UNIVERSITÉ DE NANTES
U.F.R. DE PHARMACIE

———

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

2015 N° 01

Physiopathologie des infections ostéo-articulaires sur matériel à *Escherichia coli*

———————

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Biologie, médecine et santé
Spécialité : Bactériologie

Présentée
et soutenue publiquement par

Lise CREMET

Le 8 Janvier 2015, devant le jury ci-dessous

Président :		
Rapporteurs :	Pr. GANGLOFF Sophie	Université de Reims
	Pr. LAVIGNE Jean-Philippe	Université de Nîmes
Examinateurs :	Pr. SENNEVILLE Eric	Université de Lilles
	Pr. ASEHNOUNE Karim	Université de Nantes
	Pr. HEYMANN Dominique	Université de Nantes

Directeur de thèse : Pr. CAROFF Nathalie
Co-directeur de thèse : Dr. CORVEC Stéphane

SOMMAIRE

TABLE DES ABREVIATIONS **1**
LISTE DES TABLEAUX **2**
LISTE DES FIGURES **3**
INTRODUCTION **4**
CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE **7**
1 CLASSIFICATION DES IOAMs 8
2 DIAGNOSTIC DES IOAMs 10
3 EPIDEMIOLOGIE DES IOAMs 11
4 PHYSIOPATHOLOGIE DES IOAMs, EXEMPLE DU STAPHYLOCOQUE 15
4.1 INTERACTION BACTERIES – CELLULES OSSEUSES 15
4.2 INTERACTION BACTERIES – SYSTEME IMMUNITAIRE INNE 17
4.3 INTERACTION BACTERIES – MATERIEL 20
5 POUVOIR PATHOGENE DE *E. COLI* 22
5.1 PHYLOGENIE ET DIVERSITE 22
5.2 PLASTICITE DU GENOME ET PATHOGENICITE 24
5.3 PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS URINAIRES A *E. COLI* 27
5.3.1 INTERACTION *E. COLI* – CELLULES UROTHELIALES 27
5.3.2 INFECTIONS URINAIRES RECURRENTES ET FORMATION DE BIOFILM 29
5.3.3 INTERACTION *E. COLI* – SYSTEME IMMUNITAIRE INNE 30
CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE **33**
NATURE ET OBJECTIFS DES RECHERCHES 34
1 ETUDE GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE DE SOUCHES CLINIQUES DE *E. COLI* ISOLEES D'IOAMs 36
1.1 PRESENTATION 36
1.2 METHODES ET RESULTATS 36
1.3 COMMENTAIRES 20
2 ETUDE DE L'INTERACTION *E. COLI* – OSTEOBLASTES *IN VITRO* 49
2.1 PRESENTATION 49
2.2 METHODES ET RESULTATS 49
2.3 COMMENTAIRES 65
3 ETUDE DE LA RESISTANCE DE SOUCHES DE *E. COLI* ISOLEES D'IOAMs A L'ACTIVITE BACTERICIDE DU SERUM ET DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES 72
3.1 PRESENTATION 72
3.2 METHODES ET RESULTATS 72
3.3 COMMENTAIRES 83
CHAPITRE III : DISCUSSION **93**
CONCLUSION – PERSPECTIVES **107**
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **109**

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CNF1	Cytotoxic Necrotizing Factor 1
CREB	cAMP-Responsive Element Binding
EAEC	*E. coli* entéroaggregatif
EBJIS	European Bone and Joint Infection Society
ECBU	Examen Cyto-Bactériologique des Urines
EHEC	*E. coli* entérohémorragique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETEC	*E. coli* entérotoxinogène
ExPEC	*E. coli* à tropisme extra-intestinal
HAS	Haute Autorité de Santé
IBC	Intracellular Bacterial Communities
ICMPJI	International Consensus Meeting on Peri-prosthetic Joint Infection
IDSA	Infectious Diseases Society of America
InPEC	*E. coli* à tropisme intestinal
IOAM	Infection Ostéo-Articulaire sur Matériel
LBP	Lipopolysaccharide-Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MNEC	*E. coli* responsable de méningites
MOI	Multiplicity of infection
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecule
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
PAI	Pathogenicity island (Ilôt de pathogénicité)
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSM	Phénol soluble moduline
QIR	Quiescent Intracellular Reservoir
RANK-L	Receptor activator of NF-κB ligand
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCV	Small Colony Variant
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SPILF	Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
ST	Sequence Type
TLR	Toll-like receptor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
UFC	Unité Formant Colonie
UPEC	*E. coli* uropathogène

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des infections sur prothèse, d'après Trampuz *et* Zimmerli….....9

Tableau II : Nouvelle classification des infections sur prothèse, d'après Zimmerli……....9

Tableau III : Classification des IOAMs en fonction des délais de survenue de l'infection après la pose de matériel…….……..9

Tableau IV : Microbiologie de 192 infections de prothèse diagnostiquées entre 2010 et 2012 dans 7 hôpitaux de la région Grand Ouest……..14

Tableau V : Microbiologie de 174 infections de prothèse à bacilles à Gram négatif traitées par débridement (16 hôpitaux espagnols, 2003-2010)…….....14

Tableau VI : Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens produits par les polynucléaires neutrophiles…….85

Tableau VII : Analyse des séquences peptidiques Wzz de 11 souches de *E. coli*…….…….90

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Impact de *S. aureus* sur la résorption osseuse……..….16

Figure 2 : Modèle de l'interaction entre *S. aureus* et les ostéoblastes……..16

Figure 3 : Réponses immunes innées induites par l'interaction sang - matériel…….……..19

Figure 4 : TLRs et "cross-talk" entre cellules osseuses et immunitaires……...……19

Figure 5 : Phases de développement du biofilm……...…….20

Figure 6 : Complexes clonaux d'ExPEC (eBURST)……23

Figure 7 : Structure schématique du LPS de *E. coli*……..24

Figure 8 : Evolution des core et pan-génomes de *E. coli*…….….26

Figure 9 : Transferts horizontaux de matériel génétique chez *E. coli*……...…26

Figure 10 : IBC dans le cadre d'une cystite aiguë……...…..32

Figure 11 : Cycle de vie des UPEC intracellulaires…….….32

Figure 12 : Schéma de l'opéron *hlyCABD* et du gène *cnf1* (UPEC J96)……..68

Figure 13 : Cascade d'activation du complément……...…..86

Figure 14 : Analyse des protéines de membrane externe après extraction, électrophorèse sur gel d'acrylamide, puis coloration au Bleu de Coomassie…….……..90

Figure 15 : Mesure par cytométrie en flux de l'opsonisation de 11 souches de *E. coli* par les IgG, IgM, ou les fragments C3b/C3bi sériques……..91

Figure 16 : Etude de la fixation du colorant rouge congo par les 40 *E. coli* de notre étude…….92

INTRODUCTION

Bien que le taux d'infection soit aujourd'hui faible en chirurgie orthopédique prothétique (de l'ordre de 2000 à 2500 cas par an en France), les infections ostéo-articulaires sur matériel (IOAMs) représentent une complication grave pour le patient et un défi de taille pour la communauté médicale (HAS *et al*., 2014).

Le diagnostic d'IOAM repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, biologiques et microbiologiques affirmant le développement d'un processus infectieux au contact direct d'une prothèse, d'un matériel d'ostéosynthèse (plaques, clous, vis…) ou d'un substitut osseux. Ces infections, responsables de dégâts osseux parfois majeurs, peuvent laisser des séquelles fonctionnelles et, dans certains cas, mettre en jeu le pronostic vital. Leurs circonstances de découverte, très variées, sont le reflet direct d'une physiopathogénie complexe et multifactorielle. Ainsi, entrent en jeu, le type de matériel, la localisation, le mode de contamination, la durée d'évolution, le(s) micro-organisme(s) en cause ou des facteurs de risque inhérents au patient. Leur prise en charge combine traitement chirurgical avec parfois de multiples reprises et antibiothérapie prolongée. La qualité de cette prise en charge repose essentiellement sur des référentiels régulièrement actualisés et nécessite une concertation pluridisciplinaire entre chirurgiens, bactériologistes, infectiologues, radiologues, anesthésistes et rééducateurs fonctionnels (SPILF *et al*., 2009 ; Osmon *et al.*, 2013, Parvizi *et al.*, 2013 ; HAS *et al*., 2014).

Cette prise en charge constitue un enjeu majeur de Santé Publique et, dans ce cadre, le Ministère de la Santé s'est engagé en Septembre 2008, à reconnaître huit puis neuf centres de référence interrégionaux ayant une mission de coordination, d'expertise, de formation et de recherche, ainsi que de prise en charge des infections ostéo-articulaires les plus complexes. En effet, avec l'allongement de l'espérance de vie, le nombre de personnes porteuses d'implants articulaires a fortement augmenté, avec en parallèle, une augmentation des complications. La prothèse articulaire constitue le traitement le plus efficace de l'arthrose, mais est associée à un risque d'infection à vie. Aux Etats-Unis, on estime que 60 000 à 70 000 cas d'infections sur prothèses de hanche ou genou devraient être pris en charge en 2020, pour un coût annuel d'environ 1,62 milliards de dollars US (Kurtz *et al*., 2012). En France, bien que le taux d'incidence des IOAMs soit aujourd'hui plus bas qu'aux Etats-Unis (0,02% *vs* 2%, respectivement, en 2008), l'impact médical et économique global de ces infections n'en est pas moins considérable (Grammatico-Guillon *et al*., 2013). Ainsi, par exemple, en France, la durée moyenne d'hospitalisation pour prise en charge d'une IOAM est plus longue qu'aux

Etats-Unis : 18,9 jours *vs* 9,5 jours, et les coûts associés à cette prise en charge étaient estimés à 8161 euros par séjour, en 2008 (Grammatico-Guillon *et al*., 2013).

Pour toutes ces raisons, la recherche scientifique et médicale a fortement progressé dans la compréhension des aspects fondamentaux des infections ostéo-articulaires, et dans le développement et l'évaluation de stratégies thérapeutiques (En date du 05.11.2014, 13232 références dans la base de données bibliographiques *Medline* pour une recherche associant "bone" "joint" "infections" *OR* "orthopaedic" "implant" "infections", dont 288 études parues en 2000 contre 740 en 2013). Toutefois, les recherches cliniques et fondamentales ciblant les IOAMs à bacilles à Gram négatif restent limitées. La pathogenèse des IOAMs à *Escherichia coli* - premier agent responsable d'infections communautaires et nosocomiales - est encore mal connue, motivant ce travail sur la physiopathologie des IOAMs dues à cette bactérie.

Le premier chapitre de ce mémoire sera consacré à une revue bibliographique. Après un rappel des connaissances actuelles sur la classification et la microbiologie des IOAMs, les mécanismes physiopathologiques actuellement identifiés dans le cadre d'IOAMs à *S. aureus* seront traités, afin de servir de point de comparaison pour nos travaux. Enfin, nous nous intéresserons à la diversité génétique et au pouvoir pathogène de *E. coli*, en nous focalisant sur les souches responsables d'infections urinaires et les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces infections. Dans le second chapitre de ce manuscrit, nous présenterons les résultats de nos travaux sous la forme d'articles acceptés ou en cours de soumission, précédés chacun d'une courte présentation et suivis de quelques commentaires. Enfin, le dernier chapitre sera dédié à la discussion de ces travaux de recherche mis en perspective par rapport aux données récentes issues de la littérature.

CHAPITRE I :

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

1 CLASSIFICATION DES IOAMs

Les situations cliniques dans lesquelles une IOAM peut être diagnostiquée sont très diverses. Cela a conduit certains auteurs à distinguer des cadres nosologiques différents, afin de comparer plus facilement ces situations, et de proposer une aide au choix du traitement le mieux adapté. Ainsi, de nombreuses classifications ont été proposées pour définir les IOAMs, sans consensus sur leur utilisation (Barberan, 2006 ; SPILF *et al*., 2009 ; Barrett *et* Atkins, 2014 ; Tande *et* Patel, 2014).

Classiquement, les IOAMs sont classées en fonction du mode supposé d'inoculation (contamination per-, post-opératoire ou hématogène) et du délai entre l'apparition des signes d'infection et la date de la mise en place chirurgicale du matériel (survenue précoce, retardée ou tardive). Ces infections se manifestent, selon leur étiologie et les facteurs de risque du patient, sous forme aiguë (désunion, nécrose ou inflammation cicatricielle, écoulement, signes généraux) ou chronique (douleur non spécifique, descellement radiologique), ces termes ne devant pas être confondus avec le délai de diagnostic de l'infection (SPILF *et al*., 2009).

Les classifications actuelles, inspirées des travaux de Tsukayama et Zimmerli (Tableaux I et II), recoupent les tableaux cliniques observés en pratique et permettent de proposer des recommandations thérapeutiques concrètes et pratiques en fonction du mode de présentation de l'infection. Néanmoins, une ambiguïté persiste quand à la définition des termes "précoce", "retardée" ou "tardive". En effet, si les sociétés savantes américaines (IDSA, ICMPJI, MSIS) définissent comme précoce une infection survenant dans les 3 premiers mois après la pose de prothèse, le délai retenu en France (SPILF) est plus court (1 mois) (Tableau III) (SPILF *et al*., 2009 ; Osmon *et al.*, 2013 ; Parvizi *et al.*, 2013 ; Parvizi *et* Gehrke, 2014). Ces différences ne facilitent pas le choix entre traitement chirurgical conservateur et changement de prothèse, dans ce contexte. Le traitement conservateur présente l'avantage d'une chirurgie moins invasive, ainsi qu'un coût moindre : le matériel est laissé en place, un parage chirurgical soigneux de tous les tissus macroscopiquement suspects, ainsi qu'un lavage abondant et soigneux du site opératoire sont réalisés. Les différentes études et recommandations portant sur cette modalité thérapeutique montrent que ce choix est d'autant plus efficace que le matériel est stable, la peau et les tissus sont intacts, la durée des symptômes est inférieure à trois semaines, et que l'infection est précoce (sous entendant, dans le premier ou les trois premiers mois après la pose de l'implant, selon les études) (Lora-Tamayo *et al*., 2013 ; Achermann *et al*., 2014; Ollivier *et al*., 2014; Zimmerli, 2014).

Tableau I : Classification des infections sur prothèse, d'après Trampuz et Zimmerli.
Source : Trampuz *et* Zimmerli, 2008

Table 1. Classification of implant-associated infections according to the onset of symptoms after implantation

Classification	Prosthetic joint infections	Infections associated with fracture fixation devices	Pathogenesis	Typical microorganisms
Early infection	< 3 mo	< 2 wk	During implant surgery or the following 2–4 days	Highly virulent organisms such as *Staphylococcus aureus* or gram-negative bacilli
Delayed infection	3–24 mo	2–10 wk	During implant surgery with delayed manifestation	Less virulent organisms such as coagulase-negative staphylococci or *Propionibacterium acnes*
Late infection	> 24 mo	> 10 wk	Predominantly caused by hematogenous seeding from remote infections	Typically caused by virulent microorganisms such as *S. aureus*, streptococci, or gram-negative bacilli

Tableau II : Nouvelle classification des infections sur prothèse, d'après Zimmerli.
Source : Zimmerli *et al*., 2014

TYPE OF PJI	CHARACTERISTICS
Acute haematogenous	Infection with a duration of symptoms of 3 weeks or less after an uneventful postoperative period
Early postinterventional	Infection which manifests within 1 month after an invasive procedure such as surgery or arthrocentesis
Chronic	Infection with symptoms that persist for more than 3 weeks, beyond the early postinterventional period

Tableau III : Classifications des IOAMs en fonction des délais de survenue de l'infection après la pose de matériel.
Source : SPILF *et al*., 2009 ; Osmon *et al*., 2013

	France (SPILF, 2009)	**Etats-Unis (IDSA, 2013)**
Infection précoce	Premier mois	Trois premiers mois
Infection retardée	Entre le 2ème et le 6ème mois	Entre plusieurs mois et 1 à 2 ans
Infection tardive	Après le 6ème mois	Après 1 à 2 ans

2 DIAGNOSTIC DES IOAMs

De nombreuses espèces bactériennes peuvent être responsables d'infections ostéo-articulaires en présence de matériel. Ainsi, l'analyse bactériologique, parfois longue et délicate, de multiples prélèvements per-opératoires périprothétiques, va permettre d'affirmer ou d'infirmer le diagnostic et guider l'adaptation du traitement antibiotique (SPILF *et al*., 2009 ; Osmon *et al*., 2013). Le descellement d'une prothèse peut être d'origine infectieuse ou mécanique, ainsi il est important de faire le bon diagnostic pour une prise en charge optimale. Il faut souligner qu'en présence de matériel, des bactéries peu virulentes, parfois commensales de la peau (staphylocoques blancs, corynébactéries, ou *Propionibacterium acnes*), peuvent être isolées mais aussi poser la question d'une éventuelle contamination (Ribera *et al*., 2014). Afin de faciliter le diagnostic des IOAMs, les conférences de consensus de différentes organisations américaines (IDSA, ICMPJI) ou françaises (SPILF) fournissent des recommandations précises pour la réalisation des prélèvements pré- ou per-opératoires à visée diagnostique et pour l'analyse bactériologique associée (SPILF *et al*., 2009 ; Osmon *et al.*, 2013 ; Parvizi *et al.*, 2013). Ainsi, en cas d'épanchement intra-articulaire ou d'abcès au contact du matériel ostéo-articulaire, une ponction articulaire, éventuellement radioguidée, peut être réalisée quelques jours avant la chirurgie. La biopsie pré-opératoire au Tru-cut® n'a pas montré de supériorité diagnostique par rapport à la ponction, et n'est pas recommandée actuellement (Cross *et al*., 2014 ; Tande *et* Patel, 2014). Idéalement, cinq voire six prélèvements profonds per-opératoires au niveau de zones macroscopiquement pathologiques, doivent être réalisés, en début d'intervention chirurgicale, en dehors de toute antibiothérapie et avant toute antibioprophylaxie. Il est recommandé d'ensemencer ces prélèvements sur milieux enrichis solides et liquides, et de poursuivre l'incubation des milieux liquides pendant 14 jours pour permettre l'isolement de bactéries à croissance lente (*Propionibacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., ou bacilles à Gram positif aérobies, par exemple) (SPILF *et al*., 2009 ; Osmon *et al.*, 2013 ; Parvizi *et al.*, 2013 ; Tande *et* Patel, 2014). La présence d'au moins un prélèvement positif à une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée et pour lequel la question d'une contamination ne se pose pas, permet le diagnostic d'une infection. Néanmoins, il est important de souligner que la définition d'une infection à bactérie commensale de la peau diffère selon les organisations. Ainsi, d'après l'IDSA ou la SPILF, une bactérie saprophyte doit être considérée comme responsable d'IOAM si elle est isolée dans au moins trois prélèvements, alors que deux prélèvements suffisent pour l'ICMPJI (Ollivier *et al*., 2014).

Dans environ 10% des cas, les cultures restent stériles, rendant difficile la prise en charge des IOAMs correspondantes (Zimmerli *et al*., 2012 ; Aboltins *et al*., 2014 ; Bémer *et al*., 2014). Toutefois, de nouvelles méthodes diagnostiques ont été développées ces dernières années pour gagner en sensibilité et permettre un gain de temps comparativement à la culture. Ainsi, la sonication des prothèses explantées améliore la détection des bactéries adhérentes à la surface de l'implant, en les libérant du biofilm formé (Trampuz *et al*., 2008 ; Saeed, 2014). D'autres techniques, comme la PCR en temps réel à large spectre (ADNr 16S) ou des PCR multiplexes ciblées peuvent également faciliter le diagnostic et se révèlent spécialement utiles chez des patients ayant reçu des antibiotiques au préalable (Cazanave *et al*., 2013). Toutefois, il est important de noter que la sensibilité et la spécificité de la PCR ADNr 16S varient considérablement d'une étude à l'autre (50-92% et 65-94%, respectivement). Cette technique nécessite une étape supplémentaire de séquençage pour l'identification précise des bactéries et pose des difficultés diagnostiques en cas d'infections polymicrobiennes (Bémer *et al*., 2014 ; Hartley *et* Harris, 2014 ; Tande *et* Patel, 2014). La PCR multiplexe en temps réel pourrait s'avérer être une méthode plus rapide et sensible que la PCR ADNr 16S pour la détection des bactéries habituellement responsables d'IOAMs, mais très peu de coffrets ont été développés et sont actuellement commercialisés dans ce but (Tande *et* Patel, 2014). Enfin, de nouvelles méthodes, actuellement en développement, comme la PCR couplée à la spectrométrie de masse (ESI-MS), la microcalorimétrie, ou des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), pourraient trouver un intérêt dans ce type d'application (Corvec *et al*., 2012 ; Tande *et* Patel, 2014).

3 EPIDEMIOLOGIE DES IOAMs

Les bactéries le plus souvent isolées d'IOAMs (65 à 85 % des cas) sont des staphylocoques (*Staphylococcus aureus* ou staphylocoques à coagulase négative), ou des streptocoques. Quel que soit le délai entre la pose de la prothèse et la découverte de l'infection, *S. aureus*, en raison de sa présence habituelle dans les flores commensales et de la production d'un grand nombre de facteurs de virulence, est le micro-organisme le plus fréquent dans ce contexte (Tableau IV) (Peel *et al*. 2012 ; Ascione *et al.*, 2014 ; Bémer *et al.*, 2014). Il est admis qu'en cas de bactériémie à *S. aureus*, il existe un risque important (30-40%) d'infection secondaire de prothèse, même en cas de faible inoculum bactérien (Trampuz *et al.*, 2008 ; Zimmerli *et* Sendi, 2011). Enfin, qu'elles soient d'origine hématogène ou exogène (péri-opératoires ou post-opératoires), les IOAMs à *S. aureus* se manifestent le plus

souvent sous forme aiguë, témoignant du fort potentiel pathogène de cette bactérie. Les autres staphylocoques (*S. epidermidis, S. capitis, S. haemolyticus, S. lugdunensis, S. caprae*…), dont le rôle pathogène est étroitement lié à l'implantation de matériel, donnent lieu à des manifestations souvent retardées et des symptômes parfois non spécifiques. La forte propension des staphylocoques blancs à former du biofilm et leur caractère souvent multi-résistant aux antibiotiques, participent aux difficultés de traitement de ces infections (Tande *et* Patel, 2014).

Parmi les autres cocci à Gram positif aérobies, les streptocoques sont responsables d'environ 10% des IOAMs. Les streptocoques bêta-hémolytiques des groupes B (*S. agalactiae*) et G (*S. dysgalactiae equisimilis*) de Lancefield, sont les espèces les plus souvent isolées d'infections sur prothèse, généralement chez des patients présentant plusieurs comorbidités (obésité, diabète, immunodépression…). Ces infections présumées d'origine hématogène dans une majorité des cas, se manifestent le plus souvent sous forme aiguë, et de façon retardée ou tardive (Corvec *et al*., 2011 ; Sendi *et al*., 2011a ; Tande *et* Patel, 2014).

Les bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ou Entérobactéries : *E. coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis*…) responsables de 10 à 23 % des infections, requièrent une attention toute particulière (Tableau V) (Hsieh *et al*., 2009 ; Zmistowski *et al*., 2011 ; Rodriguez-Pardo *et al*. 2014). Rarement impliqués dans des formes cliniques frustes, ces bactéries sont généralement responsables de syndromes infectieux sévères pour lesquels le choix de l'antibiothérapie est souvent restreint (Hsieh *et al*., 2009). Généralement, *E. coli* est le bacille à Gram négatif le plus fréquemment isolé d'infection sur prothèse (Zmistowski *et al*., 2011 ; Rodriguez-Pardo *et al*. 2014). Le bacille pyocyanique, bactérie saprophyte de l'environnement, est particulièrement responsable d'infections post-traumatiques (fractures ouvertes) sur matériel d'ostéosynthèse (plaque, clou, vis, tige…) et est plus souvent associé à des échecs de traitement (Al-Mayahi *et al*., 2013). Très peu d'études se sont intéressées au pouvoir pathogène des entérobactéries dans le contexte d'IOAMs. Les travaux de Morand *et al* ont montré qu'au sein du complexe *E. cloacae*, certains clusters de bactéries (VI et VIII) étaient plus souvent responsables d'IOAMs, en raison, peut-être, d'une capacité plus importante à former des biofilms, sans que cela n'ait été démontré scientifiquement (Morand *et al*., 2009). Sendi *et al* ont décrit les propriétés biochimiques, phénotypiques et génétiques d'isolats de *E. coli* issus de biofilms formés lors d'une infection persistante de prothèse de hanche (Sendi *et al*., 2010). Plus récemment, trois cas d'infections polymicrobiennes sur prothèses de genou impliquant des souches de *K. pneumoniae*

résistantes aux carbapénèmes, ont été décrits aux USA. Les auteurs de l'étude ont souligné le caractère potentiellement incurable de ces infections (De Sanctis *et al*., 2014).

Parmi les autres bactéries isolées, les anaérobies sont à retenir. L'espèce *P. acnes*, commensale de la peau et des glandes sébacées, habituellement peu pathogène, est très souvent isolée d'infections d'ostéosynthèses rachidiennes ou de prothèse d'épaule. Il s'agit le plus souvent d'infections chroniques torpides dont la présentation clinique est atypique (Achermann *et al*., 2014 ; Tande *et* Patel, 2014). Les autres bactéries anaérobies potentiellement isolées d'IOAMs appartiennent aux genres *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, ou *Actinomyces*, ainsi qu'à l'espèce *Bacteroides fragilis*. Les infections post-traumatiques sur matériel d'ostéosynthèse à *Clostridium* spp sont particulièrement graves et difficiles à traiter, en raison des capacités de sporulation de ces bactéries, et de la résistance des spores aux antibiotiques (Ibnoulkhatib *et al*., 2012).

Enfin, il est important de noter que 15 à 25% des IOAMs sont polymicrobiennes, et impliquent le plus souvent des bacilles à Gram négatif, des entérocoques, des bactéries anaérobies (à l'exception de l'espèce *P. acnes*), ou diverses espèces de staphylocoques à coagulase négative. Les infections polymicrobiennes à bacilles à Gram négatif se manifestent le plus souvent sous forme aiguë et de façon précoce, tandis que les coinfections à Staphylocoques à coagulase négative surviennent plutôt de façon tardive, après une ou plusieurs reprises chirugicales (Peel *et al*., 2012 ; Tornero *et al*., 2012 ; Barrett *et* Atkins, 2014 ; Tande *et* Patel, 2014). Ces infections polymicrobiennes compliquent le diagnostic microbiologique et peuvent le rendre plus long. Le recours à de nouvelles techniques plus sensibles, comme la sonication ou la PCR ADNr 16S, pourrait augmenter le diagnostic de telles infections. Il faut cependant noter que ces techniques très sensibles sont exposées, à différentes étapes de l'analyse, à un risque accru de contaminations, ce qui rend l'interprétation bactériologique des prélèvements polymicrobiens correspondants, particulièrement difficile (Zimmerli, 2012 ; Bémer *et al*., 2014 ; Hartley *et* Harris, 2014 ; Saeed, 2014). Enfin, ces infections sont souvent associées à des difficultés de prise en charge thérapeutique (prophylaxie antibiotique per-opératoire souvent inefficace, recours à des associations de trois antibiotiques ou plus) (Peel *et al*., 2012).

Tableau IV : Microbiologie de 192 infections de prothèse diagnostiquées entre 2010 et 2012 dans 7 hôpitaux de la région Grand Ouest.
Source : Bémer *et al*., 2014

	n (%)
S. aureus	63 (33)
Staphylocoques blancs	45 (23)
Infection polymicrobienne	29 (15)
Streptocoques	19 (10)
Enterococcus faecalis	3 (2)
E. coli	5 (3)
Pseudomonas aeruginosa	4 (2)
Klebsiella sp.	3 (2)
Enterobacter cloacae	2 (1)
Proteus mirabilis	2 (1)
Anaérobies	13 (7)
Autre	4 (2)
Total	192

Tableau V : Microbiologie de 174 infections de prothèse à bacilles à Gram négatif traitées par débridement (16 hôpitaux espagnols, 2003-2010).
Source : Rodriguez-Pardo *et al*., 2014

Microorganisms	***N* = 174 episodes with 211 isolates (100%)[a]**
Enterobacteriaceae	162 (77)
Escherichia coli	63 (30)
Proteus spp.	31 (15)
Enterobacter spp.	29 (14)
Klebsiella spp.	14 (7)
Morganella morganii	10 (5)
Serratia marcescens	8 (4)
Salmonella spp.	5 (2)
Citrobacter spp.	2 (1)
Pseudomonas spp.[b]	43 (20)
Other gram-negative bacteria	6 (2)[c]

DAIR, debridement, antibiotics and implant retention; GNB, gram-negative bacteria; GN-PJI, gram-negative prosthetic joint infection.
[a]Among 174 episodes of GN-PJIs treated with DAIR, 34 were polymicrobial infections caused by more than one GNB, accounting for a total of 211 isolates.
[b]*Pseudomonas aeruginosa* in all but three cases, in which *P. stuzeri* was identified.
[c]Other GNB includes: three *Bacteroides fragilis*, one *Pasteurella multocida*, one *Alcaligenes xylosoxidans* and one *Rahnella aquatilis*.

4 PHYSIOPATHOLOGIE DES IOAMs, EXEMPLE DU STAPHYLOCOQUE

Indépendamment de la voie d'infection en cause, une IOAM peut être envisagée comme un réseau d'interaction entre trois éléments : la bactérie, le matériel implanté, et l'hôte. Dans ce sous-chapitre, nous nous focaliserons sur les facteurs liés à la bactérie, en prenant pour exemple le staphylocoque doré, dont le pouvoir pathogène dans ce contexte a été naturellement le mieux étudié, et dont certains facteurs de virulence peuvent être partagés par d'autres espèces bactériennes, ce qui en fait un bon modèle d'étude.

4.1 INTERACTION BACTERIES – CELLULES OSSEUSES

Le tissu osseux est un tissu complexe composé d'une matrice extracellulaire calcifiée principalement constituée, pour la partie organique, de fibres de collagène et d'autres protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéonectine, thrombospondine, fibronectine, vitronectine, ostéopontine, protéoglycanes), et pour la partie minérale, de cristaux d'hydroxyapatite. Ce tissu bien vascularisé est le siège d'un constant remodelage coordonné par des ostéoclastes issus de cellules souches hématopoïétiques (résorption osseuse) et des ostéoblastes issus de cellules souches mésenchymateuses (minéralisation osseuse). L'implantation d'un matériel à ce niveau s'accompagne d'une phase d'hyperhémie inflammatoire osseuse et tissulaire, qui en cas d'évolution favorable, s'atténue progressivement, avec apparition d'un tissu scléreux avasculaire peu perméable, au contact de l'implant.

De nombreuses études se sont penchées sur les interactions entre *S. aureus* et ostéoblastes ou ostéoclastes (Wright *et* Nair, 2010 ; Shi *et* Zhang, 2012 ; Claro *et al*., 2013 ; Trouillet-Assant *et al*., 2014). Ainsi, il est admis que *S. aureus* est capable de pénétrer, survivre et proliférer à l'intérieur des ostéoblastes, perturbant ainsi le remodelage osseux, en faveur d'une résorption accrue. En effet, l'infection réduit l'activité de minéralisation des ostéoblastes et induit leur apoptose par le biais des protéines TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) et NLRP3 (NOD-like receptor protein 3). De plus, les ostéoblastes infectés libèrent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF-α) ou des médiateurs stimulant la différenciation ostéoclastique (RANK-L, receptor activator of NF-κB ligand ; PGE2, prostaglandine E2) (Figure 1) (Wright *et* Nair, 2010 ; Shi *et* Zhang, 2012 ; Claro *et al*., 2013). L'invasion des ostéoclastes, quant à elle, stimule directement la capacité résorptive de ces cellules, les bactéries internalisées étant rapidement tuées (Figure 1) (Trouillet-Assant *et al*., 2014).

