le Biofilm Ring test[®], toutes nos souches semblent produire un biofilm, en moins de 4h, à l'image de ce qui a pu être observé lors d'autres essais non publiés au sein de l'E.A. 3826, chez le *S. aureus*. Il est donc raisonnable de penser que cette méthode ne met pas en évidence la présence d'un biofilm mais plutôt la capacité d'adhérence des souches, pouvant correspondre aux premières étapes réversibles de la formation du biofilm. Par ailleurs, les SCN se divisant moins vite que les souches de *S. aureus* (58), il n'est pas étonnant de constater que l'indice de formation du biofilm de la souche témoin de *S. epidermidis* RP62A se positive de manière décalée dans le temps.

Dans nos conditions opératoires, à l'heure actuelle, la méthode à la résazurine semble la mieux adaptée à l'évaluation et à la mise en évidence de la production de biofilm chez des souches de *S. aureus*.

La production de biofilm par les souches cliniques de *S. aureus* responsables d'I.O.A.M. a été peu étudiée. De ce point de vue, Schuenck et al ont rapporté la classification de 73 souches de *S. aureus* (dont 43,8 % étaient issues d'I.O.A. sur prothèse) en utilisant les

critères d'interprétation proposés par Stepanovic et al (98,112). Selon ces critères, 56 % de nos isolats ont été classés comme modérément ou fortement producteurs de biofilm, contre 83 % dans la cohorte brésilienne. La forte prévalence dans cette cohorte du clone de SARM BECC (appartenant au CC8), décrit comme fortement producteur de biofilm, pourrait expliquer cette différence (113). Par ailleurs, l'épidémiologie locale très différente, ainsi que l'hétérogénéité des critères de sélection de leur cohorte, ne permettent pas de réelle comparaison (112). De plus, aucune condition expérimentale de l'étude de la production de biofilm n'était précisée. Or, il existe de nombreuses techniques, pour explorer la capacité des bactéries à produire du biofilm et, pour une même technique, les protocoles utilisés diffèrent souvent.

Par ailleurs, certains auteurs estiment que la capacité à produire du biofilm serait une spécificité de certains SARM (113). En raison d'un faible effectif de SARM dans notre cohorte, nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse.

Le « slime » produit par les isolats de *S. aureus* est lié à la synthèse du polysaccharide intercellular peptide (PIA) codé par l'opéron *icaABCD*, composé de 4 cadres ouverts de lecture : *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC* (58). Nos isolats possédaient tous l'opéron *icaABCD*, comme cela a été décrit par Arciola et al (121). Toutefois, cela ne préjuge en rien de leur capacité à produire un biofilm (73). En effet, il a été montré que la régulation de l'expression de cet opéron est complexe et dépend de **multiples facteurs bactériens** (densité bactérienne ou présence de gènes de résistance aux antibiotiques - 122) et **environnementaux** (degré d'anaérobiose, stress osmotique, etc. - 77).

Chez *S. aureus*, le gène *bap* (Biofilm associated protein) est porté par un transposon composite inséré dans SaPI_{bov2}, un îlot de pathogénicité staphylococcique mobile (123). Cette protéine Bap serait responsable de la formation de biofilm chez les souches de *S. aureus* d'origine bovine (123). En accord avec les données de la littérature, aucune de nos souches de *S. aureus* ne possédait ce gène *bap* (124). Pourtant, dans notre cohorte, certaines souches produisaient un biofilm, mis en évidence par deux techniques, dans nos conditions expérimentales. Les mécanismes aboutissant à la formation d'un biofilm par la bactérie sont donc dépendants de l'hôte. Si chez le bovin, la protéine Bap semble avoir un rôle clé dans ces mécanismes, chez l'Homme, *S. aureus* utilise des voies alternatives.

L'adhérence à une surface est une étape cruciale entre le passage de la bactérie d'une forme planctonique à la formation d'un réseau : le biofilm. Cette étape implique plusieurs molécules d'adhérence, qui permettent des interactions physico-chimiques entre les bactéries

et la surface. Lors de la formation et de la maturation du biofilm, de petits groupes de bactéries se détachent. Ces bactéries disséminent alors à distance du biofilm pour, potentiellement, en former un nouveau ailleurs. Cette dissémination serait due à la production de petits peptides nommés « phenol-soluble modulins » (PSMs). Leur synthèse serait contrôlée par le locus *agr* lui-même, sous l'influence d'un peptide cyclique autoinducteur (AIP). Ainsi, le locus *agr* faciliterait le détachement de bactéries associées au sein du biofilm (125).