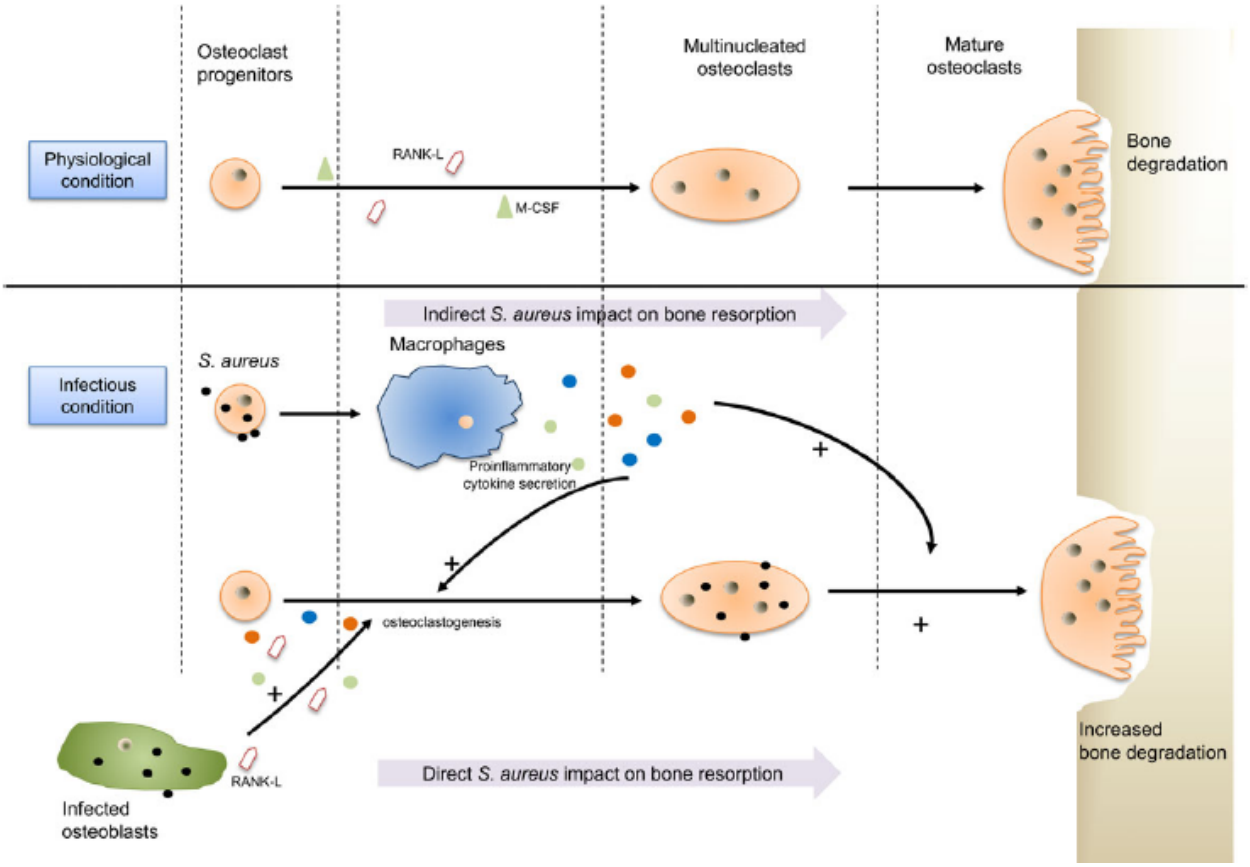


Figure 1 : Impact de *S. aureus* sur la résorption osseuse.
(Source : Trouillet-Assant *et al*., 2014).

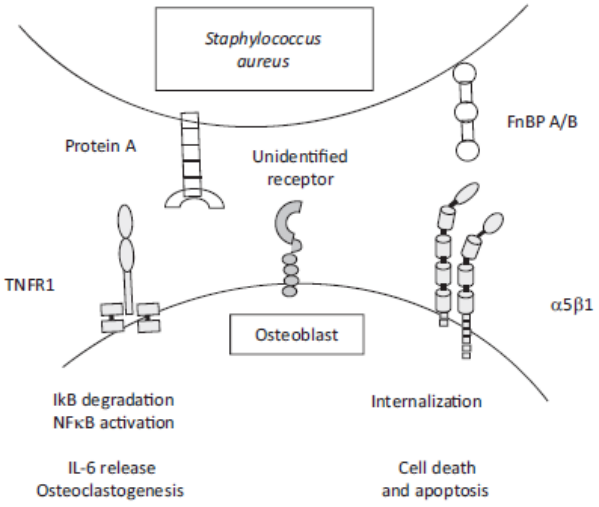


Figure 2 : Modèle de l'interaction entre *S. aureus* et les ostéoblastes.
(Source : Claro *et al*., 2013).

L'adhérence de *S. aureus* aux ostéoblastes ou ostéoclastes précède l'étape d'internalisation et semble dépendre de processus différents selon le type de cellules infectées. *S. aureus* exprime une grande variété d'adhésines appartenant à la famille des Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs), capables de reconnaître les molécules de la matrice extracellulaire (Wright *et* Nair, 2010 ; Otto, 2013). Parmi celles-ci, les protéines de liaison à la fibronectine (FnbpA/FnbpB) permettent à *S. aureus* d'interagir avec les intégrines α5-β1 transmembranaires des ostéoblastes, par le biais de la fibronectine présente à la surface de ces cellules. Cette interaction protéine-ligand mène au réarrangement du cytosquelette d'actine de la cellule et à la pénétration de *S. aureus* à l'intérieur de l'ostéoblaste. Par ailleurs, la fixation de la protéine A de surface de *S. aureus* aux récepteurs TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) des ostéoblastes, génère les signaux responsables de la perte osseuse (Figure 2, p16) (Claro *et al*., 2013). Enfin, il semble que *S. aureus* soit internalisé dans les ostéoclastes par un processus de phagocytose, ne mettant pas en jeu les protéines de liaison à la fibronectine de *S. aureus* (Trouillet-Assant *et al*., 2014).

4.2 INTERACTION BACTERIES – SYSTEME IMMUNITAIRE INNE

L'implantation d'une prothèse dans un site osseux engendre des réponses inflammatoires autour de l'implant : activation des systèmes contact, du complément, de la coagulation-fibrinoformation, et recrutement de cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages) (Figure 3, p19) (Ekdahl *et al*., 2011 ; Zimmerli *et* Sendi, 2011). Néanmoins, cette immunité locale ne protège pas d'une infection, et même un inoculum bactérien très faible au site d'implantation est susceptible d'engendrer une infection. En effet, un certain nombre de travaux expérimentaux ont mis en évidence une altération fonctionnelle des cellules phagocytaires au contact d'un matériel. La libération de microparticules non phagocytables à l'interface os-matériel, favorisée par les mouvements de l'implant au sein du tissu osseux et l'usure prothétique progressive, pourrait expliquer en partie l'altération des fonctions immunitaires locales (Zimmerli *et* Sendi, 2011).

Par ailleurs, *S. aureus* peut déployer diverses stratégies pour échapper à la réponse immunitaire innée. Ainsi, parmi les adhésines de la famille MSCRAMMs, la protéine Cna, ayant pour ligand la forme monomérique du collagène, se révèle être un inhibiteur potentiel de la voie classique du complément, par interaction avec le facteur C1q (Kang *et al*., 2013). De plus, *S. aureus* possède un arsenal de toxines cytotoxiques, capables de lyser différents

types cellulaires, lui permettant d'échapper à la phagocytose. Les phénol-soluble modulines (PSMs) en particulier, peuvent induire la lyse des polynucléaires neutrophiles et des ostéoblastes, lorsqu'elles sont produites par les bactéries intracellulaires (Rasigade *et al*., 2013). Enfin, *S. aureus* peut survivre plusieurs jours dans diverses cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles ou macrophages), entraînant un risque potentiel de dissémination de l'infection. Ainsi, les PSMs de type-α permettraient aussi aux bactéries intracellulaires de s'échapper du phagosome avant qu'il ne fusionne avec le lysosome, et de se multiplier au niveau cytoplasmique (Grosz *et al*., 2014 ; Hamza *et* Li, 2014).

Enfin, les ostéoblastes et ostéoclastes jouent également un rôle important dans l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire. En effet, lors d'une infection à *S. aureus*, les ostéoblastes permettent le recrutement de cellules phagocytaires par le biais de la libération de grandes quantités de cytokines (IL-6, IL-12, MCP-1) (Shi *et* Zhang. 2012). Il existe deux voies d'activation des ostéoblastes par *S. aureus*. L'une indirecte découle de la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et autres cellules immunitaires présentes sur le site de l'infection. Ces cytokines (IL-6, IL-1β, TNF-α…) interagissent avec des récepteurs (IL-6R, IL-1R, TNFR1, TNFR2..) de la surface des ostéoblastes. La seconde voie, est la conséquence d'une action directe de *S. aureus* ou de ses produits dérivés appelés PAMPs pour "Pathogen-Associated Molecular Patterns" (protéine A, peptidoglycane…) sur les récepteurs TNFR1 ou TLRs (Toll-like receptors) des ostéoblastes (Figure 4) (Bar-Shavit, 2008 ; Wright *et* Nair, 2010).

Par ailleurs, une étude récente indique que les précurseurs d'ostéoclastes (issus de la lignée monocytaire-macrophagique) peuvent se différencier en macrophages activés, lorsqu'ils sont infectés par *S. aureus*. Ce phénomène stimule indirectement l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse, par le biais de la libération de cytokines pro-inflammatoires (Figure 1, p16) (Trouillet-Assant *et al*., 2014). Les infections ostéo-articulaires chroniques ou récurrentes à *S. aureus*, associées à un échappement bactérien au système immunitaire et aux traitements antibiotiques, se caractérisent par l'isolement de sous populations de *S. aureus* à faible activité métabolique, appelées "Small Colony Variants" ou "SCV" (Proctor *et al*., 2014). Une moindre virulence et une expression accrue d'adhésines MSCRAMMs, favorisent l'invasion et la persistance de ces SCV à l'intérieur des ostéoblastes (Wright *et* Nair, 2010 ; Tuchscherr *et al*., 2011 ; Kalinka *et al*., 2014).

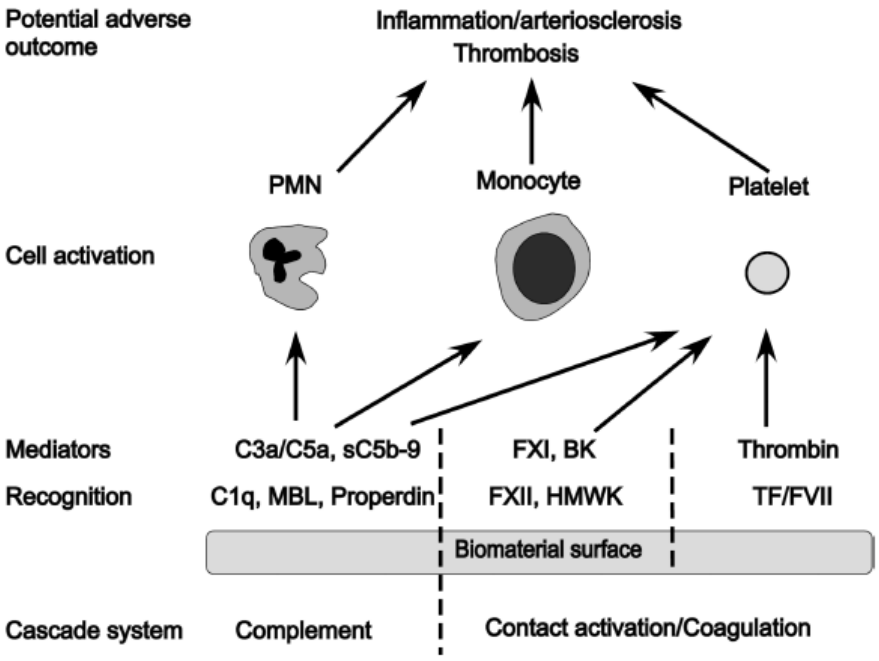


Figure 3 : Réponses immunes innées induites par l'interaction sang - matériel.
(Source : Ekdahl *et al*., 2011).

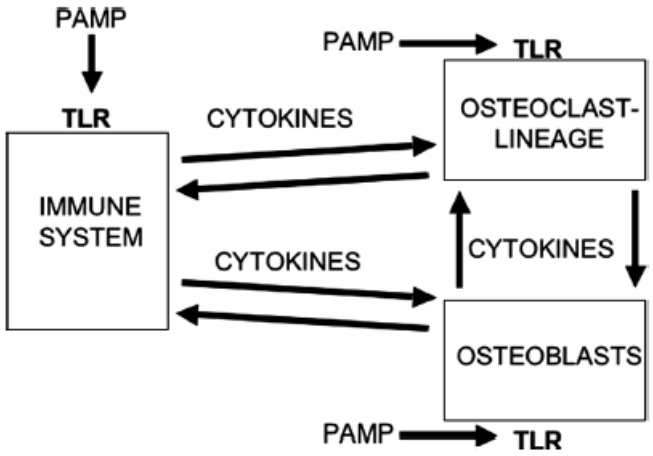


Figure 4 : TLRs et "cross-talk" entre cellules osseuses et immunitaires.
(Source : Bar-Shavit *et al*., 2008).

4.3 INTERACTION BACTERIES – MATERIEL

Une des caractéristiques essentielles de *S. aureus* et des staphylocoques blancs, moins virulents, est leur capacité à adhérer et s'organiser à la surface du matériel implanté, sous forme de biofilm. Au sein de ces communautés bactériennes organisées et entourées d'une gangue polysaccharidique autoproduite, les bactéries, en phase de croissance ralentie, échappent à l'effet bactéricide des antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte. La formation du biofilm est un processus dynamique très complexe, étroitement régulé, qui peut être décomposé en plusieurs phases : une première d'adhérence réversible puis irréversible des bactéries à la surface du matériel implanté ; une seconde de maturation du biofilm durant laquelle les bactéries s'entourent d'une matrice extracellulaire visqueuse (« slime ») composée de polysaccharides, protéines et d'ADN extracellulaire ; et une troisième marquée par le détachement de certains contingents de bactéries qui sous forme planctonique, pourront aller coloniser d'autres surfaces (Figure 5) (Otto, 2013).

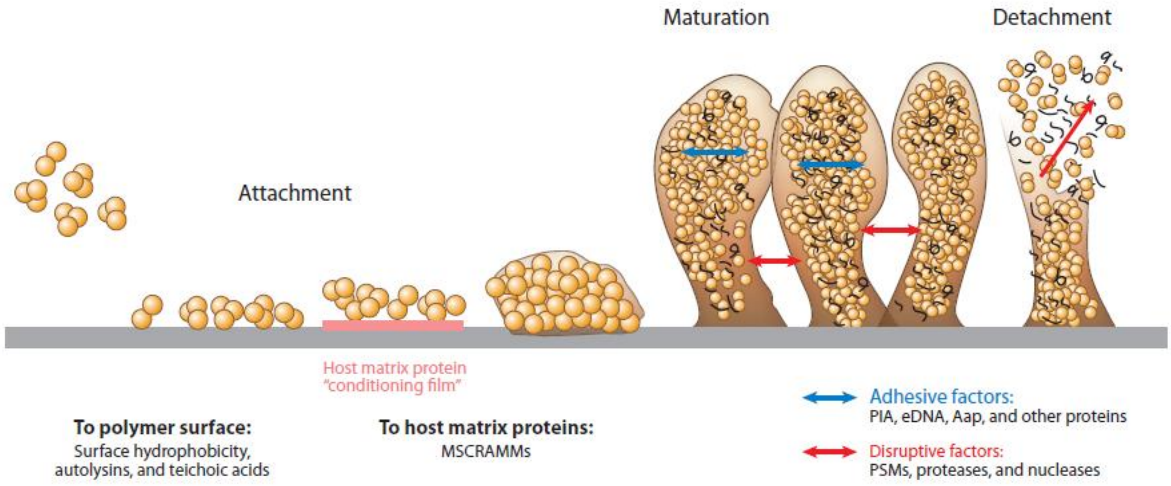


Figure 1

Phases of biofilm development. Biofilm development includes initial attachment, maturation, and final detachment. Attachment may occur directly to a surface (such as the polymeric surface of an indwelling medical device) or to a "conditioning film" formed by host matrix molecules. Then, biofilm maturation proceeds via the agglomeration of cells, which is dependent on adhesive molecules. Formation of the characteristic channel-containing biofilm structure is dependent on disruptive factors, which also ultimately facilitate the last phase of biofilm development, detachment. Molecular determinants shown or suspected to be involved in the respective biofilm development phases in staphylococci are noted on the bottom. Abbreviations: Aap, accumulation-associated protein; eDNA, extracellular DNA; MSCRAMMs, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules; PIA, polysaccharide intercellular adhesin; PSMs, phenol-soluble modulins.

Figure 5 : Phases de développement du biofilm (Source : Otto, 2013).

La phase initiale d'attachement de *S. aureus* au matériel implique des interactions non spécifiques, hydrophobes et électrostatiques, entre matériel et bactéries. L'autolysine-adhésine AtlA et les acides téichoiques de la surface bactérienne, jouent un rôle dans cette interaction

(Otto, 2013). Toutefois, il est probable que les protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte (fibrinogène, fibronectine, ou vitronectine) recouvrant le matériel immédiatement après sa mise en place, soient plus importantes pour l'adhérence bactérienne que le matériel en lui-même (Zimmerli, 2012). En effet, *S. aureus* possède diverses adhésines de la famille de MSCRAMMs, capables de se fixer spécifiquement aux molécules de la matrice extracellulaire (Otto, 2013). Différentes approches sont en développement pour améliorer la biocompatibilité et la biointégration des matériaux utilisés en chirurgie orthopédique et créer de nouveaux revêtements favorisant la prolifération des ostéoblastes et prévenant l'adhérence bactérienne (revêtements par des ions métalliques, imprégnation par des antibiotiques, greffage de polymères bioactifs…) (Elizabeth *et al*., 2014 ; Gallo *et al*., 2014 ; Zhao *et al*., 2014).

La phase de maturation du biofilm fait appel à un processus d'adhérence des bactéries entre elles durant leur prolifération et à un phénomène de déstabilisation permettant la formation de canaux pour l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les régions enfouies du biofilm (Otto, 2013). Chez les staphylocoques, le processus d'adhérence intercellulaire fait intervenir un exopolysaccharide PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), dont la synthèse est régulée par l'opéron *icaADBC* (Otto, 2013). Il faut noter que ce polymère de β-1,6-N-acétyl-D-Glucosamine possède des homologues chez d'autres espèces bactériennes telles que *E. coli* (opéron *pgaABCD*) (Itoh *et al.*, 2008). Par ailleurs, de récentes études montrent que d'autres protéines, telles que Aap (accumulation-associated protein), Embp (extracellular matrix binding protein), FnbpA/FnbpB (fibronectin-binding proteins), SasG (*S. aureus* surface protein G), ou la protéine A, pourraient concourir à l'adhérence intercellulaire. D'autres polymères (acides téichoiques) et de l'ADN extracellulaire libéré par les bactéries lysées (eDNA), pourraient aussi contribuer au développement et à la stabilisation du biofilm. Enfin, différentes protéases et nucléases ainsi que les PSMs, directement régulés par le système de quorum-sensing Agr, participent à la maturation et au détachement du biofilm (Otto, 2013).

La formation de biofilm est un évènement central dans le développement d'infections chroniques et représente un obstacle majeur dans le processus de cicatrisation. Les différents facteurs solubles du biofilm peuvent affecter la viabilité des ostéoblastes, inhiber la différenciation ostéogénique et stimuler la production de RANK-L par les ostéoblastes, l'ensemble contribuant à une perte osseuse (Sanchez et *al*., 2013).

5 POUVOIR PATHOGENE DE *E. COLI*

E. coli possède une importante diversité de comportements pathogènes. C'est l'espèce commensale la plus importante de la flore aérobie digestive de l'Homme et des animaux, mais c'est aussi l'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée dans les laboratoires de Biologie médicale, car premier agent responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Les infections à *E. coli* sont habituellement séparées en deux groupes : les infections intestinales (InPEC) à type de diarrhées, et les pathologies extra-intestinales (ExPEC) telles que des infections urinaires, des bactériémies, des péritonites, des pneumonies nosocomiales, ou des méningites. La très grande diversité génétique qui existe au sein de l'espèce *E. coli* explique les différences de pathogénicité observées entre les souches. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons en particulier, au pouvoir pathogène des souches de *E. coli* isolées d'infections urinaires (UPEC), car celles-ci peuvent aussi être potentiellement responsables d'IOAMs.

5.1 PHYLOGENIE ET DIVERSITE

Depuis la première description de *E. coli*, en 1885, dans les selles de nourrissons, différentes méthodes de typage de cette espèce ont été développées pour individualiser des groupes de souches aux propriétés particulières. Ainsi, les travaux de Kauffman en 1940, offrent la première classification des *E. coli*, fondée sur les combinaisons de trois types d'antigènes de surface : O (somatique), H (flagellaire) et K (capsulaire), permettant de sérotyper les souches par agglutination à l'aide de sérums spécifiques. A l'heure actuelle, plus de 190 types d'antigène O ont été rapportés, les sérotypes les plus connus étant associés à des épidémies dévastatrices de colites hémorragiques (O157:H7 et O104:H4) ou à la diffusion mondiale de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (O25b:H4) ; le recours au sérotypage moléculaire des souches n'ayant pas agglutiné avec les sérums existants est de plus en plus fréquent (Jandhyala *et al.*, 2013 ; Szijarto *et al.*, 2014). Par ailleurs, dès les années 2000, une autre méthode, rapide et simple, basée sur une PCR triplex, est proposée par Clermont *et al.* pour la catégorisation des souches de *E. coli* en quatre groupes phylogénétiques principaux (A, B1, B2 et D), les groupes A et B1 rassemblant une majorité de souches commensales ou responsables de diarrhées, et les groupes B2 et D, une majorité d'ExPEC (Clermont *et al.*, 2000). Depuis, d'autres méthodes de typage moléculaire, plus discriminantes, ont été développées, pour décrire et mesurer la variabilité de populations bactériennes et obtenir des informations épidémiologiques. Ainsi, le typage par Multi-Locus Sequence Typing (MLST), technique de macro-épidémiologie correspondant à l'analyse des

séquences nucléotidiques de 7 loci codant pour des gènes de ménage (*adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA* et *recA*), permet d'attribuer à une souche un Sequence Type (ST), reflet de son fond génétique. Cette méthode, très reproductible et plus simple que le séquençage de génome entier, est couramment appliquée pour génotyper *E. coli*, et a permis d'observer l'émergence d'un nombre limité de lignées clonales chez cette espèce. Ainsi, les complexes clonaux ST131 (la plus étudiée des lignées clonales pandémiques d'ExPEC), ST69, ST95, et ST73, prédominent actuellement chez les ExPEC (Figure 6). Enfin, les techniques de séquençage de génome entier se sont développées de manière spectaculaire ces dernières années et devraient bientôt se positionner comme de nouveaux outils diagnostics, techniquement et financièrement abordables, offrant des perspectives intéressantes pour typer plus précisément les souches, identifier les bactéries les plus à risque, et ajuster plus efficacement les thérapeutiques antibactériennes (Riley, 2014).

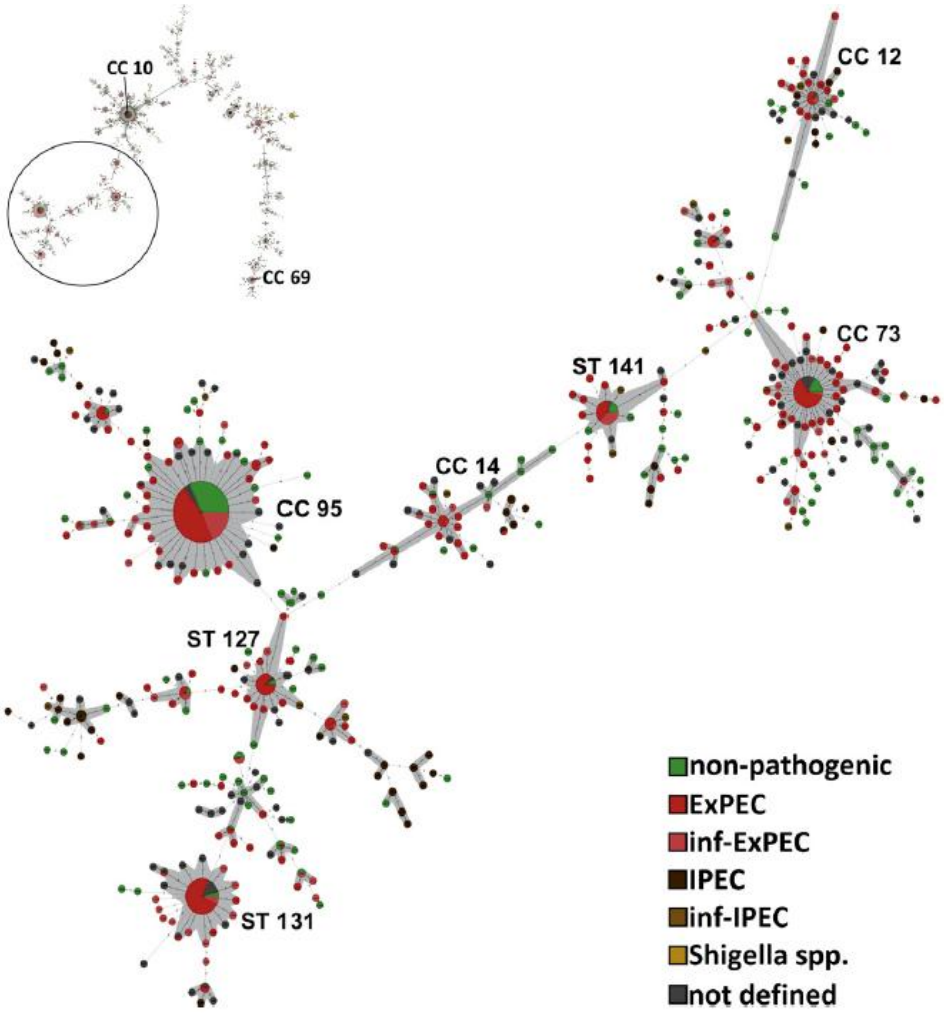


Fig. 1. Phylogenetic background of ExPEC, IPEC, and non-*pathogenic E. coli* isolates. The minimum spanning tree of the concatenated MLST sequences has been depicted with Seqsphere (Ridom GmbH). Small inset: population structure of *E. coli* based on MLST analysis of the *E. coli* MLST database (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli; as of 12th January 2011). The part of the minimum spanning tree comprising important clonal complexes (CCs) dominated by ExPEC has been enlarged. The allocation of the confirmed ExPEC (dark red), inferred ExPEC (light red), confirmed IPEC (brown), inferred IPEC (light brown), non-pathogenic (green) and not defined (grey) isolates within the CCs is indicated by pie charts. The size of the pie chart mirrors the number of strains allocated to the individual sequence types (STs) and CCs.

Figure 6 : Complexes clonaux d'ExPEC (eBURST) (Source : Köhler *et* Dobrindt, 2011).

5.2 PLASTICITE DU GENOME ET PATHOGENICITE

La pathogénie de *E. coli* est attribuée à la production de nombreux facteurs de virulence, membranaires (adhésines, polysaccharides de surface, capsule) ou sécrétés (toxines, sidérophores, protéases, protectines, invasines, hémolysines, …), permettant de coloniser la surface des muqueuses de l'hôte, de se protéger contre les défenses immunitaires, de capter des nutriments essentiels comme le fer, d'envahir des cellules ou de nuire à l'hôte et d'induire une réponse inflammatoire (Johnson *et* Russo. 2002).

Parmi ces facteurs, le lipopolysaccharide (LPS) constitutif de la membrane externe de tous les *E. coli*, est un motif bactérien essentiel à l'activation de différents acteurs de la réponse immune innée (système du complément, monocytes-macrophages, polynucléaires, cellules dendritiques, cellules endothéliales ou épithéliales…) ou du système de la coagulation *via* le facteur Hageman, et forme une barrière de protection contre diverses substances toxiques pour la bactérie (antibiotiques, composants du sérum…). Il est constitué de trois parties : i) un lipide A, très peu variable, qui est le composant toxique (ou endotoxine) du LPS, ii) une région core intermédiaire, peu variable, iii) une partie oligosaccharidique, plus ou moins longue et très variable, constituée de motifs O-antigéniques répétés, ayant un rôle très immunogène (Figure 7). Les effets physiopathologiques du LPS, après ligation à la protéine LBP (lipopolysaccharide-binding protein), puis fixation au complexe TLR4/CD14/MD-2, sont doubles : à la fois symbiotiques et bénéfiques au sein de la flore intestinale, favorisant la maturation du système immunitaire inné, contrôlant l'homéostasie épithéliale intestinale, et ayant un effet protecteur contre des infections intestinales ou autres ; mais aussi très néfastes en cas de réponse immune excessive et non contrôlée, allant jusqu'au choc septique, si bien que divers modèles expérimentaux cellulaires ou animaux emploient des molécules de LPS seules pour déclencher des effets inflammatoires (Rakoff-Nahoum *et al*., 2004 ; Stenutz *et al*., 2006 ; Tsay *et al*., 2011 ; Tan *et* Kagan, 2014).

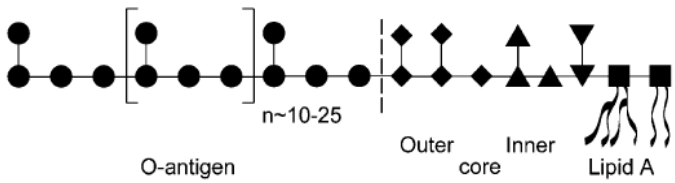


Fig. 1. Schematic structure of an enterobacterial lipopolysaccharide molecule. The lipids are depicted by curved lines and the sugar residues are as follows: GlcN (■), Kdo (▼), heptose (▲), hexose (◆), and O-antigen components (●), most commonly hexose.

Figure 7 : Structure schématique du LPS de *E. coli* (Source : Stenutz *et al*., 2006).

A l'inverse, d'autres facteurs de virulence sont très spécifiques et caractéristiques d'un pathovar d'*E. coli* responsables de diarrhées (InPEC). Ils jouent un rôle décisif dans la pathogenèse de l'infection intestinale correspondante et son diagnostic. C'est ainsi que la virulence des *E. coli* entéro-hémorragiques ou EHEC, responsables de diarrhées hémorragiques parfois compliquées de syndrome hémolytique et urémique (SHU), est principalement due à la production de vérotoxines (shiga-like toxins) ayant un effet létal sur les entérocytes, les cellules rénales et nerveuses. De même, les entérotoxines thermostables (ST) et thermolabiles (LT) en cause dans les diarrhées aqueuses engendrées par des *E. coli* entéro-toxinogènes ou ETEC sont un autre exemple (Clements *et al*., 2012).

Enfin, il n'est pas toujours facile de distinguer, sans ambiguïté, les *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (ExPEC), de souches commensales intestinales. Les ExPEC peuvent en effet coloniser le tractus intestinal chez des sujets sains, mais possèdent aussi la capacité d'infecter d'autres niches, grâce à un large répertoire de facteurs de virulence non spécifiques. Ces souches sont classées en différents sous-groupes, en fonction de la pathologie induite et des facteurs de virulence acquis, dont deux doivent être typiquement associés au syndrome infectieux induit (par exemple, antigène capsulaire K1 et protéine IbeA, pour les *E. coli* responsables de méningites néonatales (MNEC)) (Köhler *et* Dobrindt, 2011).

La variabilité génétique observée au sein de l'espèce *E. coli* reflète une grande plasticité génomique. Les *E. coli* pathogènes possèdent en effet, jusqu'à 20% d'information génétique supplémentaire, comparativement aux souches commensales. Ainsi, par exemple, le génome complet de la souche commensale *E. coli* K-12 est constitué de 4 641 652 paires de bases (pb) contre 5 231 428 pb pour la souche uropathogène *E. coli* CFT073. L'analyse comparative de génomes complets de *E. coli* a permis de mettre en évidence l'existence de deux fonds génétiques principaux : i) un core génome identique chez toutes les souches, et ii) un répertoire de gènes inconstamment présents, qui ne cesse d'augmenter avec les différents génomes disponibles (Figure 8) (Tenaillon *et al*., 2010). Des échanges horizontaux d'éléments génétiques mobiles portés par des plasmides, des transposons, des bactériophages, ou des îlots de pathogénicité (PAI), permettent l'acquisition de facteurs de virulence, de survie, ou de compétition, dans un environnement donné (Figure 9). La plupart des gènes de virulence acquis par les ExPEC sont regroupés sur des PAI intégrés au chromosome bactérien (Ahmed *et al*., 2008). Par exemple, la souche uropathogène *E. coli* CFT073 possède 13 PAI importants pour son fitness et sa virulence (Lloyd *et al*., 2009).

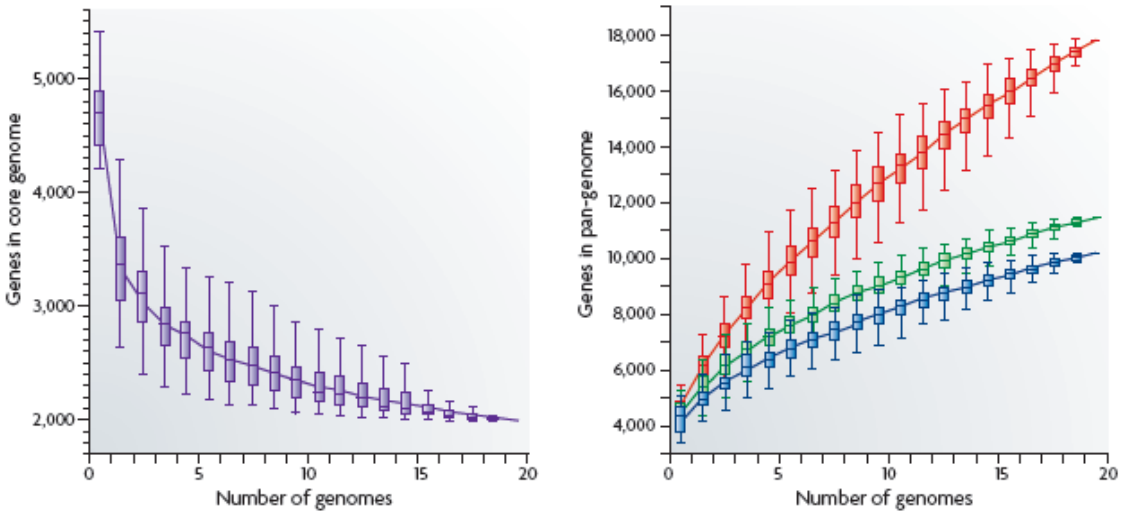


Figure 1 | ***Escherichia coli* core genome and pan-genome evolution according to the number of sequenced genomes.** For each data point, the upper and lower edges of the box indicate the first quartile and third quartile, respectively, of 1,000 random input orders of the genomes. The horizontal line indicates the sample median, and the vertical lines show the full range of the data, to a distance of at most 1.5 interquartile ranges (that is, the distance between the first and third quartile values). With 20 sequenced genomes, the core genome (left) comprises 1,976 genes and the pan-genome (right) comprises 17,838 genes in total (red), 11,432 of which show <80% similarity in sequence (green). If insertion sequence-like elements (found in 3,834 genes) and prophage-like elements (found in 3,873 genes) are discounted, then the pan-genome comprises 10,131 genes (blue). The studied strains corresponded mainly to pathogenic isolates[57]. Figure is reproduced from REF. 57.

Figure 8 : Evolution des core et pan-génomes de *E. coli* (Source : Tenaillon *et al.*, 2010).

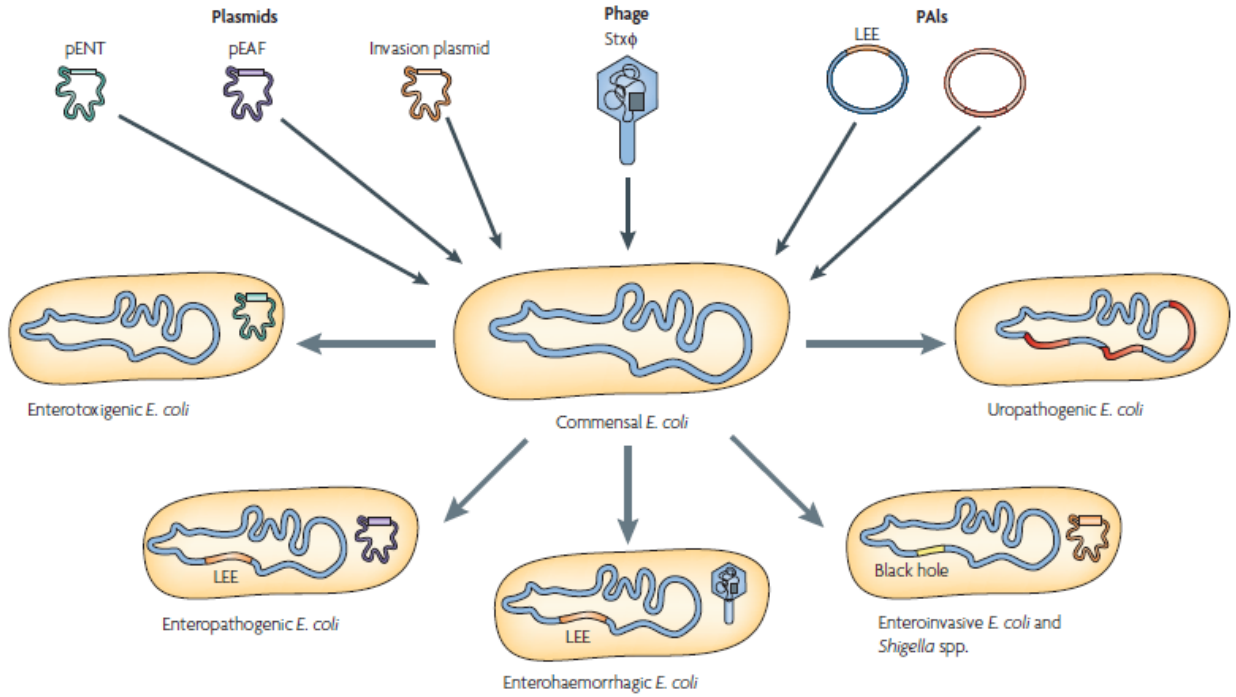


Figure 3 | **Contribution of horizontal acquisition of mobile genetic elements to the evolution of *Escherichia coli* pathotypes.** The uptake of mobile genetic elements (phages, virulence plasmids and pathogenicity islands), as well as the loss of chromosomal-DNA regions in different *E. coli* lineages, has enabled the evolution of separate clones, which belong to different *E. coli* pathotypes and are associated with specific disease symptoms. LEE, locus of enterocyte effacement; PAI, pathogenicity island; pEAF, enteropathogenic *E. coli* adhesion-factor plasmid; pENT, enterotoxin-encoding plasmids; Stx, Shiga-toxin-encoding bacteriophage.

Figure 9 : Transferts horizontaux de matériel génétique chez *E. coli*
(Source : Ahmed *et al.*, 2008).

5.3 PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS URINAIRES A *E. COLI*

Les infections urinaires sont les plus fréquentes de toutes les infections bactériennes, et l'espèce *E. coli* est le plus souvent responsable de ce type d'infections (80% des cas). Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique B2 et à 14 O-sérogroupes principaux (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75, O83), un grand nombre de souches de complexe clonal ST131, multirésistantes aux antibiotiques, ayant été associées à des infections urinaires sévères (Li *et al*., 2010 ; Hannan *et al*., 2012). Leur pouvoir pathogène est lié à de nombreux facteurs de virulence (adhésines, systèmes de captation du fer, capsule, toxines sécrétées…) souvent codés par des gènes situés sur des PAI, dont huit ont été particulièrement décrits chez les UPEC (PAI I_{536}, PAI II_{536}, PAI III_{536}, PAI IV_{536}, PAI I_{J96}, PAI II_{J96}, PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073}) (Schmidt *et* Hensel, 2004). Certains de ces facteurs de virulence (pili de type 1, pili de type P, CNF1, alpha-hémolysine) apparaissent comme particulièrement impliqués dans la physiopathogenèse des infections urinaires, mais leur prévalence varie selon les souches. Plusieurs génomes d'UPEC ont été séquencés (souches de référence CFT073 et 536 responsables de pyélonéphrites aiguës, et UTI89 responsable de cystite), et confirment l'absence de trait génétique unique des UPEC (Lloyd *et al*., 2007). Ainsi, une multiplicité de facteurs de virulence, parfois redondants mais agissant de concert, sont responsables du pouvoir pathogène des UPEC. Ces souches présentent, en particulier, un pouvoir invasif important, et une capacité à persister sous forme intracellulaire dans l'urothélium et à échapper au système immunitaire (Hunstad *et* Justice, 2010).

5.3.1 INTERACTION *E. COLI* – CELLULES UROTHELIALES

De nombreuses études *in vitro* et modèles animaux ont permis d'explorer et comprendre les mécanismes de pathogénicité des UPEC. Ces souches colonisent le tractus digestif, puis atteignent par voie ascendante le tractus urogénital et adhèrent aux cellules urothéliales par l'intermédiaire de divers *fimbriae* (pili de type 1, P, F1C, S, ou Afa), ou d'autres facteurs comme des fibres amyloïdes (curli), des autotransporteurs (Ag43, UpaH), TosA, ou des flagelles. Certains UPEC peuvent porter des gènes codant plus de dix types de *fimbriae* différents et une régulation très fine et synchronisée de l'expression des pili, flagelles, capsule et autotransporteurs est nécessaire pour permettre l'ascension des bactéries vers la vessie, puis les reins, en dépit du flux urinaire (Ulett *et al*., 2013).

Au niveau de l'épithélium vésical, la lectine FimH située à l'extrémité de pili de type 1, permet aux bactéries de s'ancrer aux résidus α-D-mannosylés décorant des glycoprotéines de l'épithélium superficiel (uroplakines Ia et IIIa), ainsi qu'à des intégrines α3 β1 enchâssées dans l'urothélium *via* leurs résidus oligosaccharidiques N-liés. Cet attachement permet aux bactéries d'envahir les cellules en ombrelle de la couche apicale de l'épithélium vésical, par un mécanisme « zipper », dépendant du trafic vésiculaire intracellulaire. Les UPEC internalisées échappent à une dégradation lysosomale et s'évadent dans le cytoplasme des cellules infectées, où certaines forment, après multiplication rapide, des agglomérats dénommés communautés bactériennes intracellulaires ou IBC (Figure 10, p32). En réponse à ce processus, une partie des bactéries endocytées est naturellement rejetée dans l'urine suite à l'exfoliation des cellules en ombrelle, mais la fragilisation de cette couche cellulaire superficielle, entraîne, au fur et à mesure de la progression de l'infection, la pénétration des UPEC dans les cellules basales sous-jacentes (Figure 11, p32). On considère que 12 heures après le début d'une cystite, environ la moitié des bactéries présentes dans la vessie, sont internalisées et protégées du système immunitaire et des antibiotiques (Hunstad *et* Justice, 2010 ; Hannan *et al*., 2012 ; Ulett *et al*., 2013).

Les UPEC responsables de pyélonéphrites aiguës expriment généralement des pili de type P et se fixent aux cellules intercalaires du tube collecteur rénal, premier segment à être en contact avec les bactéries lors de leur ascension rétrograde. La lectine PapG située à l'extrémité des pili de type P, permet aux bactéries de s'ancrer aux motifs galabiose des glycosphingolipides abondamment exprimés à la surface des cellules tubulaires rénales (Lillington *et al*., 2014). Les UPEC peuvent alors franchir la barrière du tubule rénal et disséminer dans le sang, soit par un mécanisme de translocation bactérienne au travers de l'épithélium intact, soit en altérant l'intégrité de l'épithélium tubulaire rénal (Chassin *et al*., 2008).

Un grand nombre de toxines cytotoxiques et vacuolisantes (HlyA, CNF1, Sat, Vat, Usp…), communément sécrétées par les UPEC, peuvent déstabiliser l'épithélium rénal ou de la vessie, permettre le passage paracellulaire des bactéries, et favoriser l'invasion. Le facteur de virulence CNF1, par activation de Rho GTPases intracellulaires, induit l'apoptose des cellules urothéliales. Généralement, la production de CNF1 est associée à la sécrétion d'une alpha-hémolysine HlyA, capable de lyser les cellules épithéliales par formation de pores transmembranaires, libérant ainsi des nutriments intracellulaires nécessaires à la survie bactérienne. D'autres facteurs de virulence non liés à l'adhérence ou à l'invasion, comme un large répertoire de systèmes de captation du fer (aérobactine, entérobactine, yersiniabactine,

salmochélines) et des récepteurs de l'hème (ChuA et Hma) vont favoriser la survie, la multiplication et la dissémination des UPEC dans l'urine et le sang, où le fer est présent en très faibles quantités (Hannan *et al*., 2012 ; Ulett *et al*., 2013).

5.3.2 INFECTIONS URINAIRES RECURRENTES ET FORMATION DE BIOFILM

Plus de 25% des infections urinaires récidivent dans les six mois après l'épisode initial, malgré un traitement antibiotique adapté. La capacité des UPEC à persister au sein de l'urothélium en formant des biofilms intracellulaires, explique cette chronicité rythmée par le renouvellement perpétuel des cellules urothéliales (Mysorekar *et* Hultgren, 2006 ; Jorgensen *et* Seed, 2012).

L'organisation des UPEC en communautés bactériennes intracellulaires (IBC) au niveau du cytoplasme des cellules en ombrelle de la couche apicale vésicale est considérée comme une forme de biofilm intracellulaire (Figure 10, p32). Le biofilm est en effet défini comme "une communauté de micro-organismes, adhérant entre eux et à une surface, marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice". Ici, la "surface" correspond aux différentes membranes intra-cytoplasmiques (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, ou membrane nucléaire) auxquelles les bactéries peuvent adhérer, après internalisation.

Ces agglomérats de 10^4 à 10^5 bactéries, protégées dans une matrice polysaccharidique, sont relativement rares (pas plus de 500 IBC par vessie, si inoculum de 10^7 bactéries), et dérivent de l'expansion clonale d'une seule bactérie invasive. Leur développement met en jeu un processus cyclique complexe, faisant intervenir les pili de type 1, exprimés de façon continue, ainsi que d'autres composants bactériens habituellement impliqués dans la formation de biofilms (des flagelles, la protéine Ag43, une matrice extracellulaire polyosidique autoproduite, des fibres amyloïdes curli, la capsule polysaccharidique, ou des autotransporteurs UpaC, UpaG, UpaH). La maturation de ces IBC s'accompagne d'un changement de morphologie des bactéries : d'abord très coccoïdes, puis en forme de bâtonnets, les bactéries s'échappent enfin, sous forme filamenteuse, dans la lumière vésicale et peuvent infecter de nouvelles cellules (Mysorekar *et* Hultgren, 2006 ; Jorgensen *et* Seed, 2012 ; Hannan *et al*., 2012).

Dans certaines circonstances (muqueuse vésicale plus vulnérable, infection urinaire persistante, ou *E. coli* aux propriétés cytotoxiques), les UPEC peuvent envahir les cellules basales de la couche profonde de l'urothélium et persister, durant plusieurs mois, sans induire de réponse inflammatoire, dans des vésicules endosomales intra-cytoplasmiques, sous forme

de grappes de 4 à 10 bactéries disposées rosettes. Ces réservoirs intracellulaires quiescents dénommés QIR, expliquent le caractère récurrent de certaines infections urinaires, les nouveaux épisodes infectieux correspondant au renouvellement de l'urothélium et à la différentiation des cellules basales, en cellules apicales exfoliées dans la lumière vésicale (Figure 11, p32) (Mysorekar *et* Hultgren, 2006).

5.3.3 INTERACTION *E. COLI* – SYSTEME IMMUNITAIRE INNE

Les cellules épithéliales vésicales et rénales, outre leur rôle de barrière protectrice, jouent un rôle dans l'initiation d'une puissante réponse immune innée pro-inflammatoire lors d'une infection. Cette réponse est liée principalement aux récepteurs TLR4 de l'urothélium, qui après reconnaissance du LPS et/ou des pili de type 1 ou de type P portés par les UPEC, induisent une activation de la protéine CREB (cAMP-responsive element binding protein) et de NF-kB, puis la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines (IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-10, IL-17, G-CSF…). La réponse inflammatoire induite par l'interaction entre les UPEC et les cellules épithéliales, entraîne le recrutement et l'activation de polynucléaires neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques, au site de l'infection, ainsi que la libération d'autres facteurs antibactériens comme des peptides antimicrobiens (cathélicidine LL-37 et défensines), du monoxyde d'azote (NO), ou la protéine de Tamm-Horsfall, capable de se lier aux pili de type 1 *via* ses résidus mannose. Par ailleurs, TLR4 contrôle le processus d'exocytose et l'activation des voies de signalisation dépendantes de TLR4 entraîne l'expulsion d'une partie des bactéries internalisées (Hunstad *et* Justice, 2010 ; Hannan *et al*., 2012 ; Ulett *et al*., 2013).

De récentes études montrent que les UPEC emploient différentes stratégies, à différentes étapes de l'infection, pour retarder, atténuer, ou subvertir les réponses immunes innées et survivre dans l'arbre urinaire. De telles stratégies pourraient faciliter la colonisation de la vessie en tout début d'infection, et/ou expliquer la chronicité de certaines cystites.

Il a été mis en évidence notamment que les UPEC peuvent réguler négativement les réponses pro-inflammatoires TLR4-dépendantes qu'ils induisent en envahissant l'urothélium. Ces effets anti-cytokiniques semblent liés en partie à des modifications structurales du LPS. D'autres facteurs bactériens sont aussi impliqués, comme la protéine "TIR-like" TcpC, récemment identifiée chez 40% des souches responsables de pyélonéphrite aiguë, comme capable de bloquer la voie NF-kB. Il faut toutefois noter que le blocage NF-kB induit l'exfoliation des cellules en ombrelle de l'épithélium vésical, accélérant ainsi l'élimination

des cellules infectées, mais dévoilant aussi les couches profondes de l'urothélium et favorisant la formation de QIR.

Par ailleurs, ces effets anti-inflammatoires, en tout début d'infection, limitent le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles et des cellules macrophagiques dans la vessie. De plus, l'invasion épithéliale et la formation d'IBC permet aux bactéries d'échapper à la phagocytose, les bactéries filamenteuses libérées dans la lumière vésicale, n'étant pas phagocytables. Enfin, il est admis que les UPEC peuvent résister à l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles et des macrophages, en inhibant leur fonction (production de radicaux libres oxygénés et de substances antibactériennes) (Hunstad *et* Justice, 2010 ; Hannan *et al*., 2012 ; Ulett *et al*., 2013).

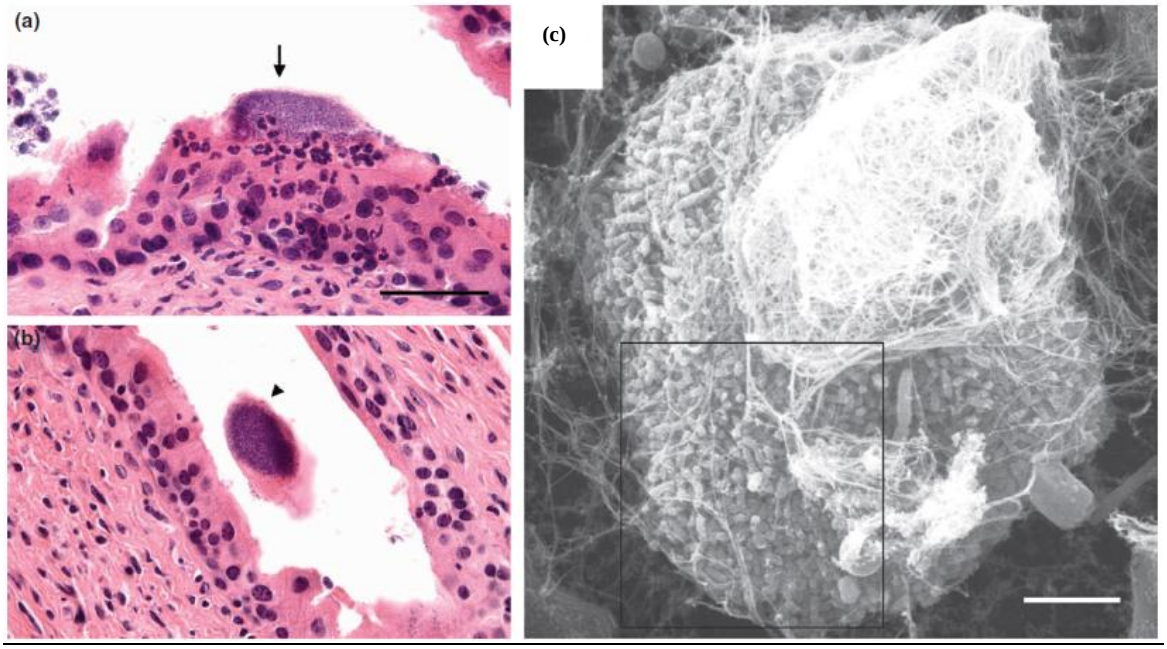


Figure 10 : IBC dans le cadre d'une cystite aigue (Source : Hannan *et al*., 2012).
(a, b), IBC formées dans les cellules en ombrelle de la couche apicale de l'épithélium vésical (a, flèche), ou exfoliées dans la lumière vésicale (b, flèche), (coloration hématoxyline-éosine, échelle : 50 µm). (c), IBC en microscopie électronique à balayage (échelle : 5 µm).

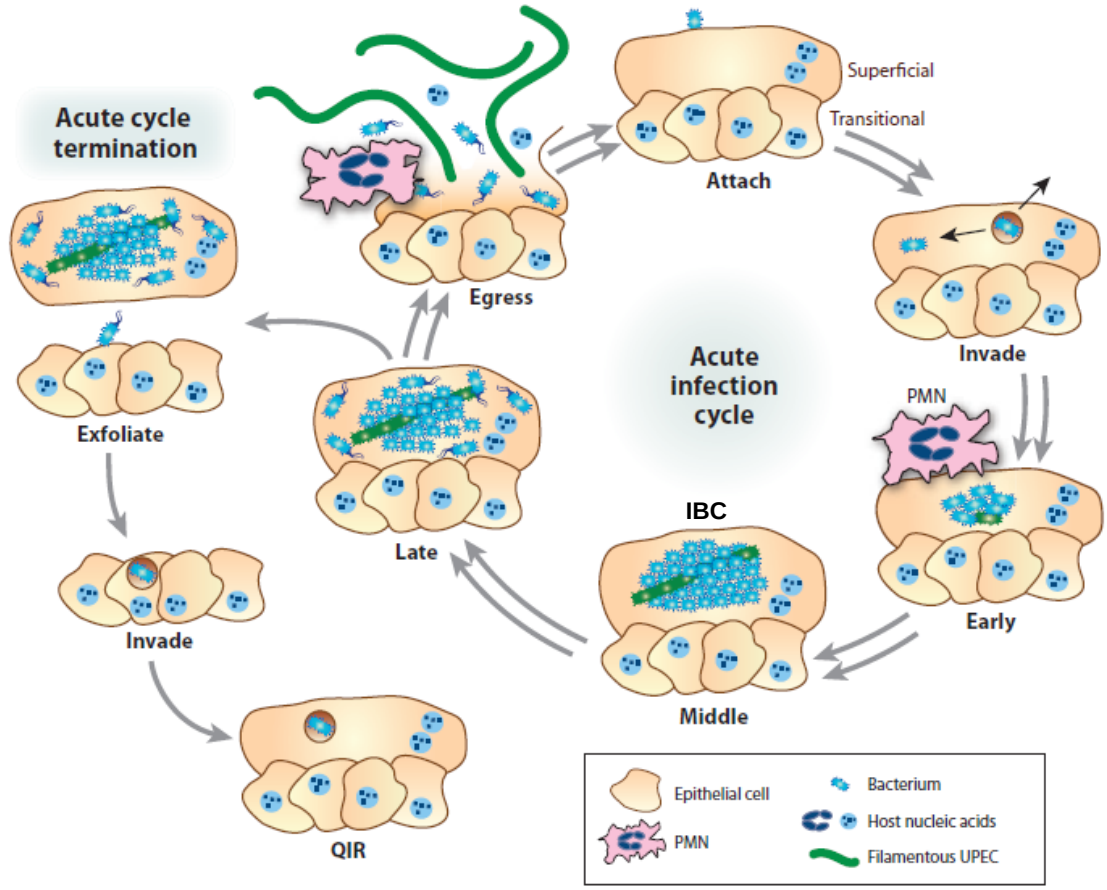


Figure 11 : Cycle de vie des UPEC intracellulaires (Source : Hunstad *et* Justice, 2010).

CHAPITRE II :

PARTIE EXPERIMENTALE

NATURE ET OBJECTIFS DES RECHERCHES

La pathogenèse des IOAMs à bacilles à Gram négatif demeure encore mal connue. Il existe actuellement très peu de données concernant la virulence et le potentiel pathogène des souches de *E. coli* isolées dans ce contexte. Les recommandations françaises de pratique clinique pour la prise en charge chirurgicale des IOAMs, s'appuient essentiellement sur des arguments cliniques (délai de survenue de l'infection, durée des symptômes, état de la prothèse…), quel que soit le micro-organisme responsable de l'infection. Pourtant, un examen microbiologique est souvent réalisé sur du liquide de ponction pré-opératoire et permet de documenter l'infection, avant la reprise chirurgicale. Ainsi, affiner la compréhension des mécanismes physiopathologiques des IOAMs en fonction du micro-organisme responsable de l'infection, permettrait de proposer une prise en charge tenant compte de l'étiologie suspectée, et d'optimiser les pratiques tant en termes de qualité, qu'en termes de coût, au bénéfice des patients et de la collectivité. Ainsi, nos travaux visant à comprendre la physiopathologie des IOAMs à *E. coli* pourraient fournir secondairement des outils applicables à la pratique, pour anticiper les cas les plus à risque de complications, et améliorer la pertinence de la prescription (ECBU et/ou bandelette urinaire pré-opératoire, durée de l'antibiothérapie) ou de l'indication des différents actes chirurgicaux (changement prothétique, synovectomie-lavage).

Dans un premier temps, il est apparu intéressant de déterminer si les souches de *E. coli* responsables d'IOAMs partageaient des caractères génétiques et/ou des facteurs de virulence communs, et par conséquent, des mécanismes de pathogénicité similaires. De plus, comme une des caractéristiques essentielles des bactéries isolées d'IOAMs est leur capacité à s'organiser et survivre au contact d'un matériel étranger sous forme de biofilm, et que ce comportement a déjà été décrit chez *E. coli*, dans des contextes variés : colonisation de réseaux de distribution d'eau potable, adhérence à la surface de produits agro-alimentaires ou infections de dispositifs médicaux (cathéters intravasculaires ou vésicaux…), nous avons cherché à déterminer si les souches de *E. coli* isolées d'IOAMs étaient fortement productrices de biofilm (*Article 1*).

A la suite de ce travail, nous avons sélectionné 20 souches de *E. coli* issues d'IOAMs, pour analyser leur comportement vis-à-vis de cultures de cellules ostéoblastiques humaines. Les capacités d'adhérence et d'invasion osseuse de *E. coli* avaient très peu, voire jamais, été étudiées *in vitro*. Nous n'avons pas trouvé de publications scientifiques dans ce domaine. Ces phénomènes d'adhérence/invasion constituent pourtant un mécanisme de virulence important dans les infections osseuses à staphylocoques ; c'est pourquoi, nous souhaitions déterminer si

les *E. coli* responsables d'IOAMs possédaient ces mêmes propriétés. Lors de ce travail, nous nous sommes également intéressés au potentiel cytotoxique de certaines souches de *E. coli* et à la réponse cytokinique induite par l'interaction *E. coli* – cellules ostéoblastiques humaines (*Article 2*).

Enfin, puisque nos premières investigations génétiques et les données cliniques recueillies suggéraient qu'une grande partie des *E. coli* responsables d'IOAMs pourraient être des souches uropathogènes, posant la possibilité d'une voie de contamination hématogène dans une grande partie des cas, nous avons recherché si une résistance à l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles et du système du complément (premières lignes de défenses immunitaires innées contre l'infection), pourrait être un facteur initiateur ou favorisant le développement d'IOAMs (*Article 3*).

1 ETUDE GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE DE SOUCHES CLINIQUES DE *E. COLI* ISOLEES D'IOAMs

1.1 PRESENTATION

Ce travail de recherche est le premier à s'intéresser à la relation entre profil de virulence et pathogénicité de *E. coli* dans le contexte d'IOAMs, alors que de nombreuses études rapportent la caractérisation de facteurs de virulence chez des souches de *E. coli* responsables d'infections urinaires, de liquides d'ascites, ou de méningites. Pour cette étude, 30 souches cliniques de *E. coli* isolées d'infections sur prothèses ou implants ostéo-articulaires ont été collectées sur une période de cinq ans, chez des patients hospitalisés à Nantes, Cholet ou Orléans. Ces 30 souches ont été analysées de manière rétrospective, en les comparant à 30 souches cliniques de *E. coli* isolées de flores fécales de manière aléatoire.

L'objectif de ces travaux était de déterminer si les *E. coli* isolés d'IOAMs présentaient un pouvoir pathogène spécifique, associé à un profil de virulence particulier, ou à des caractères génétiques partagés par une majorité des souches isolées dans ce contexte. Les données de la littérature vis-à-vis de la physiopathogénèse des IOAMs à Staphylocoques ont permis de montrer qu'une adhérence bactérienne au biomatériel implanté puis une croissance en biofilm, expliquent en partie les difficultés thérapeutiques rencontrées au cours de ces infections. Nous avons souhaité déterminer si ce comportement bactérien conditionnait la pathogénicité des souches de *E. coli* isolées d'IOAMs.

Ainsi, dans le cadre de cette étude, nous avons étudié le groupe phylogénétique des 60 souches de *E. coli* sélectionnées et avons recherché, par PCR, 19 gènes de virulence, habituellement impliqués dans la physiopathogénèse d'infections extra-intestinales. Nous avons recherché ensuite, au moyen de deux méthodologies reconnues, si les souches de *E. coli* de notre étude, étaient capables de former du biofilm *in vitro*, puis avons tenté d'associer des caractères génétiques de virulence, à la production de biofilm *in vitro*.

1.2 METHODES ET RESULTATS

Crémet L, Corvec S, Bémer P, Bret L, Lebrun C, Lesimple B, Miegeville AF, Reynaud A, Lepelletier D, Caroff N. 2012. Orthopædic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains. J. Infect. **64**:169-75.

Journal of Infection (2012) 64, 169—175

ELSEVIER

BIA British Infection Association

www.elsevierhealth.com/journals/jinf

Orthopaedic-implant infections by *Escherichia coli*: Molecular and phenotypic analysis of the causative strains

Lise Crémet [a,b,e], Stéphane Corvec [a,b,e], Pascale Bémer [a], Laurent Bret [c], Cécile Lebrun [d], Béatrice Lesimple [d], Anne-Françoise Miegeville [b], Alain Reynaud [a,b], Didier Lepelletier [a,b], Nathalie Caroff [b,*]

[a] *Service de Bactériologie-Hygiène, CHU de Nantes, 9 quai Moncousu 44093 Nantes Cedex 1, France*
[b] *Université de Nantes, EA3826 Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections, UFR de Médecine, 1 rue G. Veil, 44000 Nantes, France*
[c] *Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Régional d'Orléans, 45032 Orléans, France*
[d] *Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier de Cholet, 1, rue de Marengo, 49300 Cholet, France*

Accepted 9 November 2011
Available online 15 November 2011

KEYWORDS
Orthopaedic implant infections;
E. coli;
Pathogenicity;
Virulence;
Biofilm

Summary *Objectives:* Little is known about *Escherichia coli* Orthopaedic Implant Infections (OII) pathogenesis. Thus, we compared 30 clinical strains isolated in this context with 30 clinical strains of faecal origin, in order to identify phenotypic and genetic features related to *E. coli* OII.
Methods: Phylogenetic analysis and detection of 19 virulence genes were performed by PCR. Ability to form biofilm was studied using the crystal violet reference method and the innovative BioFilm Ring Test®.
Results: Most of the OII isolates (56.7%) belonged to the virulence-associated phylogenetic group B2, but did not present a specific set of virulence factors. *S fimbriae* was the only adhesin significantly associated with OII isolates. Isolates varied greatly in their ability to form biofilm but OII isolates did not produce significantly more biofilm *in vitro* than isolates of faecal origin, whatever the method used.
Conclusions: Neither a specific pathogenic signature nor an increased ability to form biofilm *in vitro* was detected in *E. coli* strains isolated from OII. Nevertheless, genetic properties of these isolates could provide a clue to their origin. Hence, we found that virulence factors of uropathogenic strains and urological disorders were frequently detected among our OII cohort.
© 2011 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 29 48.
E-mail address: nathalie.caroff@univ-nantes.fr (N. Caroff).
[e] LC and SC contributed equally to this work.