Quatre grands polymorphismes du locus *agr* ont été décrits (68). Dans notre cohorte, les *agr* I, II et III étaient largement majoritaires mais parmi eux aucun locus *agr* ne prédominait. Contrairement à l'étude de Montanaro et al, portant sur 200 souches de *S. aureus* responsables d'I.O.A.M., la détection de la protéine Bbp n'était pas associée à l'*agr* de type III (61).

Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, les isolats appartenant au CC8 étaient plus souvent classés comme fortement producteurs de biofilm. Croes et al avaient déjà souligné cette particularité et avaient suggéré un lien avec le patrimoine génétique de ces isolats (126). De même, Schuenck et al ont récemment montré que les souches de *S. aureus* appartenant au ST239, et donc au CC8, ont tendance à produire plus de biofilm (112). Lors de notre étude, la technique des biopuces à ADN nous a permis d'explorer largement ce patrimoine génétique. Elle a notamment révélé que ces isolats possédaient un allèle particulier du gène *bbp*, codant pour une protéine de la famille Sdr.

Les protéines Sdr, appartenant aux MSCRAMMs, sont codées par les gènes *sdrC*, *sdrD*, et *sdrE* (2,8, 3,9 et 3,5 kbp respectivement), disposés en tandem et situés sur le locus *sdr*. Ces protéines Sdr sont caractérisées par la présence d'une région R contenant un nombre variable de dipeptides Ser-Asp, codés par des répétitions d'ADN dans la région 3' des gènes *sdr*. Les différentes protéines Sdr ont une structure comparable. Un peptide signal est suivi par un domaine A, de taille similaire parmi les différents membres de la famille Sdr. Toutefois, elles ne sont pas étroitement liées, présentant seulement 20 à 30 % d'homologie de séquences protéiques. Ces observations suggèrent que les différentes protéines Sdr auraient des rôles différents dans la pathogénèse des infections à *S. aureus*. Cependant, seul le ligand de la protéine Bbp, variant allélique de SdrE, a été décrit (63).

La protéine Bbp a été initialement décrite par Tung et al (127), en 2000, chez la souche de *S. aureus* O24. Tristan et al ont comparé les gènes des MSCRAMMs de souches de *S. aureus* provenant de portage nasal, d'endocardites sur valve native et

d'ostéomyélites/artrites hématogènes. Ils ont ainsi montré que ce gène *bbp* est plus fréquemment présent en cas d'infection osseuse qu'en cas d'endocardite (64). Or, dans la cohorte de Schuenck et al, seuls 9,6 % des isolats possédaient ce gène *bbp*. Plus récemment, Aamot et al, en comparant des isolats colonisants et des isolats responsables d'infections profondes du site opératoire (dont 75 % d'I.O.A. sur prothèse), ont montré une plus forte prévalence du gène *bbp* en cas d'I.S.O. (111). Néanmoins, ceci va à l'encontre des résultats de Tristan et al qui ne montraient pas de différence de répartition du gène *bbp* entre leurs cohortes d'isolats colonisants et d'infections osseuses (64), ce que nous confirmons dans notre étude (90 % *versus* 91 %, $p < 0.05$). Toutefois, nous avons constaté que quelques isolats, appartenant au même complexe clonal, possédaient un allèle particulier (allèle des souches COL et MW2) du gène *bbp*, conduisant alors à une protéine structurellement différente, pouvant expliquer une tendance à former plus de biofilm, dans nos conditions expérimentales.

V Conclusion - Perspectives

Notre étude est la première à s'intéresser à la relation entre phylogénie, profil de virulence et capacité à former un biofilm, au sein d'une cohorte ciblée de souches de *S. aureus* responsables d'I.O.A.M. Ce travail de recherche a été mis en œuvre à partir d'une collection constituée sur une période de quatre ans, comportant 57 souches cliniques de *S. aureus* isolées chez des patients hospitalisés au C.H.U. de Nantes. Les analyses génotypiques et phénotypiques réalisées n'ont pas permis d'identifier un profil de virulence particulier parmi nos isolats. Ainsi, il est probable qu'au-delà des facteurs de virulences possédés par la bactérie, l'état clinique de l'hôte soit l'élément clé dans la pathogénèse des I.O.A.M. Les techniques d'étude de la capacité à former du biofilm ont révélé la propension des isolats appartenant au CC8 à former un biofilm. L'étude précise de leur patrimoine génétique grâce au génotypage par puces à ADN, permettant de cribler un nombre conséquent de gènes en peu de temps, a révélé que ces isolats possédaient un allèle particulier du gène de la Bone-binding sialoprotein et du gène de la protéine liant la fibronectine B.

En conséquence, et du fait de son affinité pour le tissu osseux, nous avons initié l'étude de l'impact du gène *bbp* dans la formation de biofilm. Pour cela, en collaboration avec l'équipe « Signalisation et Réseaux de régulations bactériens » du C.N.R.S. d'Orsay (Dr. Philippe Bouloc), nous avons adapté au laboratoire la technique d'électroporation de plasmide, chez des souches de *S. aureus*. Ceci nous a permis de sélectionner deux souches cliniques, appartenant au CC8, fortement productrices de biofilm, et capables d'être transformées.

La suite de ce travail consistera à poursuivre les tentatives d'inactivation du gène *bbp* de ces souches. Nous évaluerons alors la capacité de ces isolats à produire un biofilm dans nos conditions expérimentales. En fonction des résultats obtenus, nous souhaitons procéder à une complémentation de ces mutants grâce à un plasmide contenant le gène codant pour les différents allèles du gène *bbp*, afin de vérifier la restauration du caractère phénotypique de départ. Par ailleurs, une investigation du rôle des différentes cibles identifiées devrait pouvoir être conduite, grâce à un modèle d'adhérence cellulaire développé au laboratoire.

La pathogénicité du *S. aureus* fait appel à plusieurs déterminants génétiques. Une étude statistique matricielle adaptée est en cours de réalisation afin d'identifier un possible score de virulence éventuellement relié à une donnée clinique particulière.

Les combinaisons de facteurs de virulence impliqués dans la pathogénèse des I.O.A.M., ainsi que la place des mécanismes d'adhérence *in situ*, au matériel étranger ou à la matrice osseuse, restent encore à préciser. L'étude de la régulation transcriptionnelle de certains gènes, combinée à la recherche de leur expression phénotypique, devrait permettre de mieux appréhender divers aspects de la physiopathogénie des I.O.A.M. à *S. aureus*. D'autres investigations seront nécessaires, afin de déterminer si l'appartenance au CC8, la production de nombreux facteurs de virulence, la capacité à former du biofilm *in vitro*, ou à adhérer à des cellules osseuses *in vitro* sur le modèle développé au laboratoire, peuvent être reliées à des formes cliniques particulières ou à un pronostic plus péjoratif. La découverte de facteurs pronostics d'évolution permettrait à terme d'optimiser la prise en charge de ces infections, notamment par un dépistage nasal ciblé des patients à risque, devant subir une arthroplastie de la hanche ou du genou.

Bibliographie

1. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* 14 oct 2004;351(16):1645-1654.
2. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am.* avr 2007;89(4):780-785.
3. [Recommendations for clinical practice. Osteo-articular infection therapy according to materials used (prosthesis, implants, osteosynthesis)]. *Med Mal Infect.* oct 2009;39(10):745-774.
4. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr. Opin. Infect. Dis.* août 2006;19(4):349-356.
5. Van Belkum A, Verkaik NJ, De Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J. Infect. Dis.* 15 juin 2009;199(12):1820-1826.
6. Mandal S, Berendt AR, Peacock SJ. *Staphylococcus aureus* bone and joint infection. *J. Infect.* avr 2002;44(3):143-151.
7. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* janv 2008;52(1):13-22.
8. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int. J. Med. Microbiol.* févr 2010;300(2-3):193-204.
9. Métaizeau J. Infections ostéo-articulaires primitives de l'enfant, Cahiers d'enseignement de la SOFCOT. 1983.
10. Gaudin A, Amador Del Valle G, Hamel A, Le Mabecque V, Miegerville A-F, Potel G, et al. A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbit. *Lett. Appl. Microbiol.* mars 2011;52(3):253-257.
11. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet.* 24 juill 2004;364(9431):369-379.
12. Dessì A, Crisafulli M, Accossu S, Setzu V, Fanos V. Osteo-articular infections in newborns: diagnosis and treatment. *J Chemother.* oct 2008;20(5):542-550.