0163-4453/$36 © 2011 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jinf.2011.11.010

Introduction

For the past few years, prophylactic measures to prevent post-operative infections have probably been contributing to limit Orthopaedic Implant Infections (OII) in orthopaedic surgery. However, an increasing number of arthroplasty in elderly population and technically more complex reconstructions could increase the risk of infections.[1–3] Staphylococci are the main microorganisms implicated in OII and prophylaxis is generally directed against these pathogens. Nonetheless, Gram-negative bacilli infections, accounting for about 15% of OII, are also highly relevant in terms of severity and risk of treatment failure.[1,4,5] Following *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* is the second most common cause of Gram-negative OII (20—30 %).[4,5] This species constitutes the bulk of the human aerobic intestinal flora but is also involved in various extra-intestinal diseases, including urinary tract infections and bacteremia that could result in orthopaedic implant seeding.[6] Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) typically harbour "specialized" virulence factors (VFs) such as adhesins, siderophores, polysaccharide coatings, proteases, toxins, invasins, and serum-resistance proteins. These VFs help the organisms to colonize and/or invade host tissues, scavenge essential nutrients, disrupt host defence mechanisms, and promote inflammatory response.[6] Furthermore, an ability to form biofilm has been related to persistence of *E. coli* clinical isolates in foreign-body infections, like in catheter-associated bacteriuria.[7–9] Biofilms play a key role in bacterial persistence on bone and implant surfaces. Development of small colony variants encased in a matrix of extracellular polymeric substance is regarded as an essential pathogenic potential of *Staphylococcus* species.[10] However, no specific virulence determinant has proven to be particularly involved in staphylococcal OII, especially for coagulase-negative strains infections.[11]

The study of the relative role of bacterial virulence factors, biofilm formation or host factors in the pathogenesis of *E. coli* OII has been limited so far. Therefore, we have investigated and compared the prevalence and distribution of phylogenetic groups, VFs, and ability to form biofilm of 30 *E. coli* clinical isolates recovered from OII and 30 random *E. coli* faecal isolates from control subjects.

Materials and methods

Bacterial strains and patients

Thirty *E. coli* isolates involved in orthopaedic implant infections and 30 *E. coli* isolates from faeces of individuals with diarrhea were studied. All OII isolates were consecutively obtained from cultures of 1/1 to 8/8 intraoperative tissue specimens (mean positive samples, 4) of 30 patients admitted in 3 French hospitals (Nantes, Orléans, Cholet) between January 2006 and December 2010. Only one isolate per patient was included. All patients fulfilled diagnostic criteria for OII according to recent French guidelines.[12] Medical records were retrospectively reviewed to collect epidemiological (age, sex gender), clinical (underlying medical conditions, type of material, manifestations of illness, details of surgical procedures, details of antibiotic regimens, and clinical outcome) and laboratory data for each episode. Infections were classified as follows, according to the time of onset after surgery: (i) early infections (first 30 days after surgery), (ii) delayed infections (between the second month and 6 months after surgery), and (iii) late infections (more than 6 months after surgery).[12]

Phylogenetic typing

Isolates were assigned to one of the four main phylogenetic groups (A, B1, B2 or D), based on their possession of two genes (*chuA* and *yjaA*) and a DNA fragment (TSPE4.C2), as described by Clermont et al.[13]

Detection of virulence determinants by PCR

All the isolates were tested by established PCR-based assays for 19 putative virulence factor genes characteristic of extra-intestinal pathogenic *E. coli* : *fimH* (type 1 fimbrial adhesin), *papC*, *papGII*, and *papGIII* (P fimbriae), *sfa/foc* (S fimbriae), *hra* (heat-resistant agglutinin), *tsh* (temperature-sensitive hemagglutinin), *iucC* (iron uptake system), *hly* (hemolysin), *traT* (serum-resistance associated protein), *sat* (secreted autotransporter toxin), *cnf1* (cytotoxic necrotizing factor), *usp* (uropathogenic-specific protein), *cdt* (cytolethal distending toxin), *vat* (vacuolating autotransporter), *ibeA* (brain microvascular endothelial cell invasion protein), *ompT* (outer-membrane protease), *csgA* (curli fibers), and *pgaA* (β-1.6-*N*-acetyl-D-glucosamine polymer). PCR conditions and primers used for the specific amplification of these genes were described in previous published studies.[14–22]

Biofilm assays

Crystal Violet (CV) adherence assay in polystyrene microtiter plates

CV adherence assays were performed following the method of Naves et al[23] with some modifications. *E. coli* strains were grown overnight on Luria-Bertani broth (LB) supplemented with 0.5% glucose at 37 °C. Cultures were diluted 1:100 into LB medium supplemented with 1.0% glucose and inoculated in wells of polystyrene microtiter plates incubated for 24 h at 37 °C, without shaking. Growth optical densities (OD) were read at 630 nm; then cells attached to the microtiter plates were washed twice gently with sterile water and stained for 5 min with 1% crystal violet. The stained biofilms were rinsed gently in sterile water (4 times) and dried. The dye was solubilized in ethanol and ODs were measured at 570 nm. Biofilm measurements were calculated using the formula $SBF = (AB - CW)/G$, in which *SBF* is the specific biofilm formation, *AB* is the OD_{570nm} of the stained bacteria, *CW* is the OD_{570nm} of the stained control wells containing only bacteria-free medium, and *G* is the OD_{630nm} of cell growth in broth. Each experiment included the biofilm-forming *E. coli* ATCC 25922 strain as positive control. They were performed in triplicate and 8 wells per strain were analysed for each assay. The degree of biofilm production was classified in three categories: negative ($SBF < 0.25$), weak ($0.25 \leq SBF < 1$), and strong ($SBF \geq 1$).

Kinetic evaluation of biofilm formation with the Biofilm Ring Test®

The device was kindly provided by Biofilm Control® (St Beauzire, France).[24] The assays were carried out in 96-wells microtiter plates. *E. coli* strains were grown overnight on Brain Heart Infusion medium (BHI) at 37 °C, adjusted at 2.5 McF, and diluted 1:250 into filtered BHI medium to get the initial bacterial suspensions. They were then placed with paramagnetic beads (10 μl ml^{-1} of Toner) in 3 wells of microtiter plates incubated at 37 °C in a moist box. After 0, 7 or 24 h, respectively, wells were covered with contrast liquid. The plate was scanned with the plate reader to obtain an image of each well (I_0), and then placed for 1 min on the block test for magnetisation contact before a second reading (image I_1). In the absence of biofilm, beads are attracted in the centre of the bottom wells, forming a central spot, while during biofilm formation, beads are progressively immobilized and the spot disappears. The analysis of I_0 and I_1 images by the BioFilm Control® software gives a BioFilm Indice (BFI). A high BFI value (≥7) corresponds to a high mobility of beads under magnet action (no biofilm formation), while a low value (<7) corresponds to the immobilization of beads (positive biofilm). Each experiment included the biofilm-forming *E. coli* ATCC 25922 strain as positive control.

Scanning electron microscopy (SEM)

Pieces of wells of BioFilm Ring Test® microtiter plates, incubated for 24 h at 37 °C, were fixed with 1% glutaraldehyde, rinsed with phosphate buffer saline, dried with 70% ethanol, absolute ethanol, and hexamethyldisilazane, and sputtered with gold to analyze adherence and biofilm formation by electron microscopy.

Statistical analysis

Comparisons were based on the two-sided Fisher's exact test. A *P* value of ≤0.05 was considered as significant.

Results

Patients' characteristics

The median age of the 30 patients with a diagnosis of *E. coli* orthopaedic implant infection, was 74.5 years (range, 48–95 years), and 20 (67%) were female. Nineteen infections were on hip prosthesis, six on knee prosthesis, three on bone fixation plates (ankle, femur, and pelvis), one on gamma nail, and one on spinal implants. All patients displayed typical clinical signs of OII with acute presentation (i.e. local pain, local inflammation, hematoma, development of a sinus tract communicating with the joint, surgical findings of purulence, fever, or sepsis). The characteristics of the patients and the episodes of infection are summarized in Table 1.

Table 1 Characteristics of the patients, the episodes of infections, and the corresponding isolates.

Characteristics	*E. coli* OII (*n* = 30 *episodes*)
Age, median years (range)	74.5 (48–95)
Female gender	20 (67%)
Site of infection	
Hip	19 (63%)
Knee	6 (20%)
Femur	2 (7%)
Spine	1 (3%)
Pelvis	1 (3%)
Ankle	1 (3%)
Presentation of infection	
Early (during the first 30 days after surgery)	11 (37%)
Delayed (2–6 months after surgery)	5 (17%)
Late (more than 6 months after surgery)	14 (47%)
Symptoms at presentation	
Fever (temperature ≥38 °C)	14 (47%)
Pain	22 (73%)
Presence of sinus tract	9 (30%)
Presence of purulence in the joint	13 (43%)
Microbiological findings	
Monomicrobial	23 (77%)
Polymicrobial	7 (23%)
Frequency of antimicrobial resistance	
Ceftriaxone	2 (7%)
Ciprofloxacin	3 (10%)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	10 (33%)

Phylogenetic groups and virulence characteristics of the *E. coli* isolates

The *E. coli* OII collection was mainly composed of phylogenetic group B2 isolates (56.7%). Phylogenetic groups A, D, and B1 were found in 26.7%, 10%, and 6.7% of the OII isolates, respectively. A wide distribution of phylogenetic groups was observed in the *E. coli* faecal isolates: B2 (33.3%), A (23.3%), D (23.3%), and B1 (20%). Only three of the 19 VFs (*hra*, *usp* and *sfa/foc*) were significantly more common in OII isolates than in faecal isolates ($P < 0.05$) (Table 2). Overall, strains of the phylogenetic group B2 possessed the highest level of virulence determinants, in both populations. Ten of the 17 phylogenetic group B2 OII isolates (59%) possessed a combination of *pap*, *hly*, *cnf1*, and *hra* genes, which suggested the presence of an uropathogenic pathogenicity island (PAI). Regarding the virulence profile of our control group, one VF gene (*traT*) was significantly overrepresented ($P < 0.01$), in comparison with OII isolates (Table 2).

Study of biofilm production by the crystal violet adherence assay

Among the 30 OII isolates studied with the crystal violet adherence assay, 24 (80%) tested negative and 6 (20%) were classified as weakly adherent. Among the faecal isolates, 26 (87%) were classified as negative, 3 (10%) as weakly adherent and one (3%) as strongly adherent. Interestingly, no OII strain was considered as strong-biofilm producer.

Kinetic study of biofilm production with the Biofilm Ring Test®

Investigation of biofilm production with the BioFilm Ring Test® showed that 4 (13%) and 5 (17%) OII isolates tend to

Table 2 Prevalence of 19 putative virulence factor genes among the 60 *E. coli* isolates tested in this study.

	Prevalence of trait (no. [%] of isolates) by bacterial source and phylogenetic group						*P* value
	OII isolates			Faecal isolates			All OII vs All faecal
	All isolates ($n = 30$)	B2 isolates ($n = 17$)	Non-B2 isolates ($n = 13$)	All isolates ($n = 30$)	B2 isolates ($n = 10$)	Non-B2 isolates ($n = 20$)	
Adhesins							
fimH	30 [100]	17 [100]	13 [100]	29 [97]	10 [100]	19 [95]	N.S.
papC	16 [53]	12 [71]	4 [31]	8 [27]	7 [70]	1 [5]	N.S.
papGII	6 [20]	6 [35]	0 [0]	4 [13]	4 [40]	0 [0]	N.S.
papGIII	7 [23]	7 [41]	0 [0]	3 [10]	3 [30]	0 [0]	N.S.
sfa/foc	13 [43]	13 [76]	0 [0]	5 [17]	5 [50]	0 [0]	0.049
hra	16 [53]	10 [59]	6 [46]	6 [20]	4 [40]	2 [10]	0.02
tsh	2 [7]	0 [0]	2 [15]	4 [13]	1 [10]	3 [15]	N.S.
Siderophore							
iucC	17 [57]	6 [35]	11 [85]	11 [37]	6 [60]	5 [25]	N.S.
Toxins							
hly	12 [40]	11 [65]	1 [8]	5 [17]	5 [50]	0 [0]	N.S.
sat	6 [20]	4 [24]	2 [15]	4 [13]	2 [20]	2 [10]	N.S.
cnf1	10 [33]	10 [59]	0 [0]	4 [13]	4 [40]	0 [0]	N.S.
usp	19 [63]	17 [100]	2 [15]	10 [33]	10 [100]	0 [0]	0.04
cdt	5 [17]	5 [29]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	N.S.
Protectin/Invasins							
traT	11 [37]	3 [18]	8 [62]	22 [73]	6 [60]	16 [80]	0.009
vat	17 [57]	16 [94]	1 [8]	10 [33]	10 [100]	0 [0]	N.S.
ibeA	7 [23]	5 [29]	2 [15]	4 [13]	4 [40]	0 [0]	N.S.
Miscellaneous							
ompT	25 [83]	17 [100]	8 [62]	20 [67]	10 [100]	10 [50]	N.S.
Biofilm formation							
csgA	30 [100]	17 [100]	13 [100]	30 [100]	10 [100]	20 [100]	N.S.
pgaA	29 [97]	17 [100]	12 [92]	25 [83]	10 [100]	15 [75]	N.S.

P values above 0.05 were considered not significant (N.S.).

form biofilm (BFI value < 7) after 7 and 24 h of incubation, respectively. Both clinical populations exhibited the same biofilm-forming ability. Scanning electron micrographs confirmed the absence or presence of biofilm growth after 24 h for some strains (Fig. 1).

Comparison of biofilm detection methods

In our study, 43/60 (72%) *E. coli* isolates [23/30 (77%) OII isolates and 20/30 (67%) faecal isolates] were considered as biofilm-negative by both methods. A small number of strains [4/30 (13%) OII isolates and 3/30 (10%) faecal isolates] behaved as adherent strains in the two different experimental conditions. Ten discrepancies were observed between both methods, 7/10 (70%) isolates showing a biofilm-positive phenotype only with the BioFilm Ring Test® (Table 3).

Distribution of phylogenetic groups and VFs in relation to *in vitro* biofilm formation

Among the biofilm-related genes investigated in this study (*csgA* and *pgaA*), only *csgA* was encountered among all the adherent strains. In addition, genes encoding for the adhesins, except *fimH*, were poorly represented in this population. Interestingly, the only strain detected as strong-biofilm producer with the CV staining assay exhibited a particularly low number of VF genes (3 genes : *fimH*, *csgA* and *ompT*). No significant association was finally found between phylogenetic groups, or virulence profiles and the ability to form biofilms *in vitro*.

Discussion

Traditionally, ExPEC have been regarded as specific of a clinical syndrome (e.g. uropathogenic *E. coli*, sepsis-associated *E. coli*, meningitis-associated *E. coli*). However, several reports demonstrated a cross-syndrome commonality of ExPEC clones and VFs.[6] We report here the characteristics of 30 *E. coli* clinical isolates from deep post-operative bone and biomaterial infections in orthopaedic surgery. While mechanisms by which staphylococci infect bone and implants are well-characterized, little is known about *E. coli* OII pathogenesis.[10] Therefore, the aim of our study was to determine if *E. coli* isolated from such clinical situations were associated with a particular virulent and/or adherent phenotype.

All 30 strains from the present study were isolated from acute forms of infection associated with presence of a discharging sinus tract in 9 cases (30%) and/or operative findings of purulence in the joint in 13 cases (43%). Most patients were identified with high risk for infection, particularly elderly with various host-compromising factors. Hsieh et al[4] reported that patients with Gram-negative

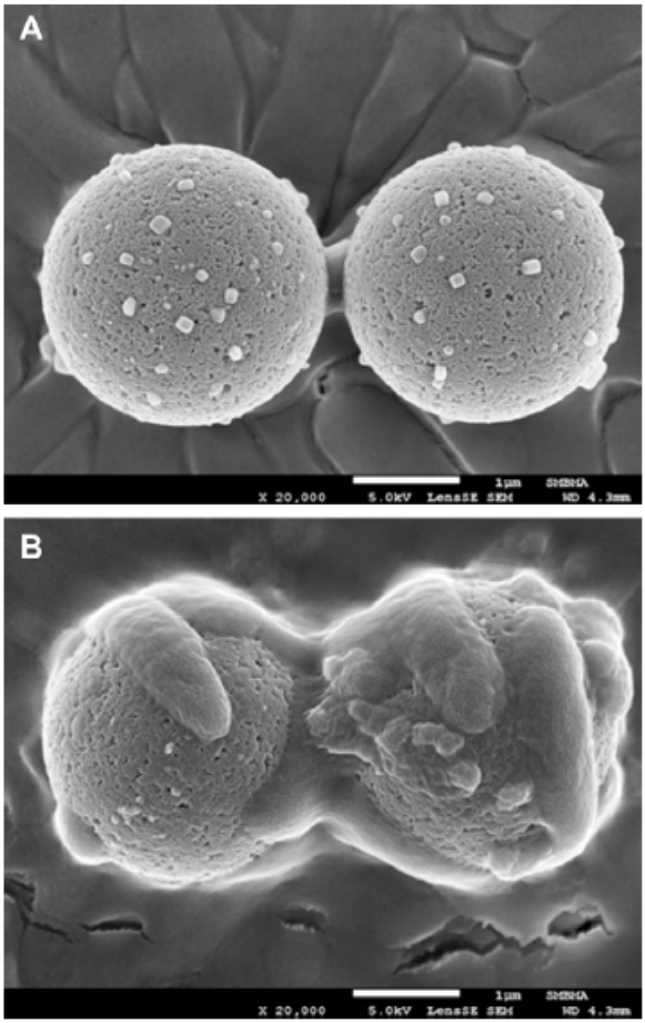


Figure 1 Scanning electron micrographs showing (A) no biofilm formation, or (B) a biofilm growth, after 24 h of incubation at 37 °C, with the BioFilm Ring Test®. Scale bar represents 1 μm.

bone and joint infections were older (median age, 68 years) and developed infection earlier than those with Gram-positive infections (median joint age, 74 *vs.* 109 days). However, in our study, 47% of the infections occurred in the late post-operative period (more than 6 months after surgery). As a consequence, a low rate (23%) of polymicrobial infections was observed. Most of them (71%) developed in the first days after surgery, as previously reported by Martinez-Pastor et al.[5] Finally, several reports established that a high risk of antimicrobial resistance was associated with Gram-negative bone and joint infections.[4,5] In our study, 2 isolates (7%) produced an extended-spectrum β-lactamase and 3 (10%) were resistant to ciprofloxacin, a highly effective therapeutic agent in such infections.

Considering the pathogenesis of these implant-associated infections, acute clinical presentations seemed to be explained by the virulence properties of the studied *E. coli* isolates. Most OII isolates (56.7%) belonged to the phylogenetic group B2. Moreover, isolates from this group were characterized by a higher number of virulence-associated genes. This finding was expected because similar reports on the role of bacterial virulence in various extra-intestinal infections (e.g. acute cholangitis, peritonitis, or skin and soft tissue infections) have already described the same distribution of phylogenetic traits and VFs.[25–28] Analysis of our control group results was also in accordance with other studies demonstrating that, in contrast to ExPEC, faecal *E. coli* strains are more phylogenetically dispersed.[27]

It was difficult to associate specific VFs with OII, even though some of the VFs investigated in the study (*hra*, *usp* and *sfa/foc*) were more common ($P < 0.05$) among *E. coli* OII isolates. More clinical strains are needed to corroborate our data. Other authors[20,25] previously failed to demonstrate a close genetic relationship between strains of *E. coli* recovered from particular extra-intestinal infections. Thus, Petkovsek et al[26] described diverse virulence genotypes among 102 *E. coli* clinical isolates from skin and soft tissue infections. Wang et al[28] also reported various virulence potential among *E. coli* clinical isolates from urine, bile or peritoneal fluid.

Nevertheless, genetic properties of OII isolates could provide a clue to their origin. Hence, we found that some OII isolates shared many characteristics with uropathogenic *E. coli* like the uropathogenic-specific protein (*usp*), and markers of an uropathogenic PAI, each occurring in more than 50% of the phylogenetic group B2 strains.[15,29] Our clinical data confirmed the presence in 16 patients (53%) of underlying urological disorders, like renal failure, recurrent urinary tract infections, or positive pre-operative urine cultures that could represent a source for bone and implant contamination. Five episodes were documented as haematogenously acquired, based on at least one blood culture positive for *E. coli* with the same antimicrobial resistance pattern, and associated with a urinary tract origin in 4 cases.

On the other hand, it was clear that some characteristics of the host would predispose to infection since greater invasive potential was not a common trait of the OII isolates. However,

Table 3 Relationship between biofilm formation using the crystal violet staining assay and the BioFilm Ring Test®.

BioFilm Ring Test® [a]	Crystal violet assay[b]		
	Negative	Weak	Strong
OII isolates			
Negative	23 (77%)	2 (7%)	0
Positive	1 (3%)	4 (13%)	0
Faecal isolates			
Negative	20 (67%)	1 (3%)	0
Positive	6 (20%)	2 (7%)	1 (3%)

[a] Biofilm-positive phenotypes were associated to low BFI values (<7), and biofilm-negative phenotypes to high BFI values (≥7).
[b] Degree of biofilm production was classified in three categories : negative (SBF < 0.25), weak (0.25 ≤ SBF<1), and strong (SBF ≥ 1).

the retrospective design of this study did not permit to collect sufficient clinical data to relate host immune status to the pathogenic potential of the strains, and/or to the severity of infections.

As a second step to explain the pathogenesis of *E. coli* OII, we focused on the possible biofilm-forming potential of the studied isolates. Recently, other authors,[30] reporting cases of *E. coli* small colony variants isolated from sonicated explanted prosthesis and periprosthetic tissues, have already emphasized the role of bacterial adherence and biofilm production in such infections. We evaluated the ability of the studied isolates to form biofilm *in vitro* by two methods. The CV adherence assay has been for many years the reference method most widely used for studying biofilm formation.[31] Compared to this method, the BioFilm Ring Test® is an innovative, easy-to-handle, and fast semi-automated technology.[24] Unexpectedly, none of the OII strains was detected as strong biofilm-producer, and only a few proportion (13%) was considered as weakly adherent by both methods. However, circumstances leading to the formation of biofilm on implant materials (e.g. oxygen tension decrease, presence of necrotic or poorly vascularized soft tissue, release of metal particle debris from prosthesis, etc.) are difficult to reproduce *in vitro*.[3,7] Furthermore, previous investigations have reported factors influencing biofilm production *in vitro*, such as glucose and other sugars, high osmolarity, or low-nutrient conditions.[7,32] Our results support these data since several of the studied *E. coli* isolates were highly variable in their ability to form biofilm, depending on the experimental conditions. Biofilm formation is considered to be a four-step complex process in which initial adherence to the implanted surface is followed by irreversible attachment, small colony development and production of polysaccharide slime. Fimbrial organelles as well as curli fibers or the unbranched β-1.6-*N*-acetyl-D-glucosamine (PGA) polysaccharide have been implicated in one or more developmental stages of biofilm formation in *E. coli*.[8] However, none of these surface determinants was significantly more prevalent in our OII cohort. Furthermore, despite the fact that PGA-dependant adherence has been recognized as a major virulence factor in staphylococcal OII, we found biofilm-forming *E. coli* isolates lacking the *pgaA* gene.[33]

In summary, while there are elements to think that a virulence potential more than a biofilm mode of growth could contribute to the ability of ExPEC to cause orthopaedic implant infections, we did not find a distinct pathogenic signature involved in the infectious process. Further prospective studies involving larger numbers of clinical strains and examining host predisposition characteristics are needed to determine if some specialized factors may predict the outcome of these infections, and could serve as new potential bacterial targets to develop alternative therapeutic strategies.

References

1. Cataldo MA, Petrosillo N, Cipriani M, Cauda R, Tacconelli E. Prosthetic joint infection: recent developments in diagnosis and management. *J Infect* 2010;**61**:443—8.
2. Moran E, Byren I, Atkins BL. The diagnosis and management of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**(Suppl. 3):iii45—54.
3. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis* 2006;**19**:349—56.
4. Hsieh PH, Lee MS, Hsu KY, Chang YH, Shih HN, Ueng SW. Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. *Clin Infect Dis* 2009;**49**:1036—43.
5. Martinez-Pastor JC, Munoz-Mahamud E, Vilchez F, Garcia-Ramiro S, Bori G, Sierra J, et al. Outcome of acute prosthetic joint infections due to Gram-negative bacilli treated with open debridement and retention of the prosthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**:4772—7.
6. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". *J Lab Clin Med* 2002;**139**:155—62.
7. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 2006;**188**:3572—81.
8. Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 2005; **156**:626—33.
9. Ferrières L, Hancock V, Klemm P. Specific selection for virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains during catheter-associated biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;**51**:212—9.
10. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol* 2010;**300**:193—204.
11. Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;**29**:457—63.
12. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Clinical practice recommendations. Osteoarticular infections on materials (prosthesis, implant, osteosynthesis). *Med Mal Infect* 2009;**39**:815—63.
13. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:4555—8.
14. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, et al. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp, iha*, and iroN (*E. coli*). *J Infect Dis* ;***185***:*1521—4*.
15. Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, Terki M, Brahimi N, Loukil C, et al. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* 2002;**70**:3216—26.
16. Brombacher E, Baratto A, Dorel C, Landini P. Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol* 2006;**188**:2027—37.
17. Cerca N, Jefferson KK. Effect of growth conditions on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;**283**:36—41.
18. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000;**181**: 261—72.
19. Johnson JR, O'Bryan TT, Low DA, Ling G, Delavari P, Fasching C, et al. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. *Infect Immun* 2000;**68**:3327—36.
20. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:5798—802.
21. Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Brée A, Germon P, et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:3484—92.
22. Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, et al. Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005;**43**: 4076—82.

23. Naves P, Del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog* 2008;**45**:86—91.
24. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* 2007;**68**:605—12.
25. Bert F, Johnson JR, Ouattara B, Leflon-Guibout V, Johnston B, Marcon E, et al. Genetic diversity and virulence profile of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2010;**48**:2709—14.
26. Petkovsek Z, Elersic K, Gubina M, Zgur-Bertok D, Erjavec MS. Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections. *J Clin Microbiol* 2009;**47**:1811—7.
27. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* 2004;**190**:2121—8.
28. Wang MC, Tseng CC, Wu AB, Huang JJ, Sheu BS, Wu JJ. Different roles of host and bacterial factors in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *Clin Microbiol Infect* 2009;**15**:372—9.
29. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Zgur-Bertok D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol* 2008;**57**:1329—34.
30. Sendi P, Frei R, Maurer TB, Trampuz A, Zimmerli W, Graber P. *Escherichia coli* variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. *J Clin Microbiol* 2010;**48**:1720—5.
31. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;**22**:996—1006.
32. Skyberg JA, Siek KE, Doetkott C, Nolan LK. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J Appl Microbiol* 2007;**102**:548—54.
33. Rhode 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* 2010;**89**:103—11.

1.3 COMMENTAIRES

1.3.1 ASPECTS METHODOLOGIQUES

Choix des cohortes

Ce travail de recherche a été mis en œuvre grâce à la collecte de 30 souches cliniques de *E. coli* isolées d'infections ostéo-articulaires sur divers types de matériels (prothèses, clous, plaques) d'emplacements anatomiques variés (rachis, hanche, genou, cheville). Parmi celles-ci, sept souches (23%) étaient issues d'infections polymicrobiennes. La portée de cette étude est peut-être limitée par ces facteurs d'hétérogénéité mais, comparativement à d'autres infections, il était difficile d'obtenir un échantillonnage plus homogène, car cette situation clinique potentiellement grave, demeure heureusement rare.

Par ailleurs, nous avons fait le choix de comparer ces souches pathogènes à des souches commensales issues de flores fécales. Pour faciliter le recueil, les *E. coli* du groupe comparateur ont été isolés de prélèvements de selles de patients hospitalisés ayant bénéficié d'une coproculture dans le cadre de diarrhées. Bien que ces souches "contrôles" aient été sélectionnées de façon aléatoire, nous nous sommes assurés de ne pas inclure de souches pathogènes intestinales (InPEC), en retenant les cas de diarrhées documentées à un autre pathogène, ou les histoires cliniques non évocatrices d'une diarrhée à *E. coli*.

Etude génétique

Notre étude génétique s'appuie sur la recherche de 19 gènes de virulence identifiés comme essentiels à l'établissement d'infections extra-intestinales et/ou à la formation de biofilm. Néanmoins, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que d'autres facteurs de virulence, peut être encore inconnus, puissent potentiellement contribuer au pouvoir pathogène des souches de *E. coli* impliquées dans les IOAMs. Afin de ne pas limiter l'analyse à des facteurs de virulence déjà décrits, et de fournir une image la plus complète possible du profil de virulence des souches de *E. coli* étudiées, d'autres technologies, comme des micropuces à ADN, offrant la possibilité de détecter plus d'une centaine de gènes de virulence, auraient pu permettre d'identifier d'autres gènes potentiellement impliqués dans la physiopathogénèse des IOAMs (Hamelin *et al*., 2007 ; Sobieszczanska *et al*., 2012). Néanmoins, ces nouvelles technologies, développées dans le cadre de travaux de recherche, restent encore très onéreuses, et nécessitent de disposer d'un équipement adapté et de plusieurs outils statistiques et bioinformatiques pour l'interprétation des résultats.

Méthodes d'étude *in vitro* des biofilms

De nombreuses méthodes d'étude de la formation et du développement des biofilms ont été décrites ces dernières années (observation aux microscopes à fluorescence, confocal à balayage laser, ou électronique à balayage ; numération des bactéries après détachement des biofilms par sonication, frottement ou vortex des surfaces ; ou méthodes en microplaques de mesure de biomasse ou de la viabilité cellulaire). Au cours de ce travail, nous avons recherché, au moyen de deux méthodologies reconnues, si les souches de *E. coli* de notre étude, étaient capables de former du biofilm *in vitro.* Nous avons choisi une première approche classique (la méthode de référence au crystal violet), la plus anciennement utilisée, dérivée de la méthode décrite par Christensen, et une méthode plus récente, basée sur l'utilisation d'une nouvelle technologie, le BioFilm *Ring Test*®. La méthode utilisant le crystal violet permet de quantifier, par coloration, puis resolubilisation du colorant, la biomasse totale du biofilm (matrice exopolysaccharidique et bactéries vivantes ou non). Cependant, de nombreux facteurs (le choix des inoculi bactériens, la température et la durée d'incubation, la méthodologie des lavages, la concentration du colorant, ou encore la durée de coloration) peuvent influencer la fixation du colorant. La technique BioFilm *Ring Test*®, basée sur l'immobilisation de billes magnétiques par la formation de biofilm au fond d'une microplaque, ne présente pas d'étape de lavage, ni d'étape de coloration, ce qui limite les variations de résultats liées à l'opérateur et simplifie la technique.

Il était intéressant de comparer ces deux méthodes, parce qu'elles n'évaluent pas exactement les mêmes étapes de formation du biofilm. En effet, la technique BioFilm *Ring Test*® permet de détecter plus précocement la formation de biofilm, dès l'étape d'adhérence des bactéries à la surface de la microplaque, tandis que la méthode au crystal violet quantifie, en plus des bactéries, la matrice exopolysaccharidique formée lors de la phase de maturation du biofilm.