13. Gutierrez K. Bone and joint infections in children. *Pediatr. Clin. North Am.* juin 2005;52(3):779-794, vi.
14. Hamel A. Contributions cliniques et expérimentales à l'étude des infections ostéo-articulaires de l'enfant. [Nantes]: Faculté de Médecine; 2008.
15. Allais E. Diagnostic bactériologique des infections ostéo-articulaires : apport d'une nouvelle technique basée sur la technologie des puces à ADN. [Lyon]: Université Claude Bernard; 2010.
16. Cordero-Ampuero J, De Dios M. What are the risk factors for infection in hemiarthroplasties and total hip arthroplasties? *Clin. Orthop. Relat. Res.* déc 2010;468(12):3268-3277.
17. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, et al. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin. Infect. Dis.* nov 1998;27(5):1247-1254.
18. Zimmerli W, Ochsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection.* mars 2003;31(2):99-108.
19. Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect. Immun.* oct 2007;75(10):4728-4742.
20. Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, et al. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.* déc 2009;4(10):1337-1352.
21. Crémieux A-C, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Côté J-F, Muffat-Joly M, et al. Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS ONE.* 2009;4(9):e7204.
22. Götz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol. Microbiol.* mars 2002;43(6):1367-1378.
23. García-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* juin 2011;25(3):407-421.
24. Goldenberg DL, Reed JI. Bacterial arthritis. *N. Engl. J. Med.* 21 mars 1985;312(12):764-771.
25. Grimpel E, Cohen R. [Epidemiology and physiopathology of osteoarticular infections in children (newborns except)]. *Arch Pediatr.* oct 2007;14 Suppl 2:S81-85.
26. Cottle L, Riordan T. Infectious spondylodiscitis. *J. Infect.* juin 2008;56(6):401-412.

27. [Primary infectious spondylitis, and following intradiscal procedure, without prosthesis. Recommendations]. *Med Mal Infect.* sept 2007;37(9):573-583.
28. Portier H, Choutet P, Peyramond D, Saimot A, Soussy C, Stahl J. *Revue de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Troisième conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Les infections bactériennes ostéoarticulaires en dehors des infections à mycobactéries.* *Med Mal Infect.* 1991;(20):37-44.
29. Powlson AS, Coll AP. The treatment of diabetic foot infections. *J. Antimicrob. Chemother.* nov 2010;65 Suppl 3:iii3-9.
30. Sotto A, Richard J-L, Jourdan N, Combescure C, Bouziges N, Lavigne J-P. Miniaturized oligonucleotide arrays: a new tool for discriminating colonization from infection due to *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* août 2007;30(8):2051-2056.
31. Courtais Caroline. Lien entre le portage nasal de *Staphylococcus aureus* et les infections des plaies du pied chez les patients diabétiques. [Montpellier]: Faculté de Pharmacie; 2012.
32. Management of diabetic foot infections. Short text. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. *Med Mal Infect.* janv 2007;37(1):1-25.
33. Prise en charge du pied diabétique infecté. Texte long. *Médecine et Maladies Infectieuses.* janv 2007;37(1):26-50.
34. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin. Infect. Dis.* juin 2012;54(12):e132-173.
35. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge des infections dans le mois suivant l'implantation. [Internet]. HAS; [cité 25 mai 2012]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-03/note_cadrage_pec_ptg_ptg_infec_versionmel.pdf
36. Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin. Infect. Dis.* 1 mai 2003;36(9):1157-1161.
37. Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* [Internet]. 6 févr 2012 [cité 15 avr 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309166>

38. Hsieh P-H, Lee MS, Hsu K-Y, Chang Y-H, Shih H-N, Ueng SW. Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. *Clin. Infect. Dis.* 1 oct 2009;49(7):1036-1043.
39. Cataldo MA, Petrosillo N, Cipriani M, Cauda R, Tacconelli E. Prosthetic joint infection: recent developments in diagnosis and management. *J. Infect.* déc 2010;61(6):443-448.
40. Borens O, Corvec S, Trampuz A. Diagnosis of periprosthetic joint infections. *Hip Int.* août 2012;22 Suppl 8:S9-14.
41. Morawietz L, Classen R-A, Schröder JH, Dinybil C, Perka C, Skwara A, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J. Clin. Pathol.* juin 2006;59(6):591-597.
42. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs.* 7 nov 2012;
43. Sendi P, Banderet F, Graber P, Zimmerli W. Clinical comparison between exogenous and haematogenous periprosthetic joint infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* juill 2011;17(7):1098-1100.
44. Sendi P, Zimmerli W. Challenges in periprosthetic knee-joint infection. *Int J Artif Organs.* sept 2011;34(9):947-956.
45. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J. Infect. Dis.* oct 1982;146(4):487-497.
46. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* déc 2005;5(12):751-762.
47. Skråmm I, Moen AEF, Bukholm G. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: frequency and molecular diversity in a randomly sampled Norwegian community population. *APMIS.* août 2011;119(8):522-528.
48. Kalmeijer MD, Van Nieuwland-Bollen E, Bogaers-Hofman D, De Baere GA. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is a major risk factor for surgical-site infections in orthopedic surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol.* mai 2000;21(5):319-323.

49. Berthelot P, Grattard F, Cazorla C, Passot J-P, Fayard J-P, Meley R, et al. Is nasal carriage of *Staphylococcus aureus* the main acquisition pathway for surgical-site infection in orthopaedic surgery? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* avr 2010;29(4):373-382.
50. Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA, Sheppard D, et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 13 juin 2002;346(24):1871-1877.
51. Barberán J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin. Microbiol. Infect.* mai 2006;12 Suppl 3:93-101.
52. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 20 août 1998;339(8):520-532.
53. Lowy FD. How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. *N. Engl. J. Med.* 26 mai 2011;364(21):1987-1990.
54. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 1 juin 2008;46 Suppl 5:S350-359.
55. Ferry T. Rôle des exotoxines superantigéniques dans le choc toxique et le choc septique à *Staphylococcus aureus*. Université Claude-Bernard, Lyon 1; 2007.
56. Al Alam D. Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales bronchiques et *Staphylococcus aureus* sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Reims Champagne Ardenne; 2008.
57. Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* juill 1988;1(3):281-299.
58. Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur. J. Cell Biol.* janv 2010;89(1):103-111.
59. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* janv 2004;17(1):218-234.
60. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* déc 1998;6(12):484-488.
61. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* nov 2011;6(11):1329-1349.

62. Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*. févr 2012;15(1):92-99.
63. Sabat A, Melles DC, Martirosian G, Grundmann H, Van Belkum A, Hryniewicz W. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* mars 2006;44(3):1135-1138.
64. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J. Clin. Microbiol.* sept 2003;41(9):4465-4467.
65. Peacock SJ, Day NP, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J. Infect.* juill 2000;41(1):23-31.
66. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, Christodoulou G, Tagaris G, Dimitracopoulos G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin as a cause of acute osteomyelitis in children. *Clin. Microbiol. Infect.* juin 2007;13(6):651-654.
67. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* déc 2005;3(12):948-958.
68. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Pirini V, Ravaioli S, Cangini I, et al. Polymorphisms of *agr* locus correspond to distinct genetic patterns of virulence in *Staphylococcus aureus* clinical isolates from orthopedic implant infections. *J Biomed Mater Res A*. 1 sept 2010;94(3):825-832.
69. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.* août 2005;(437):41-47.
70. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J. Biomed. Mater. Res.* 5 mars 2002;59(3):557-562.
71. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 21 mai 1999;284(5418):1318-1322.
72. Testoni F, Montanaro L, Poggi A, Visai L, Campoccia D, Arciola CR. Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesin gene pattern. *Int J Artif Organs*. sept 2011;34(9):789-798.