Par ailleurs, nous avons choisi d'introduire comme contrôle positif, à chaque expérience, une souche de référence *E. coli* ATCC 25922, décrite comme fortement productrice de biofilm (Naves *et al*., 2008). Il aurait pu être intéressant d'ajouter aussi, une ou plusieurs souches de Staphylocoques issues de prélèvements ostéo-articulaires, détectées comme productrices de biofilm lors de précédentes études. En effet, au décours de ce travail nous avons été amenés à montrer que la production de biofilm *in vitro* était fortement dépendante des conditions expérimentales, telles que le milieu de culture, le type de microplaque utilisée, la durée ou les conditions d'incubation (Crémet *et al*., 2013), si bien que la comparaison de résultats entre différentes publications est assez délicate.

1.3.2 RESULTATS

La majorité des *E. coli* issus d'IOAMs (56,7%), appartenait au groupe phylogénétique B2. Ce groupe phylogénétique présente la particularité d'être très riche en marqueurs génétiques de virulence. Dans notre étude, la majorité des adhésines et gènes de virulence recherchés, étaient essentiellement identifiés chez les souches de groupe phylogénétique B2, quelle que soit leur origine : IOAM ou flore fécale. Ainsi, il nous a semblé intéressant de focaliser notre analyse, sur les souches B2, au pouvoir pathogène plus important, afin d'identifier des facteurs de virulence ayant une importance majeure dans la physiopathogénèse des IOAMs. Il est en effet possible, que les 10 souches moins virulentes (groupes phylogénétiques A et B1) du groupe IOAM, aient bénéficié davantage de facteurs prédisposant chez leurs hôtes, pour développer une infection, mais il était difficile de l'établir objectivement, en raison du caractère rétrospectif de notre étude, la majorité des patients présentant des comorbidités.

Compte tenu du faible effectif de *E. coli* B2 dans notre échantillonnage (17 dans le groupe IOAM et 11 dans le groupe témoin), nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence statistiquement significative entre les souches les plus virulentes des deux cohortes. Il aurait sans doute été très intéressant de comparer les *E. coli* issus d'IOAM à d'autres groupes d'ExPEC, plutôt que des souches commensales, afin de distinguer des gènes de virulence particulièrement prévalents dans le contexte d'IOAMs. Ainsi, plus de la moitié des souches B2 du groupe IOAM (65%), portaient un gène *hlyA* codant pour une alpha-hémolysine, alors que d'autres auteurs ont rapporté une plus faible prévalence de ce gène, parmi 66 souches de *E. coli* B2 issues d'infections cutanées et des tissus mous (32%), ou parmi 38 souches de *E. coli* B2 issues de flore fécales (26%) (Sannes *et al*., 2004 ; Petkovsek *et al*., 2009). Toutefois, il convient de souligner que, comme dans notre étude, Sannes *et al*. avaient détecté 64% de souches positives pour cette hémolysine, parmi 42 *E. coli* B2 responsables de bactériémies (Sannes *et al*., 2004). Ce gène *hlyA*, tout comme les gènes *hra* et *sfa/foc*, fortement présents chez les *E. coli* B2 du groupe IOAM (59% et 76%, respectivement), ont particulièrement été décrits au sein d'îlots de pathogénicité (PAI II_{536} et PAI III_{536}), chez des souches de *E. coli* uropathogènes. Les *fimbriae* de type S et F1C (gène *sfa/foc*), ont été associés à des souches de *E. coli* responsables de pyélonéphrite, par d'autres auteurs (Johnson *et al*., 2005). Ces données illustrent les limites d'une classification pathogénique des souches de *E. coli*, et indiquent que les souches de *E. coli* uropathogènes pourraient être responsables, après diffusion hématogène, d'un grand nombre d'IOAMs à *E.*

coli. Dans notre étude, plus de la moitié des patients infectés (18/30), présentait des antécédents urologiques (insuffisance rénale, pyonéphrose, infections urinaires à répétition ou examen cytobactériologique des urines (ECBU) positif en pré-opératoire), ayant pu favoriser la survenue secondaire d'une IOAM.

De façon inattendue, seule une faible proportion des souches de *E. coli* de notre échantillonnage était apte à former du biofilm *in vitro* dans nos conditions expérimentales. Aucune des souches issues d'IOAM n'était détectée comme fortement productrice de biofilm, dans nos conditions expérimentales. Il n'existe pas de technique standardisée et universelle (phénotypique ou génotypique) pour étudier *in vitro* la production du biofilm par différentes souches bactériennes. De plus, la classification des souches en faiblement ou fortement productrices de biofilm reste très arbitraire et variable d'une étude à l'autre. Il est donc difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature. Dans une autre étude, nous avons mis en évidence l'influence des conditions de culture, comme l'absence d'oxygène ou le choix du milieu de culture, sur la capacité des *E. coli* à former du biofilm *in vitro* (Crémet *et al*., 2013). Il est possible que certaines conditions physiologiques, potentiellement favorables à la formation de biofilm ou à une adhérence bactérienne *in situ* (baisse de pH, inflammation, relargage périprothétique de particules de métal…), nous échappent dans les conditions expérimentales retenues.

Un très grand nombre de gènes a été impliqué dans la production de biofilm chez *E. coli*. Les gènes *pgaA, csgA,* et *fimH*, codant respectivement pour un polymère de β-1,6-N-acétyl-D-Glucosamine, la protéine CsgA constituant la sous-unité majeure des curli, et la protéine FimH formant les *fimbriae* de type 1, sont trois des principaux gènes de virulence impliqués dans la formation des biofilms. Dans notre étude, les gènes *fimH* et *csgA* étaient les seuls présents chez l'ensemble des souches capables de former du biofilm *in vitro*. Cependant, la présence de ces gènes n'a pas permis à elle seule de comprendre les différences de production de biofilm observées, puisqu'une très grande majorité des souches non "biofilmogènes", portaient également ces deux gènes. Une étude complémentaire de l'expression de ces gènes dans différentes conditions de culture aurait peut-être pu expliquer ces différences. Par ailleurs, de façon surprenante, nous avons pu constater que la seule souche fortement productrice de biofilm par la méthode au crystal violet ne possédait pas d'opéron *pga*, et était donc incapable de biosynthétiser le polymère de β-1,6-N-acétyl-D-Glucosamine. Pourtant, il s'agit d'un composant majeur de la matrice extracellulaire du biofilm, dont l'importance dans le processus de formation de biofilm, a été soulignée dans

plusieurs études sur les biofilms de staphylocoques (Rhode *et al*., 2010 ; Otto, 2013). D'autres exopolysaccharides impliqués dans la maturation du biofilm, non investigués dans cette étude, comme la cellulose ou l'acide colanique, pourraient expliquer la forte fixation du colorant violet cristal.

Ainsi, cette analyse souligne la formidable complexité du phénomène de formation de biofilm. Ce processus est probablement sous la dépendance de nombreux facteurs, non évalués dans nos conditions expérimentales. Cette propriété pourrait être à l'origine de la pathogénicité des souches moins virulentes, isolées dans le contexte d'IOAMs. L'approfondissement des connaissances dans ce domaine passera sans doute par la mise au point de modèles animaux, dont on connait la complexité.

Points importants :

- Fort potentiel pathogène de la majorité des *E. coli* responsables d'IOAMs, sans profil de virulence spécifique.
- Probable origine urinaire d'une grande partie des *E. coli* responsables d'IOAMs.
- Faible production de biofilm *in vitro* par les *E. coli* responsables d'IOAMs.
- Complexité des mécanismes impliqués dans la formation de biofilm.
- Complexité d'étudier *in vitro* le caractère "biofilmogène" de souches cliniques.

2 ETUDE DE L'INTERACTION *E. COLI* – OSTEOBLASTES *IN VITRO*

2.1 PRESENTATION

Ce travail de recherche est le premier à s'intéresser à l'interaction de souches cliniques de *E. coli* issues d'IOAMs avec des cellules ostéoblastiques humaines. Pour cette étude, 20 souches de *E. coli* sélectionnées parmi les 30 précédemment étudiées (*Article 1*) ont été analysées, en les comparant à deux souches de *S. aureus* et deux souches de *P. aeruginosa*.

L'objectif de ces travaux était de déterminer, par une approche cellulaire, si les *E. coli* isolés d'IOAMs présentaient une virulence particulière *in vitro*. Les données de la littérature ont permis de montrer que les Staphylocoques étaient capables d'envahir les ostéoblastes, de persister sous forme intracellulaire et de perturber le remodelage osseux, en faveur d'une résorption accrue, expliquant en partie la perte osseuse qui accompagne ces infections et les difficultés thérapeutiques rencontrées au cours de leur prise en charge. Nous avons souhaité déterminer si ce comportement bactérien conditionnait également le pouvoir pathogène des *E. coli* isolés d'IOAMs.

Très rapidement, les premiers essais de coculture ont montré que certains *E. coli* étaient capables de lyser les cellules ostéoblastiques MG-63. Nous avons donc recherché, par une approche moléculaire, les gènes de virulence responsables de cette cytotoxicité. Nous avons étudié ensuite, les capacités d'adhérence et d'invasion des souches de *E. coli* non-cytotoxiques, vis-à-vis de la lignée ostéoblastique humaine MG-63, puis avons évalué les réponses IL-6 et TNF-α induites par l'interaction bactéries-cellules ostéoblastiques.

2.2 METHODES ET RESULTATS

Crémet L, Broquet A, Brulin B, Jacqueline C, Dauvergne S, Brion R, Asehnoune K, Corvec S, Heymann D, Caroff N. 2014. Interaction of *Escherichia coli* clinical strains with human osteoblastic cells: low invasion but high cytolytic potential of HlyA-producing strains. Article soumis à Plos One le 27 Octobre 2014

Interaction of *Escherichia coli* clinical strains with human osteoblastic cells: low invasion but high cytolytic potential of HlyA-producing strains

Lise Crémet[1-2], Alexis Broquet[1], Bénédicte Brulin[3], Cédric Jacqueline[1], Sandie Dauvergne[1], Régis Brion[3], Karim Asehnoune[1-4], Stéphane Corvec[1-2], Dominique Heymann[3], and Nathalie Caroff[1*]

[1]Université de Nantes, UFR de Médecine, EA3826, Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections, 1 rue G. Veil, F-44000 Nantes, France
[2]Pôle de Biologie, Service de Bactériologie-Hygiène, CHU de Nantes, France
[3]Université de Nantes, UFR de Médecine, INSERM, UMR 957, Physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, 1 rue G. Veil, 44000 Nantes, France
[4]Pôle Anesthésie Réanimation, Service d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale, CHU de Nantes, France

Abstract

Escherichia coli is one of the first causes of Gram-negative orthopedic implant infections (OII), but little is known about the pathogenicity of this species in such infections that are increasing due to the ageing of the population. In this study, we report how this pathogen interacts with human osteoblastic MG-63 cells *in vitro*, by comparing twenty OII *E. coli* strains to two *Staphylococcus aureus* and two *Pseudomonas aeruginosa* strains. We found by LDH release assay that 6/20 (30%) OII *E. coli* induced MG-63 cell lysis whereas none of the 4 control strains was cytotoxic after 4 hours of coculture. This high cytolytic potential was associated with hemolytic properties and linked to the expression of the *hlyA* gene. We further showed by gentamicin protection assay and confocal microscopy that the non-cytotoxic *E. coli* were not able to invade MG-63 cells unlike *S. aureus* strains (internalization rate < 0.01% for the non-cytotoxic *E. coli versus* 8.88±2.31% and 4.60±0.42% for both *S. aureus*). The non-cytotoxic *E. coli* also demonstrated low adherence rates (< 7%), the most adherent *E. coli* eliciting higher IL-6 and TNF-α mRNA expression in the osteoblastic cells. Altogether, these results indicate that either highly cytotoxic or slightly invasive, OII *E. coli* do not show the same infection strategies as *S. aureus* towards osteoblasts.

Keywords: *E. coli*; human osteoblasts; cytotoxicity; adherence; internalization; alpha-hemolysin; IL-6; TNF-α.

Introduction

Despite serious technological advances in orthopedic surgery and improvement in clinical preventive practice, orthopedic implant infections (OII) continue to be a problem, with an incidence increasing with the boom of prosthetic joint implantations [1, 2]. Gram-negative bacilli are implicated in 6 to 23% of all episodes and *Escherichia coli* is a major etiologic agent of Gram-negative OII [3, 4].

Progress has been made over the past decade in the understanding of the physiopathogenesis of staphylococcal OII. Based on research in this field, bacterial adherence and biofilm formation on the implant surface represent major factors involved in the pathogenesis process, providing protection against antimicrobial therapy and host immune responses [5-7]. Regarding bone infection, *S. aureus* has been shown to invade osteoblasts, persist intracellularly, and induce the secretion of key proinflammatory mediators and potent stimulators of osteoclastogenesis and bone resorption [8-14]. Several virulence determinants, such as specific microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) with in particular the fibronectin-binding proteins (FnBPs), the surface-bound protein A (SpA), or a class of pore-forming toxins named the phenol-soluble modulins (PSMs), have been demonstrated to play a role in *S. aureus* invasiveness and bone destruction [12, 15-17].

E. coli is known as a harmless commensal of the intestinal flora, but through virulence and fitness genes gain, evolves as a highly diverse and adapted pathogen [18, 19]. Very few data currently exist on the pathophysiological mechanisms involved in *E. coli* OII. As previously demonstrated by our group [20], most of *E. coli* strains recovered from peri-implant tissues show a high virulence potential, but no molecular pathogenic signature distinguishes these strains from other extra-intestinal pathogenic *E. coli* like uropathogenic strains (UPEC). Furthermore, we showed that only a small number of OII *E. coli* forms strong biofilms on inert surfaces in experimental conditions [20].

Little is known about the interaction of *E. coli* with bone. Major insights into osteoblasts and osteoclasts responses to *E. coli* infection come from studies of bone cells stimulated with the bacterial cell wall component LPS (lipopolysaccharide) [21-27]. Thus, in the present study, we used a well-characterized panel of 20 clinical OII *E. coli* strains to investigate whether this species can infect and survive within a human osteoblastic cell line and whether this infection elicits

the secretion of proinflammatory mediators and promotes bone destruction [20].

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Twenty clinical strains of *E. coli* (Ec1 to Ec20) involved in hip (14 strains) or knee (6 strains) OII were selected for this study. All OII *E. coli* were obtained from cultures of intraoperative tissue specimens of 20 patients, who displayed typical clinical signs of OII with acute presentation, and fulfilled diagnostic criteria for OII [20]. In five cases (Ec1, Ec3, Ec5, Ec14, Ec17), blood cultures were positive with the same *E. coli*, and in four patients, *E. coli* isolates were recovered from polymicrobial infections (Ec4, Ec8, Ec10, Ec12). Only one isolate per patient was included. The genetic relatedness of the 20 OII *E. coli* was studied by MLST analysis according to the *E. coli* MLST web site (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli). The strains were also investigated for the most common O-serotypes of UPEC and 20 established or putative virulence factors, by PCR (Table 1) [20, 28]. For comparison, we used the well-characterized osteomyelitis strain of *S. aureus* ATCC 49230 (Sa49230), the *P. aeruginosa* laboratory reference strain PaO1, and two clinical strains from our collection: one *S. aureus* (Saclin) involved in infection of a total hip prosthesis, and one *P. aeruginosa* (Pclin) recovered from an infected locking compression plate (LCP) used to treat a tibia-fibula fracture. Two isogenic variants of the *E. coli* strain A0 34/86 [ZKLR$^+$ (HlyA$^+$) and Zhly- (Δ*hlyA* mutant)], were also introduced as controls in some experiments (Table 1) [29].

Before infection of the osteoblast cultures, the strains were grown overnight at 37°C in 10 mL of Luria-Bertani (LB) broth without shaking, harvested by centrifugation for 10 min at 800 *g*, and washed once in 5 mL of Phosphate-Buffered Saline (PBS). The pellets were resuspended in 5 mL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza, Belgium). Bacterial suspensions were adjusted with a nephelometer to obtain 1x10^8 CFU/mL and then diluted in DMEM.

Human osteoblast cultures

The human osteoblast-like osteosarcoma cell line MG-63 purchased from ATCC was cultured in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C in DMEM supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (Hyclone Perbio, France). One day before infection, the cells were seeded at 10^5 cells/wells in 24-well culture plates to obtain confluent monolayers.

Lactate Dehydrogenase (LDH) release assays

Cytotoxicity was determined by quantifying LDH release into MG-63 cell culture supernatants, after 2 or 4 hours of infection with the different strains at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1. The enzymatic activity of LDH was measured with the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), as described by the manufacturer. Cells mortality was calculated relative to that of uninfected cells (set at 0%), and cells lysed with 1% Triton X-100 (positive control, 100%).

Hemolysis assays

The hemolytic activity of the strains was quantified in defibrinated horse blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) diluted to 10% (v/v) in PBS with Ca^{2+} and Mg^{2+}. For these experiments, 200 µL of each bacterial suspension at a concentration of 10^8 CFU/mL in PBS with Ca^{2+} and Mg^{2+} were added to 200 µL of the erythrocytes suspension. Following 2, 6, or 24 hours of incubation at 37°C, the unlysed erythrocytes were pelleted by centrifugation at 1500 x *g* for 2 minutes, and the optical density (OD) of 150 µL of the cell-free supernatants was measured at 450 nm. In each assay, a negative control (0% lysis) and a positive control (100% lysis) were obtained by addition of 200 µL of PBS with Ca^{2+} and Mg^{2+} or 1% Triton X-100 in place of the bacterial suspension, respectively. The percentage of hemolysis was calculated as follows: (OD_{450nm} supernatants – OD_{450nm} negative control)/(OD_{450nm} positive control – OD_{450nm} negative control) x 100.

Measurement of *hlyA* and *cnf1* mRNA expression

The expression of the *hlyA* and *cnf1* genes was analyzed in a relative quantification assay by Real-Time PCR, using the *E. coli gapA* housekeeping gene as a reference. The strains were grown overnight in LB broth, then adjusted to a density of 0.5 MacFarland units, and diluted 1/10 in 10 mL of LB broth. The diluted suspensions were cultured for an additional 3 hours in a 37°C water bath, and the total RNA from 1 mL of each suspension was then extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche) following the manufacturer's instructions. The RNA yield was assessed by UV absorbance, and 100 ng of total RNA was reverse transcribed and amplified using a One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (TaKaRa) with primers listed in Table 2.

Analysis of the chromosomal region upstream of the *hlyC* gene

Primer pairs previously developed from sequences of PAI I (81f/r) and PAI II (72f/r) from the uropathogenic *E. coli* strain 536, were used for amplification and sequencing of the region upstream of the *hlyC* gene [30]. Primers ops-hly-f 5' ACATGAGCAAAACGGATGGG 3' and ops-hly-r 5' ATCCCAGCACGCAAAAGAAG 3' were used for

amplification and sequencing of the *ops* element (operon polarity suppressor) upstream of the *hlyCABD* genes.

Internalization and adherence assays

For bacterial internalization experiments, the MG-63 monolayers were infected during 2 hours (MOI of 10:1). The number of bacteria present in the inocula was verified by plating dilutions on Tryptic Soy Agar (TSA) plates. After 2 hours of infection, the MG-63 cells were washed twice with PBS and incubated for further 4 hours in 1 mL of DMEM containing either 100µg/mL gentamicin for cells infected with the *S. aureus* or *E. coli* strains, or 1mg/mL gentamicin for cells infected with the *P. aeruginosa* strains, to kill the remaining extracellular bacteria (all strains were susceptible to gentamicin with the VITEK2® system). The MG-63 monolayers were then washed three times and lysed with 0.1% Triton X-100. The lysates were serially diluted, and plated on TSA plates to determine the number of intracellular bacteria.

To measure the number of adherent bacteria, the MG-63 monolayers were infected as for internalization experiments, without the use of gentamicin to kill extracellular bacteria. After washing three times with PBS, MG-63 cells were lysed as described above, and lysates were serially diluted and plated on TSA plates.

Adherence and invasion efficiencies were calculated as the ratio of the number of cell-associated bacteria or cell-internalized bacteria, respectively, and the number of bacteria used to infect MG-63 monolayers.

Bacterial internalization assessment by confocal microscopy

MG-63 cells were seeded onto glass cover-slips and infected with 3 clinical strains from OII (Saclin, Pclin, and Ec2), as described above for the internalization assays. Following incubation with gentamicin, the MG-63 cells were washed three times, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and then permeabilized and blocked with 0.05% Triton X-100 + 1% Bovine Serum Albumin (BSA). FITC-labeled rabbit anti-*E. coli*, *S. aureus*, or *P. aeruginosa* antibodies (Thermo Fisher Scientific) were used to visualize the bacteria, along with DRAQ5™ far-red fluorescent DNA dye (Eurobio) and Alexa Fluor 546® phalloidin (Life Technologies) for labeling F-actin. Slides were acquired on a Nikon A1R-Si confocal microscope, and pictures were analyzed with the Fiji software.

Measurement of IL-6 and TNF-α mRNA expression by relative quantitative RT-PCR

Following 4 or 6 hours of infection (MOI of 100:1), the MG-63 monolayers were washed twice with PBS and RNA was isolated using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche) following the manufacturer's instructions. The RNA yield was assessed by UV absorbance, and 2µg of total RNA was reverse transcribed using the SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Life technologies) with random primers (Promega), as recommended by the manufacturers. Real-time amplification of the cDNA was performed using the SYBR® *Premix Ex Taq*™ (TaKaRa) and primers listed in Table 2. The expression of the IL-6 and TNF-α mRNAs was normalized against β-actin mRNA, and quantified using the comparative $2^{-\Delta CT}$ method.

IL-6 and TNF-α secretion assays

The release of IL-6 and TNF-α in culture supernatants of uninfected and infected MG63-cells ($5x10^5$ cells/wells in 6-well culture plates, MOI of 1:100) was quantified by ELISA, according to the manufacturer's instructions (eBioscience, Paris, France), after 24 hours of incubation or 72 hours, including a treatment with 100µg/mL gentamicin at 24 hours post-infection.

Statistical analysis

All assays were performed on 3 separate occasions. Results were expressed as means ± SD. Fisher's exact test and Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post test were used to calculate *P* values. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Some OII *E. coli* strains induce osteoblasts lysis *in vitro*

Viability of the MG-63 cells was assessed following infection with the 20 *E. coli* and 6 control strains. Osteoblasts were not lysed following 2 or 4 hours of infection with the *S. aureus* or *P. aeruginosa* control strains, whereas 4/20 OII *E. coli* induced cytotoxicity following 2 hours, and 6/20 OII *E. coli* induced cytotoxicity following 4 hours (Fig. 1). No cytotoxic effect was detected when the strains were heat-inactivated at 100°C for 10 min before infection.

Cytotoxicity, hemolytic activity and alpha-hemolysin (HlyA) expression are linked

Investigation of the virulence profiles of the 20 *E. coli* strains showed that the cytolytic potential was significantly associated with two virulence genes (*hlyA* and *cnf1, P* = 0.0007 and 0.0022, respectively; Fisher's exact test) (Table 1, Fig. 1A). The 6 strains that induced cytotoxicity after 4 hours of infection were positive for *hlyA*, and experiments with both *E. coli* ZKLR$^+$ (*hlyA*+) and Zhly- (ZKLR$^+$ Δ*hlyA* mutant) confirmed the link between the *hlyA* gene and MG-63

cells lysis (Fig. 1B). Since two *hlyA*-positive strains (Ec2 and Ec15) did not induce lysis (Fig. 1A), we analyzed the hemolytic activity of the 8 *hlyA*-positive strains of our panel and studied the *hlyA* gene expression in these strains (Fig. 2), to characterize the influence of alpha-hemolysin production on MG-63 cells lysis. In accordance with the results shown above, 2 *hlyA*-positive strains (Ec2 and Ec15) were non-hemolytic. The 6 cytotoxic *E. coli* strains and the $ZKLR^+$ control, but not the Zhly- control, caused hemolysis with some differences, the maximum effect being obtained after 6 hours of incubation with erythrocytes (Fig. 2A). The observed differences were correlated with the levels of *hlyA* gene expression (Fig. 2B). Genetic analysis of the regions located upstream of the *hlyCABD* genes revealed that the 8 *hly* operons were encoded on pathogenicity islands (PAI) II, and that the sequences of the respective *ops* elements, involved in transcriptional activation of the *hlyCABD* genes, were identical. The *cnf1* gene was less strongly expressed than the *hlyA* gene, and while both genes were weakly expressed in the non-cytotoxic Ec2 strain, results obtained with the Zhly- *E. coli* confirmed that this virulence factor was not responsible for the MG-63 cells lysis (Fig. 1B, Fig. 2C).

OII *E. coli* strains show fairly inefficient internalization in osteoblats

Evaluation of bacterial internalization was performed with the *S. aureus* and *P. aeruginosa* control strains and the 16 *E. coli* strains that did not induce cytotoxicity following 2 hours of infection. All *E. coli* strains were less invasive than the control strains towards osteoblasts (mean percentage of internalized bacteria <0.01% for the 16 *E. coli* strains *versus* 8.88 ± 2.31% and 4.60 ± 0.42% for Saclin and Sa49230, respectively, or 0.57 ± 0.17% and 0.04 ± 0.03% for Paclin and PaO1, respectively). Determination of bacterial subcellular localization by confocal microscopy confirmed the intracellular presence of *S. aureus* or *P. aeruginosa* and nearly no internalization for *E. coli* (Fig. 3).

OII *E. coli* strains show differences in adherence to osteoblasts

The adherence assays revealed differences among the 16 non-cytotoxic strains of *E. coli* (Fig. 4). Only two strains (Ec6 and Ec12) showed an adherence rate higher than 4%, and eight showed an adherence rate lower than 1%. No significant association was found between specific virulence genes and the ability of the strains to adhere to MG-63 cells *in vitro*.

Adherence of OII *E. coli* strains to osteoblasts elicits weak induction of IL-6 and TNF-α responses

We examined the effects of the *S. aureus* and *P. aeruginosa* control strains and 6 *E. coli* strains on IL-6 and TNF-α mRNAs expression in MG-63 cells. Both most adherent *E. coli* (Ec6 and Ec12), and 4 other *E. coli* strains [including three (Ec2, Ec9, and Ec10) that showed adherence rates < 1%] were studied. As shown in Fig. 5**,** the strain Sa49230 induced much higher level of IL-6 mRNA than any other strain, 6 hours post-infection, and was the only strain to induce IL-6 secretion 24 and 72 hours post-infection (54.08 ± 26.73 pg/mL and 131.71 ± 43.25 pg/mL, respectively). Both most adherent Ec6 and Ec12 strains induced significantly higher levels of IL-6 mRNA than the less adherent Ec2 and Ec9 strains. Similarly, induction of TNF-α mRNA expression was correlated with the adherence rates of the *E. coli* strains. Thus, the levels of TNF-α mRNA expressed after 6 hours by the Ec6 or Ec12-infected MG-63 cells were comparable to those of the Saclin, PaO1, or Pclin-infected cells, but were significantly higher than those of the Ec2, Ec9, or Ec10-infected cells. TNF-α was not detected in supernatants of the infected cells 24 or 72 hours post-infection, even for the strain Sa49230, which was the most efficient to induce TNF-α mRNA expression.

Discussion

Several subgroups of extra-intestinal pathogenic *E. coli* through production of large arrays of virulence factors, have been shown to adhere to and cross different epithelial barriers (e.g., intestine, bladder), triggering severe tissue damages and proinflammatory responses [19, 31]. In this investigation, we wanted to determine if such virulence mechanisms are developed by OII *E. coli* towards human osteoblasts. For this purpose, we used a panel of 20 clinical strains of *E. coli* from OII. These strains belonged to different sequence types and serotypes, most of them presenting the characteristics of UPEC (serotypes and PAI-encoded virulence genes of uropathogenic *E. coli*).

The osteoblasts, derived from mesenchymal bone marrow precursors, control the bone remodeling process by synthesizing the components of bone matrix, and by modulating the activity of the bone-resorbing osteoclasts. These cells have also been shown to produce different soluble inflammatory mediators (IL-6, IL-1, TNF-α, receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)), following *S. aureus* infection [9, 11-13, 16]. Thus, the bone destruction induced by *S. aureus* exposure results mainly from the inflammatory reaction elicited by the infection, even if some *S. aureus* lineages that overexpress the newly studied family of PSM peptides share cytolytic properties following invasion of osteoblasts [17]. The present study provides evidence that 30% of the *E.*

coli strains of our panel are also strongly cytotoxic towards osteoblasts. Interestingly, we observed that most of these cytotoxic strains at an MOI as low as 10:1, reduced osteoblasts cells viability by approximately 20% after 2 hours of infection, whereas both *S. aureus* strains of our study were non-cytotoxic. Other authors reported cytolytic effects for *S. aureus* infection of the same MG-63 cell line, at higher MOI (100:1) and after 24 hours of infection [17].

In our study, two virulence factors, namely an alpha-hemolysin (HlyA) and a toxin named cytotoxic necrotizing factor (CNF1), were significantly associated with the cytolytic activity on MG63 cells. This cytolytic activity was also confirmed on human mesenchymal stem cells (derived from bone marrow), that are precursors of osteoblasts (data not shown). HlyA is an extracellular pore-forming cytolysin from the RTX (repeats-in-toxin) family, while the protein CNF1 belongs to a family of factors activating intracellular Rho GTPases [30-33]. Both virulence factors are known to induce apoptosis or necrosis/lysis, depending on concentration, in several cell types, including macrophages, epithelial cells, and neutrophils [30, 31, 33]. In uropathogenic *E. coli* producing CNF1, the *cnf1* gene has been shown to be coupled to the hemolysin operon (*hlyCABD*) in the PAI II [32]. Transcription of both *hlyCABD* operon and *cnf1* gene is enhanced by the regulator RfaH which binds on the *ops* DNA site located downstream from the *hlyCABD* promoter, and suppresses transcription polarity [32, 34]. In the present study, all cytotoxic *E. coli* strains exhibited a hemolytic activity linked to the expression of the *hlyA* gene. We observed that non-hemolytic strains were not cytotoxic, regardless of whether or not they carried a *cnf1* gene. We found, in fact, that the *cnf1* gene was less expressed than the *hlyA* gene, and that its expression was well correlated with that of *hlyA* gene. Accordingly, all *hlyCABD* operons were found encoded on PAIs II, with an *ops* element upstream of the *hlyC* gene. Several polymorphisms were found in the upstream sequences of the *hlyC* genes, but no nucleotide deletions and/or substitutions was detected in the *ops* elements of the strains that weakly expressed the *hlyA* gene. Thus, while no explanation was found for the low *hlyA* expression in some *E. coli*, our results highlight the cytolytic effect of a functioning hemolysin on osteoblasts, and are in accordance with those of Island et al. who found that CNF1 does not affect the cytotoxicity of hemolytic isolates towards human bladder cells *in vitro* [35].

Detailed analyses of the interaction between *S. aureus* and bone revealed that the *S.aureus* surface-associated proteins FnBPs and SpA mediate attachment of the bacterium to fibronectin and tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR-1) on osteoblasts, and leads to bacterial uptake *via* an integrin α5β1-mediated mechanism [16]. Consistent with this model, both *S. aureus* strains of our study showed the highest internalization capacity (approximately 5% and 9% of internalized bacteria). The percentage of internalized *P. aeruginosa* was comparatively 10-fold to 100-fold lower, and all strains of *E. coli* presented an extremely low internalization rate (<0.01%). The poor uptake of *E. coli* could be reasonably attributed to the low ability of the strains to adhere to osteoblasts, since the adherence rates of our OII *E. coli* were not higher than 7%, half of the strains showing an adherence rate lower than 1%. Interestingly, these results are very similar to those from Fiedler et al that recently investigated the adherence and internalization in adipose-derived mesenchymal stem cells of one *E. coli* obtained from wound infection (i.e., 1.4% of adherent bacteria and 0.008% of internalized bacteria) [36]. As far as we know, there is not any animal model showing histopathological evidence of *E. coli* adherence to osteoblasts during an experimental infection. Nonetheless, *E. coli* is well-known to express various adhesins, including several FnBPs. The amyloid fibers curli, involved in biofilm formation, are the most important and were previously identified in all OII *E. coli* studied [20, 37, 38]. 60% (12/20) of our *E. coli* strains demonstrated a strong affinity for the curli-binding dye, congo red (data not shown), including both most adherent strains, Ec6 and Ec12.