73. Frank KL, Hanssen AD, Patel R. *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* oct 2004;42(10):4846-4849.
74. Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* juin 2003;14(3):255-261.
75. Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Arciola CR, Montanaro L. Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* mai 2001;20(5):343-345.
76. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. *Int J Artif Organs.* sept 2007;30(9):757-763.
77. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* mars 2004;186(6):1838-1850.
78. O’Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* mai 2007;270(2):179-188.
79. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* juill 2004;186(14):4665-4684.
80. Korem M, Gov Y, Kiran MD, Balaban N. Transcriptional profiling of target of RNAPIII-activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect. Immun.* oct 2005;73(10):6220-6228.
81. Lasa I, Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* mars 2006;157(2):99-107.
82. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* juin 2010;5(6):917-933.
83. Ranjit DK, Endres JL, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties. *J. Bacteriol.* mai 2011;193(10):2468-2476.
84. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 14 juill 2001;358(9276):135-138.
85. Sittka A, Vogel J. A glimpse at the evolution of virulence control. *Cell Host Microbe.* 16 oct 2008;4(4):310-312.

86. Aubin GG, Bémer P, Guillouzouic A, Crémet L, Touchais S, Fraquet N, et al. First report of a hip prosthetic and joint infection caused by *Lactococcus garvieae* in a woman fishmonger. *J. Clin. Microbiol.* mai 2011;49(5):2074-2076.
87. François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christel Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin. *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. 2^e éd. Masson;
88. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* sept 1995;33(9):2233-2239.
89. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* mars 2000;38(3):1008-1015.
90. Crémet L, Corvec S, Batard E, Auger M, Lopez I, Pagniez F, et al. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* mars 2013;75(3):252-255.
91. Toté K, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* févr 2008;46(2):249-254.
92. Sandberg ME, Schellmann D, Brunhofer G, Erker T, Busygin I, Leino R, et al. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J. Microbiol. Methods.* juill 2009;78(1):104-106.
93. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods.* févr 2008;72(2):157-165.
94. Nyame TT, Lemon KP, Kolter R, Liao EC. High-throughput assay for bacterial adhesion on acellular dermal matrices and synthetic surgical materials. *Plast. Reconstr. Surg.* nov 2011;128(5):1061-1068.
95. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* sept 2000;267(17):5421-5426.

96. Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Carnero-Varo M, Fernandez-Crehuet J. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* mars 2009;82(4):773-783.
97. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* déc 1985;22(6):996-1006.
98. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* août 2007;115(8):891-899.
99. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods.* mars 2007;68(3):605-612.
100. Corrigan RM, Foster TJ. An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* mars 2009;61(2):126-129.
101. Berscheid A, Sass P, Weber-Lassalle K, Cheung AL, Bierbaum G. Revisiting the genomes of the *Staphylococcus aureus* strains NCTC 8325 and RN4220. *Int. J. Med. Microbiol.* mars 2012;302(2):84-87.
102. Eucast [Internet]. [cité 5 juin 2012]. Disponible sur: <http://mic.eucast.org/Eucast2/>
103. Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* nov 2004;70(11):6887-6891.
104. Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods.* mai 2009;6(5):343-345.
105. Gibson DG. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Meth. Enzymol.* 2011;498:349-361.
106. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 30 nov 1990;96(1):23-28.

107. Rasigade J-P, Laurent F, Hubert P, Vandenesch F, Etienne J. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. *Emerging Infect. Dis.* août 2010;16(8):1330.
108. Rydén C, Maxe I, Franzén A, Ljungh A, Heinegård D, Rubin K. Selective binding of bone matrix sialoprotein to *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis. *Lancet.* 29 août 1987;2(8557):515.
109. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS Microbiol. Lett.* 1 mai 2005;246(1):81-86.
110. Campoccia D, Speziale P, Ravaioli S, Cangini I, Rindi S, Pirini V, et al. The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections. *Biomaterials.* déc 2009;30(34):6621-6628.
111. Aamot HV, Blomfeldt A, Skråmm I, Müller F, Monecke S. Molecular characterisation of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* from deep surgical site infections in orthopaedic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* août 2012;31(8):1999-2004.
112. Schuenck RP, Cavalcante FS, Emery E, Marval MG, Santos KRND. *Staphylococcus aureus* isolates belonging to different multilocus sequence types present specific virulence gene profiles. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* [Internet]. 22 mars 2012 [cité 18 avr 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443809>
113. Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, et al. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 1 sept 2005;192(5):801-810.
114. Lattar SM, Tuscherr LPN, Centrón D, Becker K, Predari SC, Buzzola FR, et al. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis in Argentina and clonal distribution of the *cap5(8)* genes and of other selected virulence genes. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* [Internet]. 27 mars 2012 [cité 6 juin 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450741>