Finally, a major component of the outer membrane of *E. coli*, namely the LPS, has been proposed to be a potent stimulator of bone destruction in several bone inflammatory diseases [23, 24]. Thus, following binding to toll-like receptor 4 (TLR4) on osteoblasts, LPS promotes synthesis of proinflammatory mediators, among which IL-6, TNF-α, RANKL, and PGE2 inhibit osteoblast differentiation, promote osteoblast apoptosis, and stimulate osteoclastogenesis directly or indirectly [21-26]. However, LPS is a surrogate marker of Gram-negative bacteria, which do not sufficiently reflect whole bacteria and only partly mimics osteoblasts infection, with the risk of non-physiological stimuli. There are very few experimental models of osteoblasts infection by Gram-negative organisms, the existing studies being essentially focused on the intracellular pathogens *Salmonella* and *Brucella* [9, 39-41]. Furthermore, these studies are often based on small numbers of clinical strains, even in the case of *S. aureus* infections, where the osteomyelitis clinical strain ATCC 49230 has been the most studied [8, 10, 11, 13, 39].

In the present study, in accordance with the current knowledge on osteoblasts responses to *S. aureus*, we found that infection with the strain

Sa49230 elicited the secretion of IL-6 from MG-63 cells [13]. This secretion seemed to be strain dependant, since stimulation of osteoblasts with the other *S. aureus* elicited a lower IL-6 response and did not result in IL-6 secretion. Moreover, we show that infection with both *S. aureus* induced TNF-α mRNA expression, but did not induce TNF-α release from MG-63 cells. These results are consistent with previous data that either showed an endogenous cell-surface TNF-α expression of MG-63 cells, or established that *S. aureus*- or *Brucella*-infected osteoblasts do not secrete detectable levels of TNF-α *in vitro* [40-42].

Differences in IL-6 or TNF-α mRNA expression were observed between the *E. coli* strains, and adherence to osteoblasts seemed to contribute to the induction of IL-6 or TNF-α mRNA expression. Our findings indicate that the most adherent OII *E. coli* strains elicit IL-6 or TNF-α responses, which are equivalent to those elicited by *S. aureus* or *P. aeruginosa* strains recovered in the same clinical context. It would be now interesting to extend those findings to other proinflammatory mediators and to study the molecular mechanisms mediating osteoblasts immune response to infection by these different bacterial species.

In conclusion, our study is the first to investigate the effects of 20 clinical strains of *E. coli* from OII on human osteoblastic cells. Even if we did not find that OII *E. coli* shared common virulence properties towards osteoblasts, our data provide evidence that the HlyA-producing strains, known to be highly virulent, are associated with cytolytic phenotypes. The others are poorly internalized into osteoblasts, the most adherent of them eliciting IL-6 or TNF-α responses in the same range as those induced by some strains of *S. aureus* or *P. aeruginosa* from OII.

Acknowledgements

We thank Dr J. Holubova and Pr P. Sebo (Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens, Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic) for kindly providing the ZKLR$^+$ and Zhly- *E. coli* control strains used in this study.

References

1. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J (2012) Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. J Arthroplasty 27: 61-5.e1.
2. Lima AL, Oliveira PR, Carvalho VC, Saconi ES, Cabrita HB, et al. (2013) Periprosthetic joint infections. Interdiscip Perspect Infect Dis 2013: 542796-802.
3. Zmistowski B, Fedorka CJ, Sheehan E, Deirmengian G, Austin MS, et al. (2011) Prosthetic joint infection caused by Gram-negative organisms. J Arthroplasty 26(6 Suppl): 104-8.
4. Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PF (2012) Microbiological ætiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? Antimicrob Agents Chemother 56: 2386-91.
5. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, et al. (2011) Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. Future Microbiol 6: 1329-49.
6. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP (2012) Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. Biomatter 2: 176-94.
7. Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrena E, et al. (2013) *In vitro* susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopædic infections. Int J Antimicrob Agents 41: 521-3.
8. Alexander EH, Rivera FA, Marriott I, Anguita J, Bost KL, et al. (2003) *Staphylococcus aureus*-induced tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts. BMC Microbiol 3: 5.
9. Marriott I (2004) Osteoblast responses to bacterial pathogens. Immunol Res 30: 291-308.
10. Marriott I, Gray DL, Rati DM, Fowler VG Jr, Stryjewski ME, et al. (2005) Osteoblasts produce monocyte chemoattractant protein-1 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue. Bone 37: 504-12.
11. Somayaji SN, Ritchie S, Sahraei M, Marriott I, Hudson MC (2008) *Staphylococcus aureus* induces expression of receptor activator of NF-kappaB ligand and prostaglandin E2 in infected murine osteoblasts. Infect Immun 76: 5120-6.
12. Wright JA, Nair SP (2010) Interaction of staphylococci with bone. Int J Med Microbiol 300: 193-204.
13. Ning R, Zhang X, Guo X, Li Q (2011) *Staphylococcus aureus* regulates secretion of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 through activation of nuclear factor kappaB signaling pathway in human osteoblasts. Braz J Infect Dis 15: 189-94.
14. Hamza T, Dietz M, Pham D, Clovis N, Danley S, et al. (2013) Intra-cellular *Staphylococcus aureus* alone causes infection *in vivo*. Eur Cell Mater 25: 341-50.

15. Cassat JE, Hammer ND, Campbell JP, Benson MA, Perrien DS, et al. (2013) A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. Cell Host Microbe 13: 759-72.

16. Claro T, Widaa A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien FJ, et al. (2013) *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. Microbiology 159: 147-54.

17. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, et al. (2013) PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. PLoS One 8: e63176.

18. Köhler CD, Dobrindt U (2011) What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int J Med Microbiol 301: 642-7.

19. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, et al. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 26: 822-80.

20. Crémet L, Corvec S, Bémer P, Bret L, Lebrun C, et al. (2012) Orthopædic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains. J Infect 64: 169-75.

21. Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, et al. (2004) Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. J Immunol 172: 2504-10.

22. Inada M, Matsumoto C, Uematsu S, Akira S, Miyaura C (2006) Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. J Immunol 177: 1879-85.

23. Ochi H, Hara Y, Tagawa M, Shinomiya K, Asou Y (2010) The roles of TNFR1 in lipopolysaccharide-induced bone loss: dual effects of TNFR1 on bone metabolism via osteoclastogenesis and osteoblast survival. J Orthop Res 28: 657-63.

24. Yan C, Cao J, Wu M, Zhang W, Jiang T, et al. (2010) Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits LPS-induced IL-6 expression in osteoblasts by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein β activity. J Biol Chem 285: 37227-39.

25. Gao A, Kantarci A, Herrera BS, Gao H, Van Dyke TE (2013) A critical role for suppressors of cytokine signaling 3 in regulating LPS-induced transcriptional activation of matrix metalloproteinase-13 in osteoblasts. Peer J 1: e51.

26. Guo C, Yuan L, Wang JG, Wang F, Yang XK, et al. (2014) Lipopolysaccharide (LPS) induces the apoptosis and inhibits osteoblast differentiation through JNK pathway in MC3T3-E1 cells. Inflammation 37: 621-31.

27. Nakao J, Fujii Y, Kusuyama J, Bandow K, Kakimoto K, et al. (2014) Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4-MyD88 dissociation. Bone 58: 17-25.

28. Li D, Liu B, Chen M, Guo D, Guo X, et al. (2010) A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. J Microbiol Methods 82: 71-7.

29. Sheshko V, Hejnova J, Rehakova Z, Sinkora J, Faldyna M, et al. (2006) HlyA knock out yields a safer *Escherichia coli* A0 34/86 variant with unaffected colonization capacity in piglets. FEMS Immunol Med Microbiol 48: 257-66.

30. Burgos Y, Beutin L (2010) Common origin of plasmid encoded alpha-hemolysin genes in *Escherichia coli*. BMC Microbiology 10: 193.

31. Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, et al. (2013) Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. Curr Opin Microbiol 16: 100-7.

32. Landraud L, Gibert M, Popoff MR, Boquet P, Gauthier M (2003) Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. Mol Microbiol 47: 1653-67.

33. Garcia TA, Ventura CL, Smith MA, Merrell DS, O'Brien AD (2013) Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. Infect Immun 81: 99-109.

34. Leeds JA, Welch RA (1997) Enhancing transcription through the *Escherichia coli* hemolysin operon, *hlyCABD*: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. J Bacteriol 179: 3519-27.

35. Island MD, Cui X, Foxman B, Marrs CF, Stamm WE, et al. (1998) Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. Infect Immun 66: 3384-9.

36. Fiedler T, Salamon A, Adam S, Herzmann N, Taubenheim J, et al. (2013) Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 18: 2883-92.

37. Barnhart MM, Chapman MR (2006) Curli biogenesis and function. Annu Rev Microbiol 60: 131-47.

38. Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA (2011) Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. FEMS Microbiol Rev 35: 147-200.

39. Alexander EH, Bento JL, Hughes FM Jr, Marriott I, Hudson MC, et al. (2001) *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Dublin induce tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression by normal mouse and human osteoblasts. Infect Immun 69: 1581-6.

40. Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC (2009) Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. Infect Immun 77: 984-95.

41. Scian R, Barrionuevo P, Giambartolomei GH, Fossati CA, Baldi PC, et al. (2011) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with *Brucella abortus*. Infect Immun 79: 192-202.

42. Bu R, Borysenko CW, Li Y, Cao L, Sabokbar A, et al. (2003) Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. Bone 33: 760-70.

Table 1. Virulence profiles of the 20 OII *E. coli* and 2 *E. coli* control strains studied.

Isolate[a]	Site of infection	Phylogenetic group	MLST	Serotype	Virulence factors[b] : ***fimH, papC, papGII, papGIII, sfa/foc, hra, tsh, iucC, hlyA, traT, sat, cnf1, usp, cdt, vat, ibeA, ompT, neuB, csgA,* and *pgaA***	Reference
Ec1	Knee	B2	ST95	O2	*fimH*, *papC*, *papGII*, *iucC*, *traT*, *usp*, *vat*, *ompT*, *neuB*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec2	Knee	B2	ST80	O75	*fimH*, *sfa/foc*, *hra*, ***hlyA***, ***cnf1***, *usp*, *vat*, *ibeA*, *ompT*, *neuB*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec3	Hip	B2	ST537	O75	*fimH*, *papC*, *papGIII*, *sfa/foc*, *hra*, ***hlyA***, ***cnf1***, *usp*, *cdt*, *vat*, *ibeA*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec4	Knee	B2	ST126	-	*fimH*, *papC*, *papGIII*, *sfa/foc*, *hra*, ***hlyA***, ***cnf1***, *usp*, *cdt*, *vat*, *ibeA*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec5	Hip	B2	ST141	O2	*fimH*, *papC*, *papGIII*, *sfa/foc*, *hra*, ***hlyA***, ***cnf1***, *usp*, *vat*, *ompT*, *neuB*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec6	Hip	B2	ST404	O75	*fimH*, *papGII*, *iucC*, *sat*, *usp*, *vat*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec7	Hip	B2	ST73	-	*fimH*, *sfa/foc*, *hra*, ***hlyA***, ***cnf1***, *usp*, *vat*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec8	Hip	B2	ST73	O6	*fimH*, *papC*, *papGII*, *sfa/foc*, *iucC*, ***hlyA***, *sat*, *usp*, *vat*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec9	Hip	B2	ST550	O75	*fimH*, *sfa/foc*, *iucC*, *sat*, *usp*, *vat*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec10	Hip	B2	ST95	O1	*fimH*, *papC*, *papGII*, *iucC*, *traT*, *usp*, *vat*, *ompT*, *neuB*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec11	Knee	B2	ST141	O2	*fimH*, *papC*, *papGIII*, *sfa/foc*, *hra*, ***hlyA***, ***cnf1***, *usp*, *vat*, *ompT*, *neuB*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec12	Hip	B2	ST1618	O4	*fimH*, *sfa/foc*, *usp*, *cdt*, *vat*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec13	Hip	B2	ST95	O1	*fimH*, *papC*, *papGII*, *iucC*, *traT*, *usp*, *vat*, *ompT*, *neuB*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec14	Hip	D	ST354	O1	*fimH*, *iucC*, *traT*, *usp*, *ibeA*, and *csgA*	This study
Ec15	Knee	D	ST405	O2	*fimH*, *papC*, *hra*, *iucC*, ***hlyA***, *traT*, *sat*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec16	Hip	D	ST420	-	*fimH*, *usp*, *vat*, *ibeA*, *ompT*, *neuB*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec17	Hip	A	ST361	-	*fimH*, *traT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec18	Knee	A	ST88	O8	*fimH*, *papC*, *hra*, *iucC*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec19	Hip	A	ST10	-	*fimH*, *papC*, *hra*, *iucC*, *traT*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
Ec20	Hip	B1	ST1167	O21	*fimH*, *iucC*, *ompT*, *csgA*, and *pgaA*	This study
ZKLR$^+$	-	B2	-	O83	*fimH, papC, papGII, papGIII, sfa/foc, hra, tsh,* ***hlyA, cnf1****, usp, vat, ibeA, ompT*, *csgA*, and *pgaA*	(29)
Zhly$^-$	-	B2	-	O83	*fimH, papC, papGII, papGIII, sfa/foc, hra, tsh,* ***cnf1****, usp, vat, ibeA, ompT*, *csgA*, and *pgaA*	(29)

[a] *E. coli* strains that induced osteoblasts lysis *in vitro* are underlined.

[b] Virulence factors significantly associated with the osteoblasts lysis potential are shown in bold type.

Table 2. Primer sequences used in RT-PCR analysis.

PRIMER	NUCLEOTIDE SEQUENCE (5'-3')
GAPA-F	ACGAAGTTGGTGTTGACGTTG
GAPA-R	ATAACCACTTTCTTCGCACCA
HLYA-F	AGCAGGACAAAGCACGAAA
HLYA-R	GTAATCGCCGTGCCATTCTT
CNF1-F	ATGAAGCCCCGGTTGAAGTA
CNF1-R	TCCCCGTCCTTTAAGCACAT
B-ACTIN-F	CCCAGCCATGTACGTTGCTA
B-ACTIN-R	AGGGCATACCCCTCGTAGATG
H-IL-6-F	TCCACAAGCGCCTTCGGTCCAG
H-IL-6-R	CTCAGGGCTGAGATGCCGTCG
H-TNF-A-F	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT
H-TNF-A-R	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA

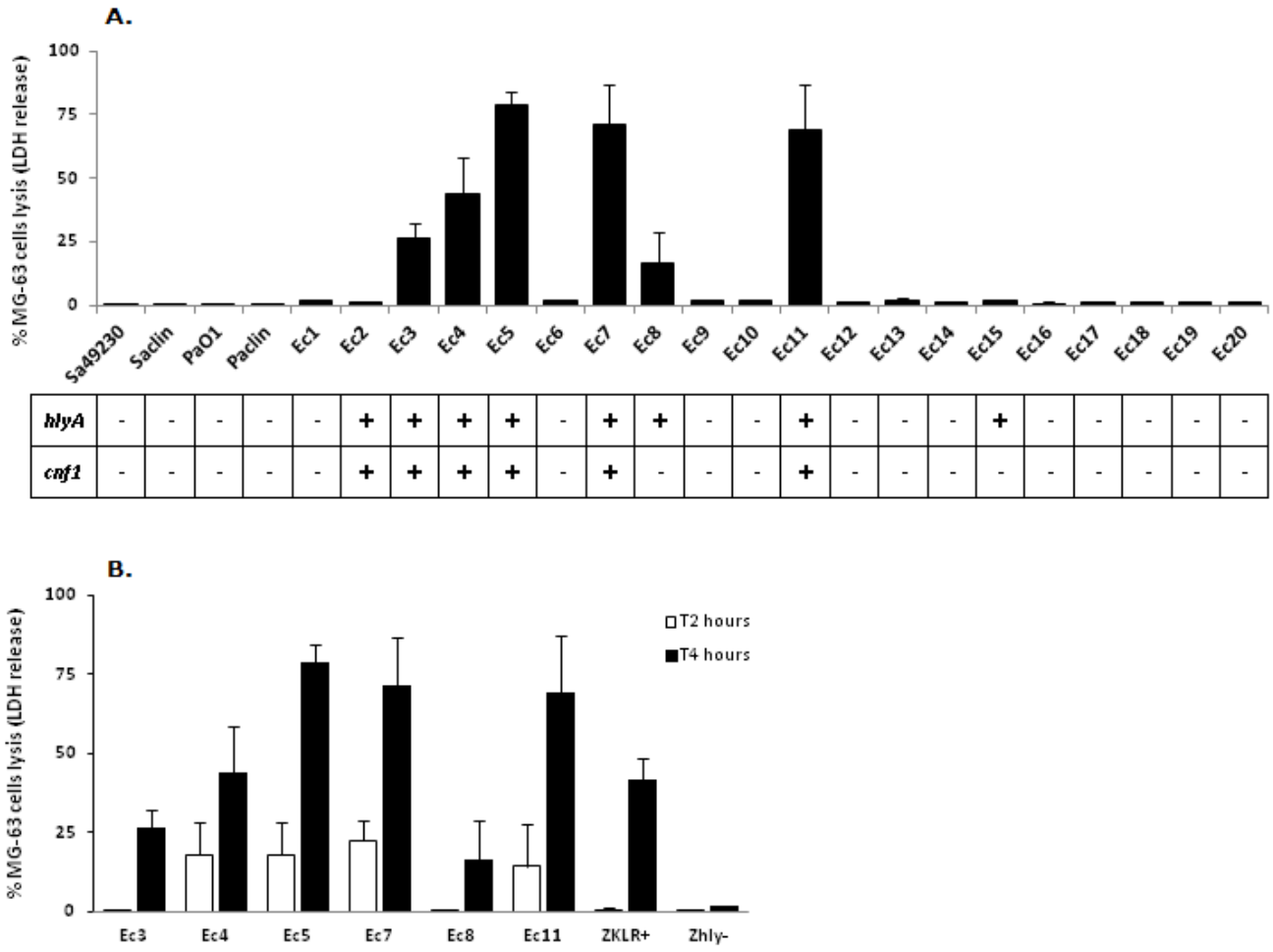


FIG 1 *In vitro* lytic effects on MG-63 cells of the 20 OII *E. coli* and 6 control strains, as assessed by LDH release. (A) Cell mortality after 4 hours of infection (MOI of 10:1), and correlation with the detection of two virulence genes (*hlyA* and *cnf1*), by PCR. (B) Levels of mortality obtained after 2 and 4 hours of infection (MOI of 10:1) for the 6 cytotoxic *E. coli* strains of our panel, and both *E. coli* control strains: ZKLR$^+$, positive for the *hlyA* gene, and Zhly-, the Δ*hlyA* mutant of ZKLR$^+$.

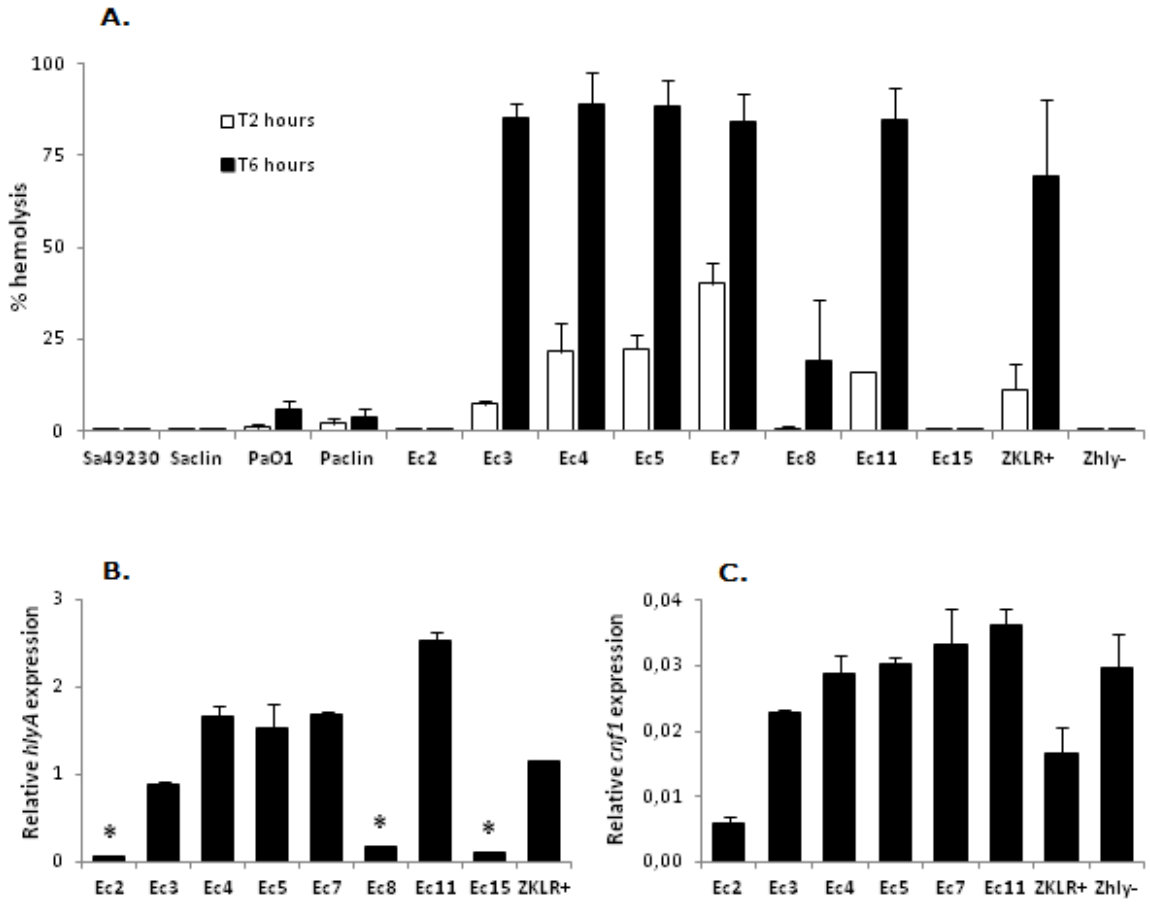


FIG 2 Analysis of the hemolytic potential of *hlyA*-positive strains of *E. coli*. (A) Hemolytic activity of the 8 *hlyA*-positive *E. coli* of our panel, and the 6 control strains of our study, after 2 and 6 hours of incubation with horse erythrocytes. The 12 *hlyA*-negative *E. coli* of our panel did not induce hemolysis and are not shown (B) Relative expression of the *hlyA* gene in the 8 *hlyA*-positive strains, and the ZKLR$^+$ *E. coli* control strain. $*$, $P < 0.01$ *versus* Ec3, Ec4, Ec5, Ec7, Ec11, or ZKLR$^+$ (Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post test). (C) Relative expression of the *cnf1* gene in the 6 *cnf1*-positive strains, and both ZKLR$^+$ and Zhly- *E. coli* control strain.

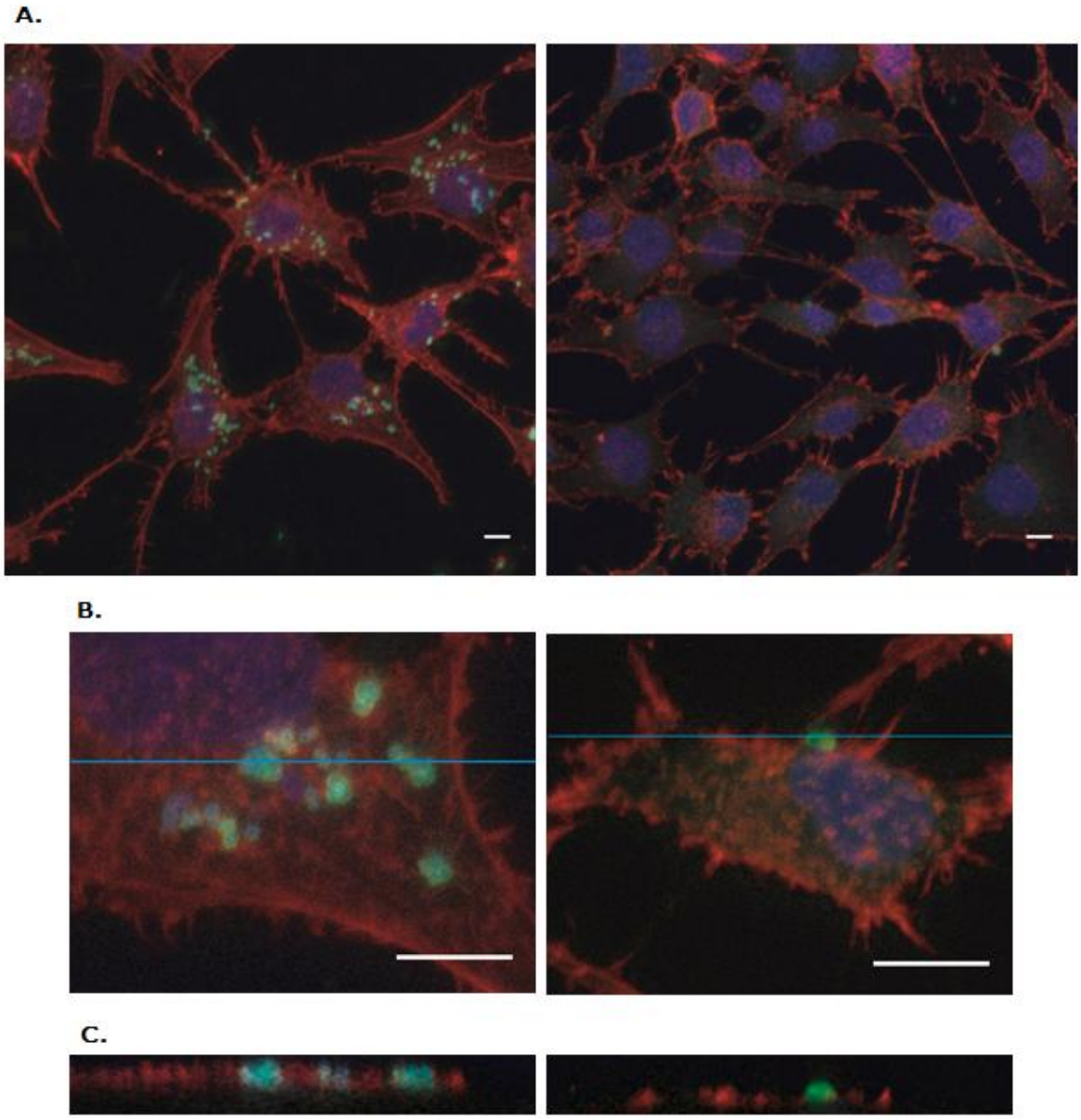


FIG 3 Immunofluorescence stainings of F-actin (red, phalloidin), nuclei (blue, DRAQ5) and bacteria (green, polyclonal anti *S. aureus* or *E. coli*), performed after 2 hours of coculture of MG-63 cells with the Saclin strain or with the OII *E. coli* strain Ec2 (MOI of 10:1) and 4 hours of incubation with 100µg/mL gentamicin. (A) The image on the left shows several *S. aureus* cells associated with the MG-63 cells, whereas very few *E. coli* cells were detected (image on the right). (B) Cropped images of the stacks analyzed in A confirm the presence of aggregates of *S. aureus* cells (image on the left) and a single *E. coli* cell (image on the right) in close contact with the MG-63 cells. (C) Orthogonal views derived from the blue lines of the crops analyzed in B, show the intracellular location of the *S. aureus* cells (image on the left, green signals framed with red), whereas the *E. coli* cell was extracellular (image on the right, no red frame around the green signal). Scale bars: 10 µm.

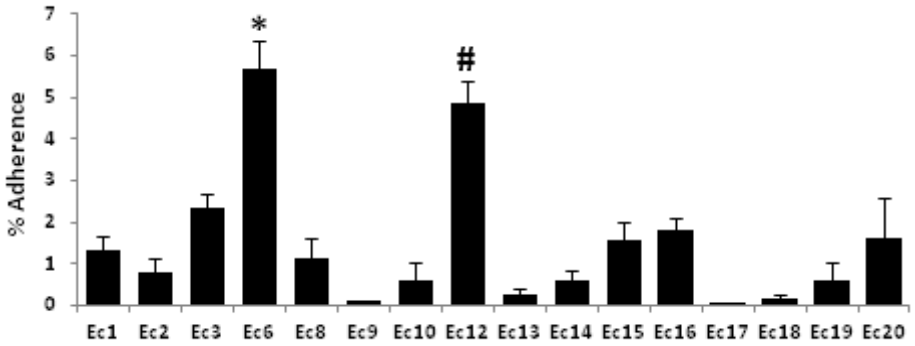


FIG 4 Percentage of adherent bacteria after 2 hours of coculture of MG-63 cells with the 16 non-cytotoxic *E. coli* strains (MOI of 10:1). The 4 *E. coli* strains (Ec4, Ec5, Ec7, and Ec11) that induced osteoblasts lysis after 2 hours of infection were not tested. The Ec6 and Ec12 strains were tested statistically with the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post test. *, $P < 0.05$ *versus* Ec2, Ec9, Ec10, Ec13, Ec14, Ec17, Ec18, or Ec19 ; #, $P < 0.05$ *versus* Ec9, Ec10, Ec13, Ec14, Ec17, Ec18, or Ec19.

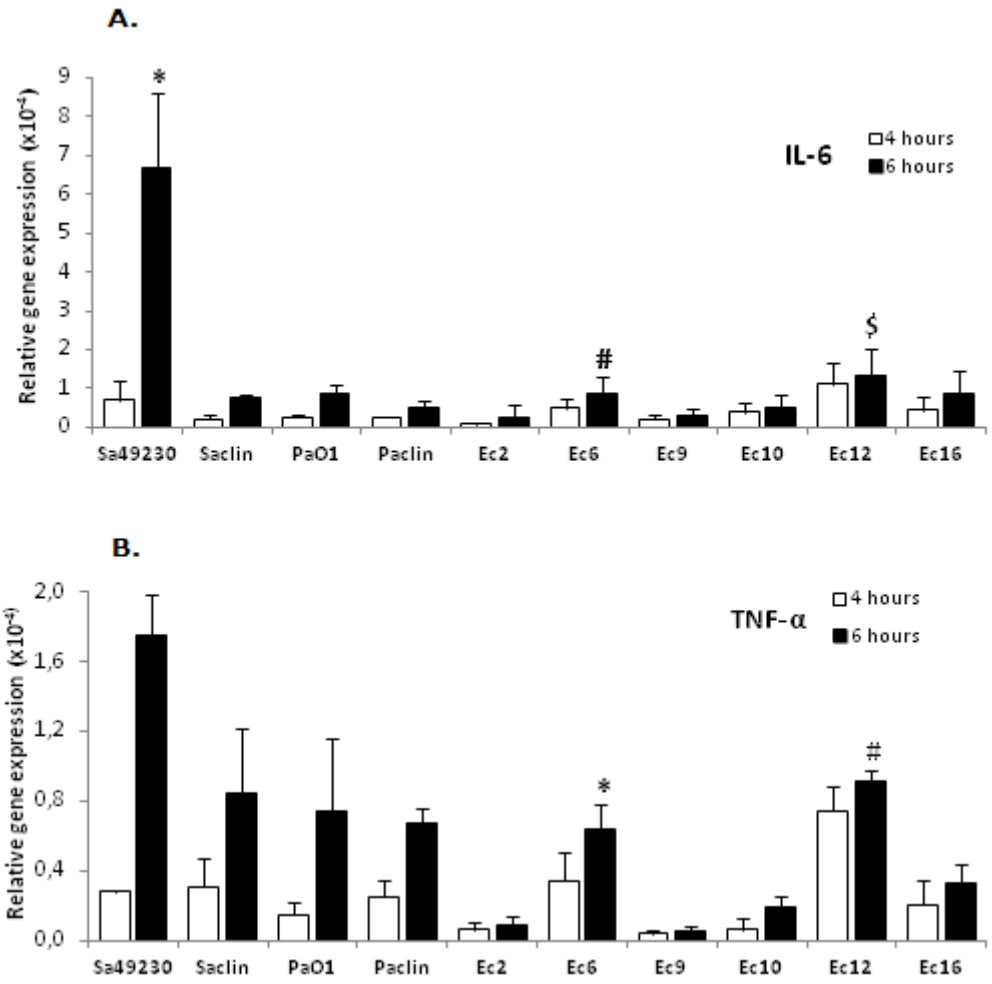


FIG 5 Relative expression of IL-6 and TNF-α mRNAs in MG-63 cells. The cells were infected with the 4 control strains or 6 selected OII *E. coli* strains, for 4 or 6 hours (MOI of 100:1), before total RNA extraction. Results are expressed as relative gene expression after normalization using the β-actin housekeeping gene. (A) IL-6 mRNA expression. The Sa49230, Ec6, and Ec12 strains were tested statistically with the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post test. *, $P < 0.05$ *versus* Saclin, PaO1, Paclin, Ec2, Ec6, Ec9, Ec10, or Ec16 (6 hours of infection) ; #, $P < 0.05$ *versus* Sa49230, Ec2, or Ec9 (6 hours of infection) ; $, $P < 0.05$ *versus* Paclin, Ec2, Ec9, or Ec10 (6 hours of infection). (B) TNF-α mRNA expression. The Ec6 and Ec12 strains were tested statistically with the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post test. *, $P < 0.05$ *versus* Sa49230, Ec2, Ec9, or Ec10 (6 hours of infection) ; #, $P < 0.05$ *versus* Ec2, Ec9, Ec10, or Ec16 (6 hours of infection).