115. Van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, Van Leeuwen WB, Van Duijkeren E, Huijsdens XW, et al. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerging Infect. Dis.* mars 2008;14(3):479-483.
116. Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int. J. Med. Microbiol.* août 2011;301(6):500-505.
117. Fluit AC. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [Internet]. 19 mars 2012 [cité 1 mai 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22512702>
118. Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerging Infect. Dis.* mai 2005;11(5):711-714.
119. Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, et al. Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* nov 2007;26(11):1042-1048.
120. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence.* oct 2011;2(5):445-459.
121. Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprosthetic infections. *Diagn. Mol. Pathol.* juin 2001;10(2):130-137.
122. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, et al. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog.* avr 2012;8(4):e1002626.
123. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* avr 2004;72(4):2177-2185.
124. Vautor E, Abadie G, Pont A, Thiery R. Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Veterinary Microbiology.* 18 mars 2008;127(3-4):407-411.

125. Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* sept 2011;19(9):449-455.
126. Croes S, Deurenberg RH, Boumans M-LL, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiol.* 2009;9:229.
127. Tung H s, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Rydén C. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem. J.* 1 févr 2000;345 Pt 3:611-619.

Nom - Prénoms : AUBIN Guillaume Ghislain Pierre

Titre du mémoire – thèse :

Analyses génotypiques et phénotypiques des souches de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections ostéo-articulaires sur matériel

Résumé du mémoire – thèse :

Staphylococcus aureus est une des principales bactéries responsables d'infections ostéo-articulaires sur matériel (I.O.A.M.). Nous avons étudié la capacité de ces *S. aureus* à produire du biofilm et comparé leur patrimoine génétique afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces infections.

Cinquante-sept souches de *S. aureus* ont été isolées d'I.O.A.M., entre 2007 et 2010, au C.H.U. de Nantes. Une cohorte de souches de *S. aureus* colonisantes a été également constituée, à partir de patients consultants en Orthopédie. Le typage moléculaire a été effectué par électrophorèse en champs pulsés et M.L.S.T. Leur patrimoine génétique a été analysé par puces à ADN. La production de biofilm *in vitro* a été étudiée par les techniques au crystal violet et à la résazurine. Trois groupes de bactéries faiblement, modérément ou fortement productrices de biofilm ont été identifiés.

Les souches infectantes appartenaient à 5 groupes de pulsotypes et 18 sequence types différents. Les complexes clonaux 30, 5, 8, 45 et 15 étaient prédominants (25, 19, 17, 16 et 7 % respectivement). Aucune différence significative de répartition n'a été observée entre nos cohortes infectantes et colonisantes.

Les souches de *S. aureus* appartenant au CC8 produisaient fortement du biofilm. Le génotypage a révélé que ces isolats possédaient un allèle particulier des gènes codant pour la protéine liant la sialoprotéine osseuse (Bbp) et pour la protéine liant la fibronectine B (FnB).

MOTS-CLÉS :

STAPHYLOCOCCUS AUREUS - INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES - BIOFILM.

JURY

PRESIDENT : M. Alain REYNAUD, Professeur de Bactériologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. David BOUTOILLE, Professeur de Maladies Infectieuses
Faculté de Médecine de Nantes
M. François GOUIN, Professeur de Chirurgie Orthopédique
Faculté de Médecine de Nantes
M. Didier LEPELLETIER, Professeur d'Hygiène Hospitalière
Faculté de Médecine de Nantes
M. Stéphane CORVEC, Maître de Conférences de Bactériologie
Faculté de Médecine de Nantes