2.3 COMMENTAIRES

2.3.1 ASPECTS METHODOLOGIQUES

Choix des souches

Cette analyse par une approche cellulaire était difficilement applicable à un large panel de souches, nous avons donc été contraints de sélectionner 20 *E. coli* parmi les 30 précédemment étudiés. Afin d'obtenir un échantillonnage plus homogène que le précédent, nous avons retenu les souches issues d'infections ostéo-articulaires sur prothèses de genou ou de hanche, et avons sélectionné, en priorité, les *E. coli* issus d'infections hématogènes et les souches les plus virulentes (13 *E. coli* du groupe phylogénétique B2), en gardant une représentativité de chaque groupe phylogénétique (3 *E. coli* du groupe phylogénétique D, 3 *E. coli* du groupe phylogénétique A, et 1 *E. coli* du groupe phylogénétique B1).

Par ailleurs, le comportement de ces *E. coli* a été comparé à celui d'autres agents pathogènes majeurs des infections ostéo-articulaires (*S. aureus* et *P. aeruginosa*), en incluant deux souches de référence largement employées dans différents modèles (*S. aureus* ATCC 49230 responsable d'une ostéomyélite et *P. aeruginosa* PAO1 initialement isolée d'une plaie), et deux souches cliniques responsables d'IOAM chez des patients hospitalisés au C.H.U. de Nantes. Faute de disponibilité d'une souche clinique de *P. aeruginosa* responsable d'infection sur prothèse de genou ou de hanche, nous avons sélectionné pour cette étude, une souche de *P. aeruginosa* responsable de pseudarthrose septique de jambe sur ostéosynthèse par clou-plaque LCP (Local Compression Plate).

Enfin, deux variants isogéniques, ZKLR^{+} (HlyA^{+}) et Zhly- (Δ*hlyA*), d'une souche de *E. coli* A0 34/86 ont été introduits comme contrôles dans certaines expériences. Cette souche d'origine porcine, dont le génome a largement été étudié, appartient au groupe phylogénétique B2 et porte plusieurs îlots de pathogénicité (PAI II_{536} et PAI III_{536}) habituellement présents chez des *E. coli* uropathogènes (Hejnova *et al*., 2005). Ces caractéristiques faisaient de cette souche et de ses variants, de bons témoins, proches de nos souches cliniques.

Choix de la lignée cellulaire

De par le grand nombre de souches bactériennes testées dans cette étude et la difficulté d'obtention de cultures primaires d'ostéoblastes humains, nous avons décidé d'utiliser pour cette première étude, la lignée ostéoblastique MG-63, dérivée d'un ostéosarcome humain. Les cellules MG-63 ont été décrites comme représentatives d'un stade préostéoblastique (Kartsogiannis *et* Ng, 2004), et utilisées dans plusieurs modèles *ex vivo* d'infections (Delpino

et al., 2009 ; Rasigade *et al*., 2013). Nous avons utilisé des cultures de cellules souches mésenchymateuses humaines (cellules progénitrices des ostéoblastes) pour confirmer les résultats obtenus lors des tests de cytotoxicité. A terme, il serait nécessaire de confirmer l'ensemble des informations obtenues lors de cette étude, sur un modèle de cultures de cellules primaires, de mise au point beaucoup plus délicate.

Conditions d'infection et limites du modèle cellulaire

Les cocultures de bactéries et de cellules eucaryotes sont des techniques très délicates. Elles nécessitent des ajustements variés, à chaque étape de l'analyse, selon les cellules et les bactéries étudiées, ou les techniques mises en œuvre (RT-PCR, ELISA, Western-blot, microscopie, subculture…) pour la mesure des effets investigués (lyse/apoptose cellulaire, adhérence/internalisation bactérienne, libération de cytokines…). Ainsi, les préparations des inocula bactériens ou des tapis cellulaires, les MOIs (multiplicité d'infection), les durées d'incubation, ou l'éventuel traitement antibiotique des cellules infectées, doivent être ajustés pour limiter une potentielle cytotoxicité cellulaire et assurer des conditions optimales d'analyse, proches des conditions réelles. Les protocoles de coculture, disponibles dans la littérature, pour le modèle cellulaire MG-63 et les espèces bactériennes *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Brucella* spp., ou *Mycobacterium tuberculosis*, rapportent des MOI de 1 à 1000, selon les études (MOI de 10 ou 100 pour l'évaluation des capacités d'internalisation de *S. aureus*, selon 5 études) (Wright *et* Friedland, 2002 ; Wright *et* Friedland, 2004 ; Delpino *et al*., 2009 ; Rasigade *et al*., 2013 ; Valour *et al*., 2013). Pour ces différentes raisons, une MOI de 10 a été choisie dans notre étude, pour évaluer la cytotoxicité de nos souches bactériennes, leur adhérence aux cellules MG-63 et l'invasion de ces dernières. Toutefois, cette MOI a dû être ajustée à i) 100, pour quantifier les ARNm (IL-6 et TNF-α) produits par les cellules infectées après 4 et 6 heures d'incubation, puis, ii) 1:100, pour doser les protéines correspondantes dans les surnageants de culture, après 24H00 d'incubation. Nous avons été limités dans nos recherches par des facteurs liés à l'espèce *E. coli* [temps de génération (de doublement) plus court (≈ 20 minutes) que celui de *S. aureus* ou *P. aeruginosa* (≈ 40 minutes), et très faible internalisation bactérienne ne permettant pas l'emploi d'un antibiotique, après 2 heures de coculture, pour limiter la pullulation bactérienne]. Ces facteurs n'ont pas rendu possible l'étude de marqueurs cellulaires contrôlant l'apoptose ou l'ostéoclastogenèse, puisque des incubations prolongées (48 à 72 heures) auraient alors été nécessaires.

2.3.2 RESULTATS

L'étude épidémiologique complémentaire réalisée dans cette étude (typage MLST et O-sérogroupage des 20 souches de *E. coli* sélectionnées), a permis d'identifier 16 Sequence Type (ST) différents et 7 O-sérogroupes habituellement associés aux UPEC. Ces informations épidémiologiques montrent la grande diversité génétique de notre panel et confirment la très probable origine urinaire de la majorité des souches étudiées. Néanmoins, nos données montrent aussi les limites d'une classification basée sur le sérotype, du fait de transferts horizontaux de matériel génétique mobile entre bactéries de sérotypes différents. Le sérogroupe O75, par exemple, a longtemps été associé aux infections urinaires et au sepsis chez l'Homme (Platell *et al*., 2012). Dans notre étude, les gènes de virulence *papGII/papGIII*, *sfa/foc*, *hlyA*, *cnf1*, ou *iucC*, habituellement impliqués dans la physiopathogénèse des infections urinaires, étaient inconstamment présents chez les 4 *E. coli* O75 de notre panel.

Cette étude est la première à mettre en évidence l'importante activité cytolytique de l'alpha-hémolysine HlyA de *E. coli* vis-à-vis de cellules ostéoblastiques MG-63 ou de cellules souches mésenchymateuses humaines. Cette protéine de la classe des toxines à motif RTX (Repeat in ToXin), agit par formation de pores sur la membrane cytoplasmique de différentes cellules cibles (érythrocytes, cellules épithéliales rénales, ou leucocytes), mais perd son activité lytique à faibles concentrations. Les processus de régulation transcriptionnelle de l'opéron *hlyCABD* sont extrêmement complexes et pas encore complètement élucidés (Wiles *et* Mulvey, 2013). L'anti-terminateur transcriptionnel RfaH, en se fixant au niveau de la séquence de consensus *ops* située en amont de l'opéron *hlyCABD*, joue un rôle clé dans la régulation de l'expression de l'alpha-hémolysine, mais d'autres facteurs et mécanismes entrent en jeu (la protéine histone-like H-NS, l'ARNt^{leuX}, le régulateur global FNR…) (Figure 12) (Leeds *et* Welch, 1997 ; Barbieri *et al*., 2014). Nos résultats montrent que le gène *hlyA* ne peut sans doute pas être, à lui-seul, un marqueur prédictif de cytotoxicité ostéoblastique, puisque 25% des *E. coli hlyA*-positifs de notre étude, exprimaient très faiblement ce gène et n'ont pas entrainé de lyse cellulaire après 4 heures de coculture (MOI de 10).

Par ailleurs, un autre gène de virulence, *cnf1*, a été détecté chez 5 des 6 *E. coli* responsables de lyse ostéoblastique dans notre étude. Ce facteur cytotoxique nécrosant est une exotoxine capable de se fixer à différents types cellulaires et d'activer des GTPases Rho cytoplasmiques, entraînant des réarrangements de cytosquelette, des aberrations nucléaires et une augmentation de la production de médiateurs de l'inflammation, favorisant ainsi l'internalisation des bactéries et induisant une apoptose cellulaire (Garcia *et al*., 2013). Le

gène *cnf1* est habituellement situé juste en aval de l'opéron *hlyCABD*, et une co-régulation transcriptionnelle de ces deux facteurs de virulence a été rapportée *via* la zone promotrice *ops* commune (Figure 12) (Landraud *et al*., 2003). Dans notre étude, nous avons effectivement remarqué la faible expression du gène *cnf1* chez la souche non-cytotoxique Ec2, *hlyA*-positive. Cependant, il semblerait que la régulation trancriptionnelle du gène *cnf1* soit plus complexe, car un autre promoteur indépendant a été décrit juste en amont du codon d'initiation de ce gène (Landraud *et al*., 2003). Dans notre étude, les expériences conduites avec les deux variants isogéniques, ZKLR^{+} (HlyA^{+}, Cnf1^{+}) et Zhly- (Δ*hlyA*), ont permis de confirmer le rôle majeur de l'alpha-hémolysine dans la lyse rapide des cellules ostéoblastiques, néanmoins il aurait pu être intéressant d'introduire un troisième variant (Δ*cnf1*) afin d'exclure de façon certaine, un effet cytolytique direct de l'exotoxine CNF1 (cette analyse n'a pas été effectuée puisque nous ne disposions pas du mutant en question). Il aurait également été intéressant d'évaluer les conséquences indirectes à plus long terme, des facteurs de virulence HlyA et CNF1, lorsque produits à concentrations sublytiques, mais l'étude de processus apoptotiques notamment, n'a pas été possible dans nos conditions expérimentales.

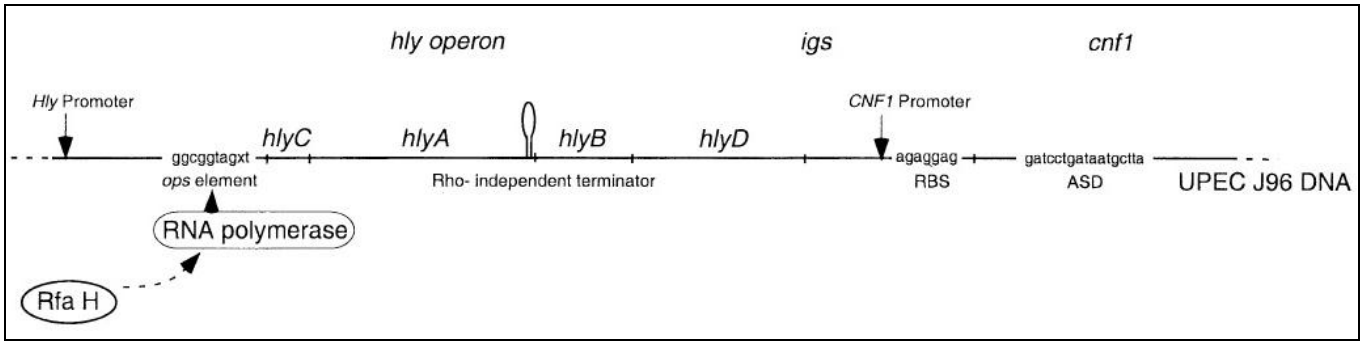


Figure 12 : Schéma de l'opéron *hlyCABD* et du gène *cnf1* (UPEC J96) (Source : Landraud *et al*., 2003).

L'autre information importante de cette étude est la faible adhérence et très faible internalisation des *E. coli* issus d'IOAMs, dans les cellules ostéoblastiques MG-63. L'internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes repose sur un processus passif qui s'apparente à un phénomène de phagocytose. Seule la présence d'adhésines membranaires de la famille des MSCRAMMs, capables de lier les protéines de la matrice extracellulaire, est nécessaire et indispensable à l'internalisation des staphylocoques par la cellule hôte (Wright *et* Nair, 2010). Des adhésines capables de lier des protéines de la matrice extracellulaire

(fibronectine, laminine), ont été décrites chez *E. coli* (Henderson *et al*., 2011). Récemment, une étude a montré que, comme les souches de *S. aureus* adhérentes aux ostéoblastes, les *E. coli* entéroaggregatifs (EAEC) responsables de diarrhées, adhèrent au complexe fibronectine/intégrine α5β1 à la surface de l'épithélium intestinal par l'intermédiaire de *fimbriae* AAF/II portant l'adhésine AafA (Izquierdo *et al*., 2014). Des adhésines UpaG capables de se fixer à la fibronectine et à la laminine ont également été décrites chez les UPEC (Valle *et al*., 2008). Ainsi, il serait sans doute intéressant de rechercher ces deux adhésines chez les *E. coli* de notre panel. Toutefois, parmi les facteurs de virulence étudiés chez nos souches, figurent : i) la protéine Tsh dont l'affinité pour la fibronectine et le collagène IV a été rapportée par Kostakioti *et al* chez des *E. coli* pathogènes aviaires (Kostakioti *et al*., 2004), et ii) les fibres amyloïdes curli, capables de lier la fibronectine, la laminine et d'autres protéines plasmatiques comme le plasminogène. Aucun des 20 *E. coli* de notre panel ne portait le gène *tsh*, tandis que le gène *csgA*, impliqué dans la synthèse des curli, était détecté chez toutes les souches étudiées. La transcription des gènes codant pour la formation des curli obéit à une régulation complexe et est sensible à de nombreux paramètres environnementaux, comme l'osmolarité, la température, ou la phase de croissance bactérienne (Barnhart *et* Chapman, 2006). Ainsi, il est possible que nos résultats expérimentaux ne soient pas le reflet exact de ce qui se passe lors d'une infection ostéo-articulaire. Il aurait sûrement été intéressant de comparer l'expression du gène *csgA* chez les *E. coli* les plus et les moins adhérents aux ostéoblastes, mais les conditions expérimentales choisies pour étudier l'adhérence des 20 *E. coli*, n'étaient pas optimales pour extraire de l'ARN bactérien.

Enfin, nous souhaitions investiguer si les *E. coli* responsables d'IOAMs peuvent induire, par action directe sur les ostéoblastes, les mêmes phénomènes pro-inflammatoires et d'activation de l'ostéoclastogénèse que ceux décrits pour *S. aureus*, dans le même contexte. Le remodelage osseux est régulé par différents facteurs systémiques et locaux. Il dépend en partie du rapport entre deux facteurs sécrétés par les ostéoblastes : RANK-L, principal stimulateur des ostéoclastes, et l'ostéoprotégérine (OPG), qui en se liant à RANK-L, empêche sa fixation au récepteur RANK à la surface des ostéoclastes, et neutralise ainsi son effet stimulateur. Plusieurs auteurs ont montré, que l'interaction de *S. aureus* avec les ostéoblastes stimule la synthèse locale de prostaglandine E2 et de RANK-L, et donc la résorption ostéoclastique (Somayaji *et al*., 2008 ; Yoon *et al*., 2012 ; Sanchez *et al*., 2013). Ces mêmes effets ont été décrits par d'autres auteurs, après stimulation des ostéoblastes par 1µg/mL de LPS de *E. coli* (Suda *et al*., 2004). Nous aurions souhaité pouvoir déterminer si ce phénomène

était reproduit avec des souches cliniques de *E. coli*. Malheureusement, lors de nos essais, les niveaux d'expression des ARNm RANK-L dans les cellules MG-63 infectées (*S. aureus* ou *E. coli*, MOI de 100) étaient très faibles après 6 heures de coculture. Toutefois, comparativement aux cellules non infectées, une augmentation non significative du niveau d'expression de RANK-L était observée lors de cocultures MG-63/*S. aureus* ATCC 49230. Nous n'avons pas poursuivi ces recherches qui auraient nécessité des incubations prolongées, d'autres auteurs ayant montré une surexpression de RANK-L après 24 heures de coculture (Sanchez *et al*., 2013).

La sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires par les ostéoblastes, est la première étape de la cascade d'évènements aboutissant au déclenchement de la résorption osseuse (Wright *et* Nair, 2010). Nous avons donc porté nos recherches sur l'étude de l'expression de diverses cytokines (IL-1β, IL-6, IL-12, IL-34, TNF-α) par les cellules ostéoblastiques infectées ou non. Après divers essais, nous avons fait le choix de cibler notre travail sur les cytokines les plus surexprimées par les cellules MG-63 infectées, à savoir l'IL-6 et le TNF-α, déjà très étudiés dans le cadre d'infections à *S. aureus* (Wright *et* Nair, 2010). Comme précédemment rapporté (Ning *et al*., 2011 ; Wright *et* Nair, 2010), nous avons observé une hyperexpression des gènes codant pour l'IL-6 et le TNF-α, et la libération d'IL-6 dans les surnageants de culture lorsque les cellules MG-63 étaient infectées par la souche de référence *S. aureus* ATCC 49230, validant ainsi notre modèle. Toutefois, nous avons pu constater que les taux d'IL-6 étaient indétectables dans les surnageants des cellules infectées par la seconde souche de *S. aureus* de notre étude. Ces résultats montrent que les conclusions issues de recherches fondamentales basées sur l'étude d'une souche bactérienne de référence, doivent être interprétées avec précaution et méritent des vérifications à l'aide de plusieurs souches cliniques. Par ailleurs, la sécrétion de TNF-α était très faible, sous le seuil de détection par technique ELISA, quelles que soient les bactéries infectantes, mais ce phénomène était attendu, car déjà rapporté par d'autres auteurs (Wright *et* Nair, 2010 ; Scian *et al*., 2011). Nous montrons ici, que, parmi les *E. coli* issus d'IOAM étudiés, les souches les plus adhérentes aux ostéoblastes présentent les mêmes propriétés pro-inflammatoires que des souches de *S. aureus* ou *P. aeruginosa*, isolées dans le même contexte. Néanmoins, il semble évident que d'autres paramètres que l'adhérence/internalisation des souches, comme par exemple la production de facteurs de virulence spécifiques, pourraient jouer un rôle déterminant dans l'induction de cette réponse cytokinique. La souche de *S. aureus* ATCC 49230, par exemple, était moins internalisée dans les cellules ostéoblastiques MG-63 que

l'autre souche de *S. aureus*, mais était sans doute plus virulente. De même, bien que nous n'ayons pas pu le vérifier, il est très probable que la cytolyse ostéoblastique induite par les souches de *E. coli* productrices d'alpha-hémolysine, était accompagnée d'une libération de cytokines.

Points importants :

- Très fort potentiel cytotoxique des souches de *E. coli* productrices d'alpha-hémolysine (HlyA) vis-à-vis des cellules ostéoblastiques.
- Très faible internalisation des souches non-cytotoxiques de *E. coli* dans les cellules ostéoblastiques.
- Les souches de *E. coli* les plus adhérentes aux cellules ostéoblastiques induisent les mêmes réponses cytokiniques ostéoblastiques (ARNm IL-6 et TNF-α), que des souches de *S. aureus* ou *P. aeruginosa* isolées dans le même contexte clinique.

3 ETUDE DE LA RESISTANCE DE SOUCHES DE *E. COLI* ISOLEES D'IOAMs A L'ACTIVITE BACTERICIDE DU SERUM ET DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

3.1 PRESENTATION

Ce travail de recherche s'appuie sur les résultats des deux études précédentes suggérant qu'une grande partie des IOAMs à *E. coli* pourrait être secondaire à des infections urinaires, probablement par le biais d'une diffusion hématogène. Ainsi, les souches de *E. coli* isolées d'IOAMs pourraient avoir déployé diverses stratégies pour échapper à la réponse immunitaire innée systémique, infecter secondairement le tissus osseux et le matériel, et résister aux défenses immunes innées locales malgré une faible internalisation dans les ostéoblastes.

L'objectif de cette étude était de déterminer si les *E. coli* responsables d'IOAMs présentaient une capacité particulière à résister à l'activation en cascade du système du complément et à la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles, premières lignes de défenses immunitaires innées contre l'infection.

Ainsi, dans le cadre ce travail, nous avons étudié l'activité bactéricide du sérum vis-à-vis des 20 souches de *E. coli* sélectionnées dans l'étude précédente (*Article 2*) et de 20 souches de *E. coli* "contrôle" isolées de bactériémies chez des patients porteurs de prothèses articulaires. Nous avons secondairement investigué les mécanismes impliqués dans la résistance bactérienne à l'action lytique du sérum. Nous nous sommes également intéressés à l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles et à la lyse de ces cellules par certaines souches de *E. coli*.

3.2 METHODES ET RESULTATS

Crémet L, Broquet A, Jacqueline C, Chaillou C, Asehnoune K, Corvec S, Caroff N. Innate immune evasion of *Escherichia coli* clinical strains from orthopedic implant infections. *A soumettre*

Innate immune evasion of *Escherichia coli* clinical strains from orthopedic implant infections

Lise Crémet[1-2], Alexis Broquet[1], Cédric Jacqueline[1], Chloé Chaillou[1], Karim Asehnoune[1-3], Stéphane Corvec[1-2], and Nathalie Caroff[1#]

[1]*Université de Nantes, UFR de Médecine, EA3826, Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections, 1 rue G. Veil, F-44000 Nantes, France*
[2]Pôle de Biologie, Service de Bactériologie-Hygiène, CHU de Nantes, France
[3]*Pôle Anesthésie Réanimation, Service d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale, CHU de Nantes, France*

Abstract

E. coli is one of the first causes of Gram-negative orthopedic implant infections (OII). Those infections, usually hematogenous, mostly originate from the urinary tract. We investigated the strategies developed by *E. coli* in this context to evade host innate immune responses, i.e. complement and polymorphonuclear neutrophils (PMNs). Twenty strains from OII were compared with 20 strains from bacteremia in patients with non-infected orthopedic implant. In both groups, 6/20 (30%) strains lysed PMNs, due to the production of the pore-forming toxin α-hemolysin (HlyA). For the others, resistance to phagocytic killing by PMNs was not significantly different between both groups. In contrast, resistance to complement-mediated serum killing was significantly higher in OII strains than in the others (65% *vs* 10%; *P* <0.001). In *E. coli*, different mechanisms have been involved in complement resistance. Here, serum resistance was not linked to a group 2 capsule, or a loss of outer membrane permeability, or the recruitment of the complement inhibitor C4bp, but was significantly associated with the synthesis of long-chain LPS, regardless of the O-antigen. Thus, serum resistance could promote seeding of peri-implant tissues by helping *E. coli* to either, persist in blood and reach the site of infection, or overcome localized complement activation.

Keywords: *Escherichia coli*, complement, polymorphonuclear, killing

Introduction

Orthopedic implant infections (OII) are one of the most dreaded complications in orthopedic surgery. Their incidence remains currently low (1 to 2%), but has been estimated to increase with the boom of prosthetic joint implantations, as the population ages [1, 2]. Acute hematogenous infections account for approximately 35% of all OII [1, 3]. However, this rate is often underestimated, especially in clinical observational studies not long enough to respond to the full definition of hematogenous infections (i. e. infections manifesting for more than 2 years following implantation after a previous uneventful course, or infections that occur following an episode of documented bacteremia or an infection at a distant focus) [1, 3]. *Staphylococcus aureus* bacteremia is the first cause of distant implant seeding, but according to the study of Bouvet *et al*., the proportion of Gram-negative bacilli after 2 years post-implantation is higher than the proportion of Gram-positive bacteria [1, 3].

Gram-negative bacilli are implicated in 10 to 23% of all OII and *Escherichia coli* is the first cause of Gram-negative OII [3, 4]. This bacterium, known as a harmless commensal of the gut flora, also causes various infections, the most common ones being urinary tract infections (UTI). Uropathogenic *E. coli* (UPEC), characterized by their ability to colonize and damage the urinary tract, or evade innate immune responses, through specific sets of virulence determinants (e. g. adhesins, flagella, capsule, iron uptake systems, or toxins), cause more than 80% of all UTI, and are also a major cause of bacteremia [5, 6, 7]. These bacteremic UTI can be complicated by distant infections, such as secondary abscess, osteomyelitis, or septic arthritis [7]. As a matter of fact, urinary infection is a well-recognized risk factor for hematogenous prosthetic joint infections, whereas recent studies found no evidence of such relation with asymptomatic bacteriuria [8]. Accordingly, in a previous study, we showed that a large number of *E. coli* recovered from peri-implant tissues shared many similarities with UPEC, and the urinary tract was the most frequent source of infection in our patients [9]. However, this earlier study failed to find very specific combinations of virulence factors associated with OII [9].

In this study, we aimed to determine if an enhanced ability to circumvent host innate immune defenses, could lend *E. coli* effective at seeding peri-implant tissues. Thus, we compared the resistance to serum complement-mediated killing and to opsonophagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils (PMN) of 20 well-characterized OII *E. coli* strains [2] and 20 *E. coli* control strains from bacteremia not complicated by subsequent implant seeding (blood panel), and investigated mechanisms potentially involved in *E. coli* innate immune evasion.

Results and discussion

Characterization of the *E. coli* strains from both panels

The retrospective review of the 40 patient's records and the molecular analysis of the different *E. coli* strains revealed that UTI was a common finding among both panels. A high frequency of O-serotypes preferentially associated with UPEC, was documented in the strains of both panels [15/20 (75%) in the OII panel and 14/20 (70%) in the blood panel], and group 2 capsular polysaccharides, also mostly associated with UPEC, were highly prevalent in each panel [16/20 (80%) in the OII panel and 14/20 (70%) in the blood panel] (Table 1). UTI was the most common presumed source of infection in both panels [15/20 (75%) in the blood panel and 10/20 (50%) in the OII panel, taking into consideration that the source of OII was not investigated in 7 cases] (Table 1). Finally, 10/20 (50%) OII were considered as hematogenously acquired, according to the definition of Zimmerli *et al* [1].

OII *E. coli* and *E. coli* from bacteremia have the same ability to circumvent killing by PMNs

PMNs are endowed with an array of toxic weapons highly effective at killing most bacteria. However, some pathogens, including many UPEC, employ various strategies to inhibit PMNs migration and function [5, 10, 11]. Accordingly, we found in each panel of the study, that 30% (6/20) of the strains induced PMNs lysis *in vitro*. The cytolytic effect was significantly associated with the detection of two virulence genes by PCR, i.e. alpha-hemolysin (*hlyA*) and cytotoxic necrotizing factor 1 (*cnf1*) ($P < 0.001$; Fisher's exact test) (Table 1). Both virulence factors, often associated in approximately one third of UPEC, are commonly linked with hemorrhagic UTI, and known to promote bacterial invasion of the bladder and kidneys tissues and to modulate host inflammatory responses [5, 11]. CNF1 mediates uroepithelial cells apoptosis, and reduce PMNs phagocytosis through targeting Rho-family GTPases [5, 11]. At high concentrations, the pore-forming toxin HlyA can trigger rapid epithelial cells lysis, while sublytic concentrations affect host cell signaling pathways [5, 11]. We recently demonstrated that 6 HlyA-producing strains of the OII panel (Ec3, Ec4, Ec5, Ec7, Ec8 and Ec11) were highly cytotoxic toward human osteoblastic cells *in vitro*, while when the *hlyA* gene was very slightly expressed (strains Ec2 and Ec15) or absent, no osteoblast lysis was observed [2]. Results presented here (Table 1, Supporting information Fig. 1A-F) show that HlyA-producing *E. coli* also induce PMNs lysis *in vitro*. These data are consistent with those of Russo *et al*. who found by studying one extraintestinal pathogenic strain of *E. coli* and its isogenic derivatives, that HlyA, but not CNF1, mediated PMNs lysis/necrosis [12].

Finally, we sought to determine whether the non-cytolytic strains from OII were more resistant to killing by PMNs than those from bacteremia. After 1 hour of co-culture with PMNs, less than one third of the strains of both panels were efficiently killed (viable bacteria < 50%). No significant difference in survival was found between both panels (Table 1, Fig. 1A). These findings were not surprising, since most of the infections originated from the urinary tract, and since it is now well-established that virulence of UPEC lies in part, in their ability to subvert the antimicrobial properties of PMNs in the urinary tract [5, 10].

OII *E. coli* are more serum resistant than *E. coli* from bacteremia

An ability to escape serum complement-mediated killing is another important determinant of *E. coli* pathogenicity during both localized and systemic infections, and has been proposed to contribute to the pathogenic success of the dominant *E. coli* ST131 clonal lineage [7]. Our data suggest that this property could promote seeding of peri-implant tissues. In fact, we show that 65% of our OII strains were resistant to serum killing (3 grades 5 and 10 grades 6), whereas only 10% of the *E. coli* strains from blood were categorized as serum-resistant (1 grade 5 and 1 grade 6) (Table 1, Fig. 1B). The sensitive strains were fully resistant to heat-inactivated serum (data not shown), demonstrating that killing was indeed complement-mediated.

Such a difference between both panels was somewhat unexpected, firstly because strains from blood were chosen to resemble the OII strains in term of virulence, and secondly because several reports stated that *E. coli* should avoid complement attack to survive in the blood [7, 13-16]. However, few recent studies of large clinical cohorts corroborate this last point [16]. Hughes *et al*., and Devine *et al*., reported about 20% of serum-resistant strains among hundreds of UPEC, under the same experimental conditions as ours [17, 18]. In fact, several technical factors could influence results of serum bactericidal assays, and a lower amount of serum (20-60%) and/or shorter incubation times might lead to overestimate serum resistance in some studies [6, 13-15, 19]. Thus, overall, our data underscore the peculiar tolerance of the OII *E. coli* against the first line of defense of the host innate immune system induced by non-self surfaces (e.g. bacteria or biomaterials).

Serum resistance of OII *E. coli* lies on varied complement evasion strategies

In *E. coli*, multiple strategies have been described to block complement activation or control complement cascade on self surfaces [6, 7, 13-19]. Most of these

mechanisms are closely tied to the bacterial envelope [6, 7, 16]. Thus, certain types of group 2 capsular antigens (K1 and K2) or an additional colanic acid capsule, several O-antigen serotypes (for example, O1, O6, and O18) or lipopolysaccharide (LPS) containing long O-polysaccharide chains, or specific proteins affecting outer membrane permeability (TraT, Prc, outer membrane proteins (OMPs)) or interacting with the complement inhibitor C4bp (C4b-binding protein) (OmpA, NlpI), might confer protection against complement killing [6, 7, 13-16]. It is however noteworthy that a number of important insights gained over the last years about complement evasion strategies, are issued from studies of deletion mutants derived from prototypic *E. coli* (CFT073, RS218, EC958) [6, 7, 13-16]. The strength of the inhibitory effect of several factors against complement-mediated killing, remains to be confirmed in a wider range of clinical strains of different lineages, since serum-resistance appears to be resolutely multifactorial.

In our study (see Table 1), as previously shown by Phan *et al.* [7], neither the K1 capsular antigen, nor a group 2 capsular antigen was found to provide a survival advantage in serum (56% of the strains with a group 2 K-antigen were serum-sensitive). Similarly, while the O1-antigen was found to be protective by Sarkar *et al*. [6], the largest proportion of our O1 strains (44%) was categorized as serum-sensitive. Reduced serum survival was also mostly not due to damaged outer membranes, since under environmental stress conditions, like high salt concentrations (NaCl) or osmotic stress (SDS), serum-sensitive strains did not show significantly lower MICs than serum-resistant strains. Additionally, the outer membrane lipoprotein TraT, known to inhibit the membrane attack complex [16], was more prevalent in serum-sensitive *E. coli* (67% of *traT*-positive strains) than in the serum-resistant ones (47%). Furthermore, while the periplasmic protease Prc had been demonstrated to change OMPs profiles when inactivated [14], further analysis of 6 serum-sensitive (EcI, EcJ, EcK, EcL, EcM, Ec13) and 5 serum-resistant (Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec8) strains of our study, did not reveal a reduced expression of the *prc* gene in the 6 serum-sensitive strains (Supporting information Fig. 2), and no inactivating mutation was found in the Prc active site of these strains (data not shown). This further analysis also failed to demonstrate the protective role of C4bp deposition on the bacteria. Thus, although there were differences in C4bp binding between the 11 strains, serum resistance did not positively correlate with C4bp deposition levels (Supporting information Fig. 3).

Long-chain LPS (35-60 kD) was the only bacterial factor significantly associated with serum resistance, regardless of the O-antigen (100% of serum-resistant strains with long-chain LPS *vs* 56% of serum-sensitive strains with long-chain LPS; *P*=0.0036, Fisher's exact test) (Table 1, Supporting information Fig. 4). The critical role of this factor in serum resistance had already been underlined in several studies [7, 16]. Here, the strains Ec1 and Ec13, with long- and short-chain LPS, respectively, showed similar mouse lethalities after intraperitoneal injection (data not shown). Thus, long-chains LPS did not appear to contribute to virulence *in vivo*, and alone did not explain the difference in serum resistance observed between both panels.

Concluding remarks

Jointly, our results highlight the formidable subversive capacities of OII *E. coli* against two major components of the innate immune response. While, evasion to PMNs-mediated killing contributes to UPEC pathogenesis in the urinary tract, this survival advantage could promote bacteremia and complications, like OII, and the pore-forming toxin HlyA appeared in our study, as an essential attribute of *E. coli* to lyse PMNs. Our findings further suggested that resistance to serum complement-mediated killing would provide an important advantage for establishing OII. We encountered difficulties in finding bacterial determinants mediating complement resistance among the numerous previously described, even though the critical role of long-chain LPS was confirmed here. Thus, OII *E. coli* probably employ a redundancy of factors to survive to complement attack and reach a high bacterial load for subsequent implant seeding, but we cannot exclude the involvement in serum resistance of a still undetermined component of the bacterial envelope, that could contribute to the physiopathological process of OII.

Materials and methods

Bacterial strains

A well-characterized panel [2] of 20 clinical *E. coli* strains (Ec1 to Ec20) involved in hip (14 strains) or knee (6 strains) OII was compared with 20 clinical strains of *E. coli* (EcA to EcT) from bacteremia in patients with non-infected knee or hip prostheses (Table 1). Blood strains (EcA to EcT) were randomly selected to match on their phylogenetic group with the OII strains, thereby giving comparable panels in terms of virulence potential (13 group B2, 3 group D, 3 group A, and 1 group B1 per panel). The strains were investigated by PCR for the most common O-serotypes of UPEC, group 2 capsule with in particular K1 and K2 variants, and 3 virulence factors (*traT*, *hlyA*, *cnf1*) potentially contributing to serum resistance or cytotoxicity.

Isolation of human PMNs

PMNs were isolated from fresh heparinized venous blood of healthy consenting volunteers by 6% dextran (Sigma) sedimentation and ficoll density gradient (Lymphocyte Separation Medium 1077, PAA) centrifugation (2500 x *g* for 3 min). The pelleted cells were treated with cold 0.83% ammonium chloride for lysis of residual erythrocytes, and washed two times with sterile Phosphate-Buffered Saline (PBS) containing 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). PMNs extracts were checked for purity (>95%), and counted in an automated hematological analyzer Sysmex XS-800i.

***E. coli*-induced PMN lysis experiments**

Experiments were performed as previously described [10], with some modifications. Bacteria were opsonized for 30 min at 37°C with 10% heat-inactivated pooled normal human serum and combined with 10^5 PMNs at a multiplicity of infection (MOI) of 1:1 in 24-well culture plates containing RPMI 1640 (Lonza). The plates were centrifuged at 300x*g* for 5 min to synchronize infection and allowed to incubate at 37°C in 5% CO2 for 2 hours. PMNs lysis was visualized by light microscopy, after cytocentrifugation and Gram staining. Two independent experiments were performed in duplicate for each strain.

PMN bactericidal assays

As for PMN lysis experiments, bacteria were opsonized and combined either with PMNs (MOI of 1:1) or without cells (reference sample). After 1 hour of incubation, a PMNs lysis solution was added in all wells (Triton X-100 at a final concentration of 0.1%), and lysates were serially diluted and plated on Tryptic Soy Agar (TSA) plates. The bactericidal activity of PMNs was expressed as the percentage of viable bacteria after exposition to PMNs compared to the reference sample. Two independent experiments were performed in duplicate for each strain.

Serum bactericidal assays

A pooled normal human serum (NHS) collected from 10 healthy consenting volunteers was kept frozen at -80°C in aliquots, and used for each assay. Bacteria from logarithmic-phase cultures adjusted to 10^6 CFU/mL were mixed at a 1:3 vol/vol ratio with NHS. Viable bacteria were counted by plating dilutions on TSA plates after 0, 1, 2, and 3 h of incubation at 37°C. Responses were graded from 1 to 6, as previously described [17]. Strains were categorized as sensitive [all counts < 100% of the inoculum, i.e. grades 1 (1-hour count < 10%) and 2 (1-hour count between 10% and 100%)], intermediate [1-hour count > 100% and 3-hours count < 100%, i.e. grades 3 (2-hours count < 100%) and 4 (2-hours count > 100%)] or resistant [3-hours count > 100%, i.e. grades 5 (count falling at 3-hours) and 6 (progressive rise at each hourly interval)] to NHS. Each strain was tested three times.

NaCl and SDS sensitivity assays

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of SDS and NaCl were determined by broth microdilution method as previously described [7].

LPS analysis

LPS was isolated by a hot water-phenol extraction method as described previously [20]. Samples were separated by SDS-PAGE and then silver-stained.

Acknowledgments

We thank Dr J. Holubova and Pr P. Sebo (Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens, Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic) for kindly providing the ZKLR$^+$ and Zhly- *E. coli* control strains used in this study, and Pr S. Bonacorsi (Laboratory of Microbiology, Robert-Debré hospital, AP-HP, Paris, France) for serotyping of a part of the *E. coli* isolates.

Conflicts of interest

This work was supported by internal funding.

References

1 **Zimmerli, W.,** Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J. Inter. Med.* 2014. **276:** 111-119.

2 **Crémet, L., Broquet, A., Brulin, B., Jacqueline, C., Dauvergne, S., Brion, R., Asehnoune, K., et al.,** Interaction of *Escherichia coli* clinical strains with human osteoblastic cells: low invasion but high cytolytic potential of HlyA-producing strains. *PLoS One.* 2014.

3 **Bouvet, C., Tchernin, D., Seirafi, M., Stern, R., Lew, D., Hoffmeyer, P. and Uçkay, I.,** No need to search for the source of haematogenous arthroplasty infections. *Swiss Med. Wkly.* 2011. **141:** w13306.

4 **Rodriguez-Pardo, D., Pigrau, C., Lora-Tamayo, J., Soriano, A., Del Toro, M. D., Cobo, J., Palomino, J., et al.,** Gram-negative prosthetic joint infection: outcome of a debridement, antibiotics, and implant retention approach. A large multicenter study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014. Epub ahead of print.

5 **Ulett, G.C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A.J., Sweet, M.J. and Schembri, M.A.,** Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 2013. **16**: 100-107.

6 **Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D. and Schembri, M. A.,** Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2014. **9**: e94786.

7 **Phan, M. D., Peters, K. M., Sarkar, S., Lukowski, S. W., Allsopp, L. P., Moriel, D. G., Achard, M. E. S., et al.,** The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. *PLoS Genet.* 2013. **9**: e1003834.

8 **Sousa, R., Munoz-Mahamud, E., Quayle, J., Dias da Costa, L., Casals, C., Scott, P., Leite, P., et al.,** Is

asymptomatic bacteriuria a risk factor for prosthetic joint infection ? *Clin. Infect. Dis.* 2014. **59**: 41-47.

9 **Crémet, L., Corvec, S., Bémer, P., Bret, L., Lebrun, C., Lesimple, B., Miegeville, A.F., et al.,** Orthopædic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains. *J. Infect.* 2012. **64**: 169-175.

10 **Loughman, J. A. and Hunstad, D. A.,** Attenuation of human neutrophil migration and function by uropathogenic bacteria. Microbes Infect. 2011. **13:** 555-565.

11 **Garcia, T. A., Ventura, C. L., Smith, M. A., Merrell, D. S. and O'Brien, A. D.,** Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infect. Immun*. 2013. **81:** 99-109.

12 **Russo, T. A., Davidson, B. A., Genagon, S. A., Warholic, N. M., Macdonald, U., Pawlicki, P. D., Beanan, J. M., et al.,** *E. coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis *in vitro* and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005. **289**: L207-L216.

13 **Tseng, Y. T., Wang, S. W., Kim, K. S., Wang, Y. H., Yao, Y., Chen, C. C., Chiang, C. W., et al.,** NlpI facilitates deposition of C4bp on *Escherichia coli* by blocking classical complement-mediated killing, which results in high-level bacteremia. *Infect. Immun*. 2012. **80:** 3669-3678.

14 **Wang, C. Y., Wang, S. W., Huang, W. C., Kim, K. S., Chang, N. S., Wang, Y. H., Wu, M. H. and Teng, C., H.,** Prc contributes to *Escherichia coli* evasion of classical complement-mediated serum killing. *Infect. Immun.* 2012. **80**: 3399-3409.

15 **Miajlovic, H., Cooke, N. M., Moran, G. P., Rogers, T. R. F. and Smith, S. G.,** Response of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* to human serum reveals a protective role for Rcs-regulated exopolysaccharide colonic acid. *Infect. Immun.* 2014. **82**: 298-305.

16 **Miajlovic, H. and Smith, S. G.,** Bacterial self-defense: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. **354**: 1-9.

17 **Hughes, C., Phillips, R. and Roberts, A. P.,** Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect. Immun.* 1982. **35**: 270-275.

18 **Devine, D. A. and Roberts, A. P.,** K1, K5 and O antigens of *Escherichia coli* in relation to serum killing *via* the classical and alternative complement pathways. *J. Med. Microbiol.* 1994. **41:** 139-144.

19 **Debnath, I., Northon, J. P., Barber, A. E., Ott, E. M., Dhakal, B. K., Kulesus, R. R. and Mulvey, M. A.,** The Cpx stress response system potentiates the fitness and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2013. **81**: 1450-1459.

20 **Grozdanov, L., Zähringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y. A., Schombel, U., et al.,** A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* 2002. **184:** 5912-5925.

Table 1. Characteristics of the *E. coli* strains investigated in this study.

Isolate	Type of infection[a]	Positive blood cultures	Presumed source of infection[b]	Phylo-genetic group	Sero-type[c]	Virulence genes				Serum[e]	LPS[f]	SDS MIC (%)	NaCl MIC (M)	PMN killing, % viable bacteria (mean ± SD)
						K antigen[d]	*traT*	*hlyA*	*cnf1*					
OII *E. coli*														
Ec1	**Late**	Yes	**Urinary tract**	B2	O2	K1	+	-	-	**6**	LC	0.125	1	79.94 ± 5.93
Ec2	**Late**	-	**Urinary tract**	B2	O75	K1	-	+	+	**6**	LC	0.125	1	62.70 ± 7.90
Ec3	**Late**	Yes	**Urinary tract**	B2	O75	Group 2	-	+	+	**6**	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
Ec4	Delayed	-	**Urinary tract**	B2	-	Group 2	-	+	+	**6**	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
Ec5	**Late**	Yes	**Urinary tract**	B2	O2	K1	-	+	+	**6**	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
Ec6	**Late**	-	**Urinary tract**	B2	O75	Group 2	-	-	-	**6**	LC	0.063	0.6	48.70 ± 8.14
Ec7	Early	-	Not searched	B2	-	Group 2	-	+	+	**6**	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
Ec8	Early	-	**Urinary tract**	B2	O6	Group 2	-	+	-	**6**	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
Ec9	Delayed	-	Not searched	B2	O75	Group 2	-	-	-	**6**	LC	0.125	1	92.92 ± 1.73
Ec10	Early	-	Unknown	B2	O1	K1	+	-	-	**5**	LC	0.125	1	79.84 ± 9.01
Ec11	Delayed	-	Not searched	B2	O2	K1	-	+	+	4	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
Ec12	Early	-	Not searched	B2	O4	Group 2	-	-	-	2	LC	0.125	1	46.80 ± 9.40
Ec13	Delayed	-	**Urinary tract**	B2	O1	K1	+	-	-	1	**LA**	0.250	1	82.74 ± 2.10
Ec14	Early	Yes	**Urinary tract**	D	O1	-	+	-	-	**6**	LC	0.125	1	52.71 ± 9.66
Ec15	**Late**	-	**Urinary tract**	D	O2	Group 2	+	+	-	**5**	LC	0.063	1	81.05 ± 8.41
Ec16	Delayed	-	Not searched	D	-	K1	-	-	-	4	LC	0.125	1	82.47 ± 9.90
Ec17	Early	Yes	Unknown	A	-	K2	+	-	-	**5**	LC	0.063	0.8	68.12 ± 7.58
Ec18	**Late**	-	Not searched	A	O8	-	-	-	-	2	LC	0.063	1.2	74.64 ± 6.19
Ec19	Delayed	-	Unknown	A	-	-	+	-	-	1	**LA**	0.063	1.2	79.43 ± 6.43
Ec20	**Late**	-	Not searched	B1	O21	-	-	-	-	1	**LA**	0.125	1	75.98 ± 5.33
Blood *E. coli*														
EcA	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O1	K1	+	-	-	**5**	LC	0.063	1	78.50 ± 3.21
EcB	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O1	K1	+	-	-	4	LC	0.125	1	43.17 ± 2.25
EcC	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O4	Group 2	-	+	+	4	LC	0.063	1.2	**PMN Lysis**
EcD	n/a	Yes	Unknown	B2	-	Group 2	-	+	+	3	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
EcE	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O4	-	-	+	+	3	LC	0.125	1	**PMN Lysis**
EcF	n/a	Yes	Abscess	B2	O1	K1	+	-	-	3	LC	0.125	1	56.74 ± 10.05
EcG	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O16	K1	+	-	-	2	LC	0.063	1	98.94 ± 3.07
EcH	n/a	Yes	Biliary tract	B2	O25	Group 2	+	-	-	2	LC	0.125	1	91.25 ± 2.42
EcI	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O16	K1	+	+	-	1	LC	0.063	1	**PMN Lysis**
EcJ	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O1	K1	+	-	-	1	**LA**	0.125	1	90.18 ± 3.42
EcK	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O75	Group 2	-	-	-	1	**LA**	0.031	0.4	38.00 ± 7.05
EcL	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O83	Group 2	-	+	+	1	**LA**	0.125	1	**PMN Lysis**
EcM	n/a	Yes	**Urinary tract**	B2	O1	K1	-	-	-	1	LC	0.125	1	35.88 ± 8.55
EcN	n/a	Yes	**Urinary tract**	D	-	Group 2	+	-	-	**6**	LC	0.125	1	66.58 ± 8.87
EcO	n/a	Yes	Respiratory tract	D	O25	-	+	-	-	2	**LA**	0.063	0.8	64.23 ± 4.88
EcP	n/a	Yes	**Urinary tract**	D	O1	K1	+	-	-	2	LC	0.125	1	95.89 ± 7.87
EcQ	n/a	Yes	**Urinary tract**	A	-	-	+	+	-	2	LC	0.250	1.2	**PMN Lysis**
EcR	n/a	Yes	Digestive tract	A	-	-	+	-	-	2	LC	0.125	0.6	79.84 ± 7.76
EcS	n/a	Yes	**Urinary tract**	A	-	-	+	-	-	1	**LA**	0.125	1.2	32.59 ± 3.34
EcT	n/a	Yes	**Urinary tract**	B1	-	-	+	-	-	1	LC	0.125	1.2	61.99 ± 4.47

[a] Time interval between index surgery and diagnosis of infection : Early (< 3 months after surgery); Delayed (3-24 months after surgery); Late (> 2 years after surgery).

[b] The source of infection was determined on the basis of the isolation of the same *E. coli* (same susceptibility to antibiotics) from the presumed portal of entry and/or clinical evaluation.

[c] 14 *E. coli* serotypes associated with UPEC (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75, and O83) were searched by PCR.

[d] Group 2 capsular antigens were searched by PCR, and among the various group 2 capsular types, the K1 and K2 variants were searched by PCR.

[e] Grades of response in serum bactericidal assays.

[f] LPS patterns were coded as follow: LC, Long chain O antigen (35-60 kb); LA, only the band for lipid A-core.

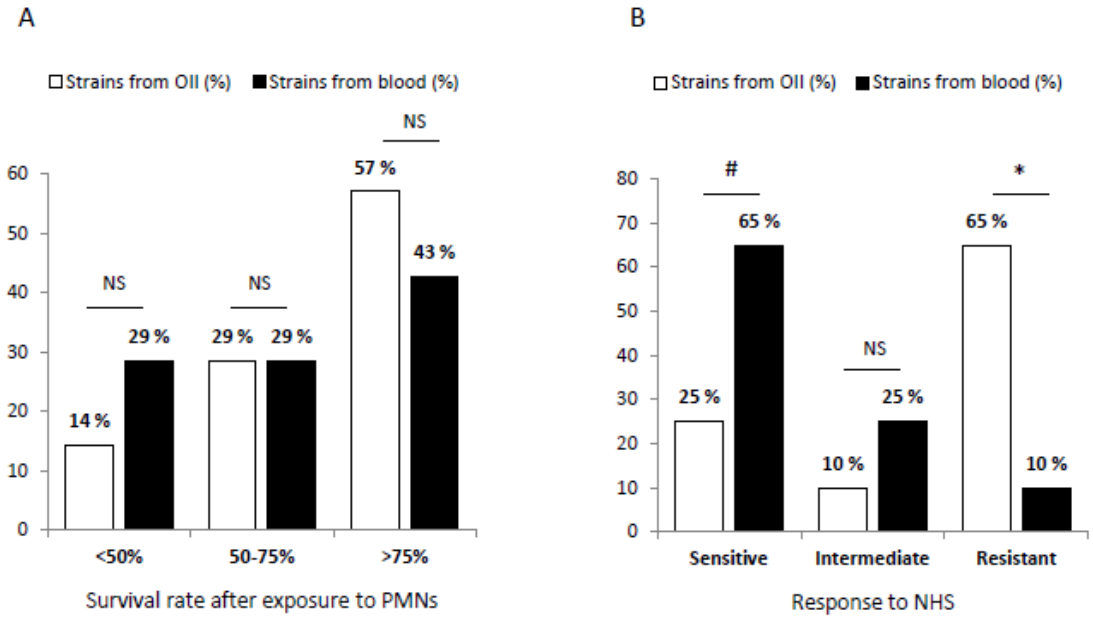
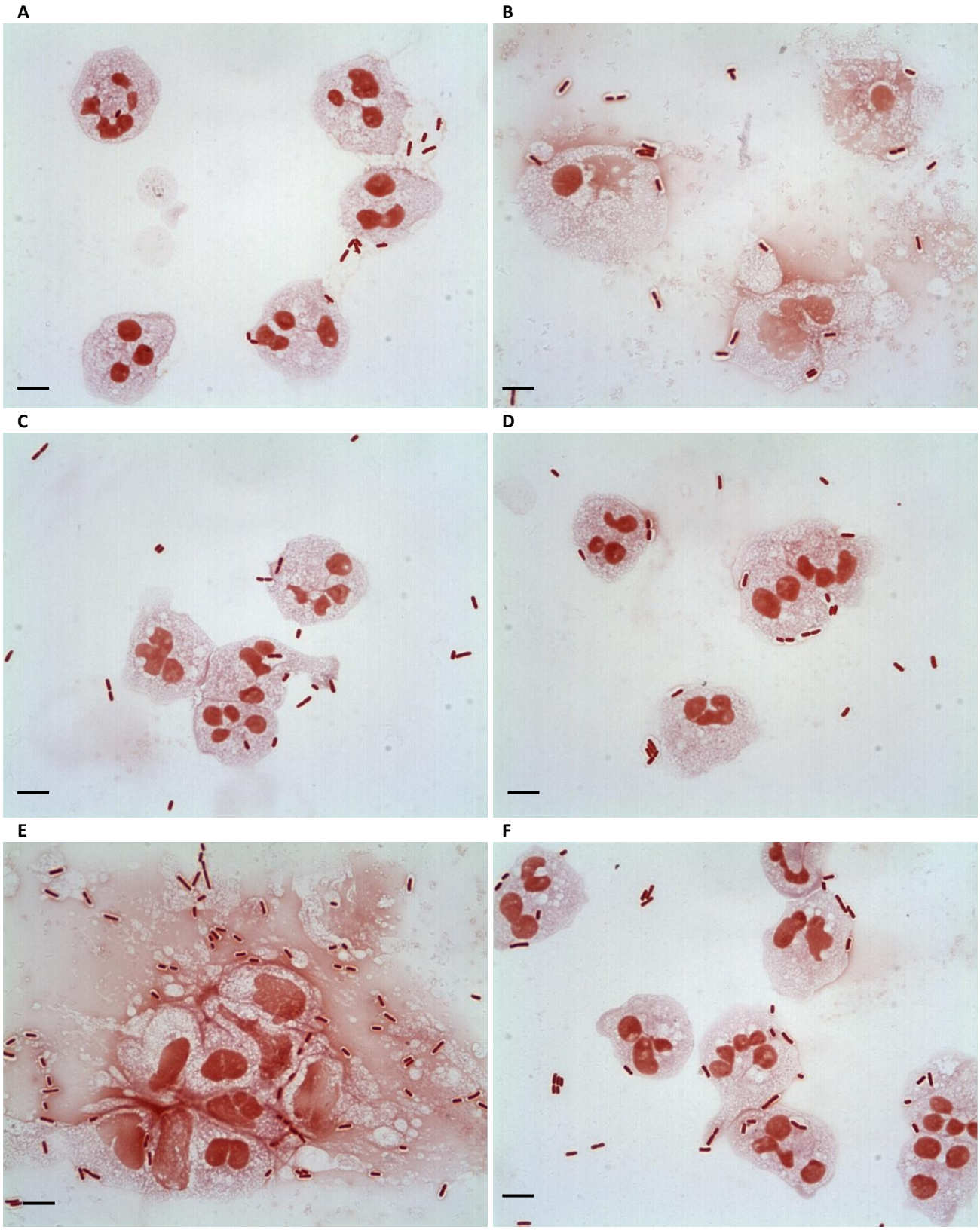


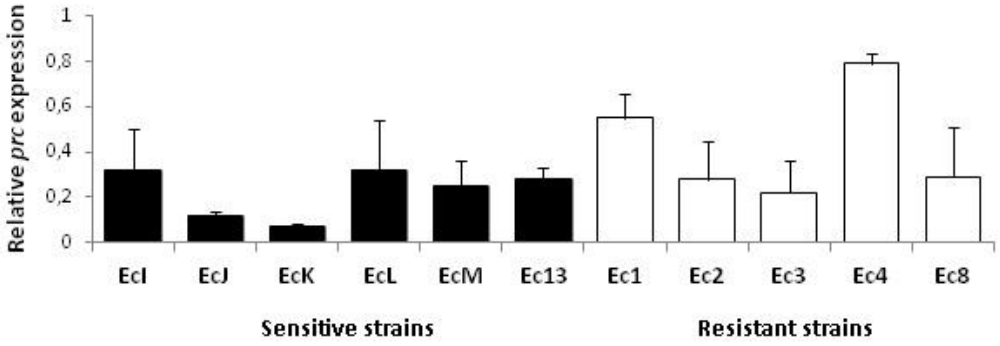
Figure 1. Effects of PMNs and NHS on the survival of the OII *E. coli* (*white columns*) and *E. coli* from blood (*black columns*). (A) The 28 non-cytolytic strains were ranked in three categories, according to the percentage of surviving bacteria (<50%, 50-75%, or >75%) after 1 hour of co-culture with PMNs (MOI of 1:1). (B) Serum bactericidal assays performed with 75% NHS during 3 hours allowed the categorization of the 40 strains as sensitive (grades 1 and 2), intermediate (grades 3 and 4), or resistant (grades 5 and 6) to serum. # $P<0.05$ or * $P<0.001$; Fisher's exact test.

Supporting Information Figure 1



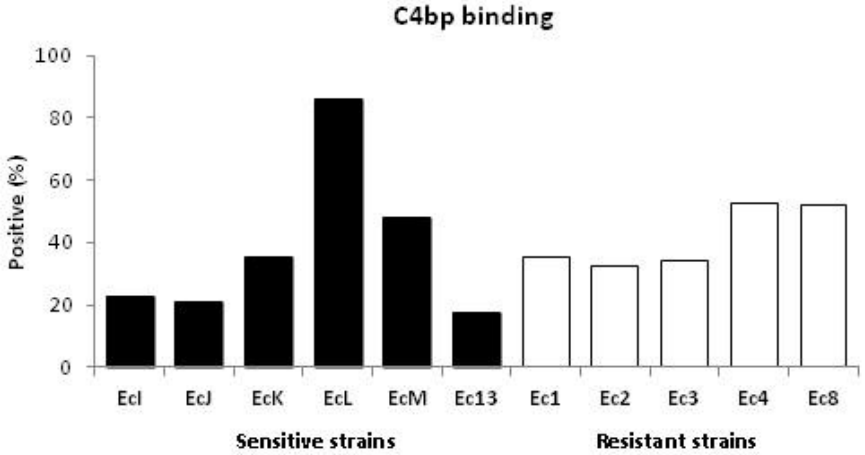
HlyA-producing *E. coli* strains induce PMNs lysis/necrosis *in vitro*. PMNs were exposed during 2 hours to *E. coli* strains (MOI of 1:1), including in (A) *E. coli* Ec1, in (B) *E. coli* Ec3, in (C) *E. coli* Ec2, in (D) *E. coli* Ec15, in (E) *E. coli* ZKLR^{+} (HlyA^{+}), and in (F) *E. coli* Zhly- (Δ*hlyA* mutant of *E. coli* ZKLR^{+}). The examination under light microscopy (Leica Microsystems; magnification x100) of PMNs - *E. coli* interaction on Gram-stained cytospins, showed phagocytosing PMNs and engulfed bacteria (A, C, D, and F) when the *hlyA* gene was absent (A and F) or very slightly expressed by the *E. coli* strains (C and D), and lysed PMNs (B and E) for the HlyA-producing strains (B and E). Scale bars: 10 µm.

Supporting Information Figure 2



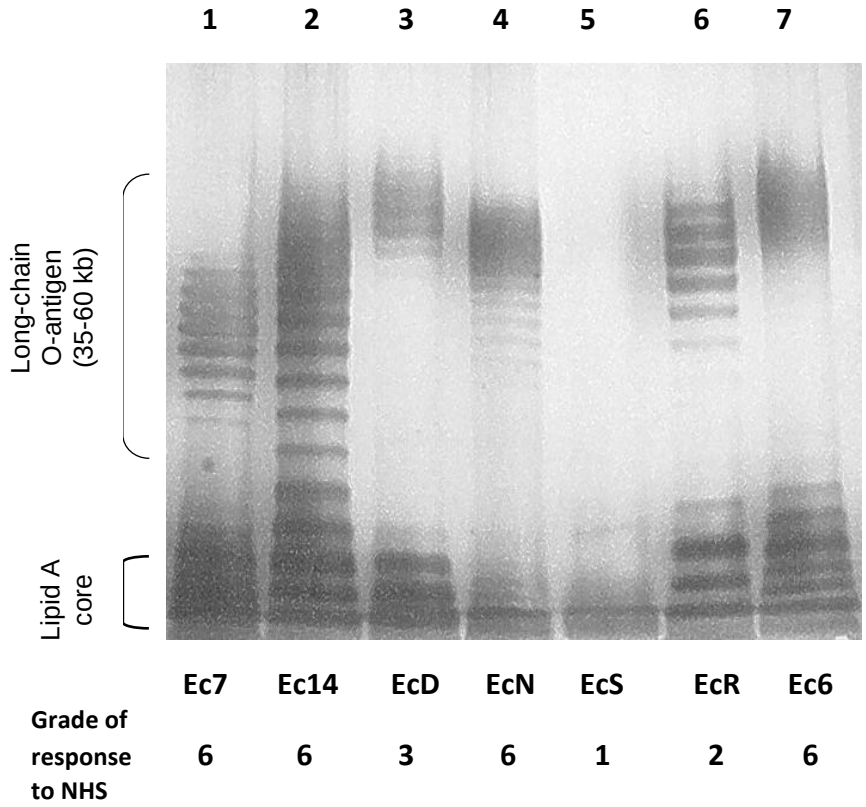
Relative expression of the *prc* gene in 6 serum-sensitive (*black columns*) and 5 serum-resistant (*white columns*) strains, using the *gapA* housekeeping gene as a reference and the comparative $2^{-\Delta CT}$ method. The total RNA of each bacteria was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche) following the manufacturer's instructions. 100 ng of total RNA was reverse transcribed and amplified using a One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (TaKaRa) with primers *prc*-F 5' GTCTGTTCATTCCATCCGGC 3', *prc*-R 5' CTTCATTACCCGTCGGCATG 3', and *gapA*-F 5' ACGAAGTTGGTGTTGACGTTG 3', *gapA*-R 5' ATAACCACTTTCTTCGCACCA 3'. Data are means of two experiments ± SD.

Supporting Information Figure 3



Analyses of C4bp deposition on six serum-sensitive (*black columns*) and 5 serum-resistant (*white columns*) strains by flow cytometry. 10^9 CFU/mL were incubated with 40% HI-NHS or PBS (negative controls) for 15 min at 37°C. C4bp binding was measured using a rabbit anti-C4bp antibody (Thermo Fisher Scientific) and a secondary Alexa Fluor® 647 conjugated goat anti-rabbit antibody (Life Technologies). Bacteria were analyzed with a FACSCalibur LSR II flow cytometer (Becton Dickinson), and 20 000 gated events were recorded.

Supporting Information Figure 4



Examples of LPS profiles obtained for 2 serum-sensitive (EcS and EcR), 1 serum-intermediate (EcD), and 4 serum-resistant *E. coli* strains (Ec7, Ec14, EcN, and Ec6). LPS were prepared by a hot water-phenol extraction, separated by SDS-PAGE, and silver stained.

3.3 COMMENTAIRES

3.3.1 ASPECTS METHODOLOGIQUES

Choix des souches

Les 20 souches de *E. coli* sélectionnées lors du travail précédent (*Article 2*), ont été conservées dans la présente étude. Au moins la moitié d'entre-elles étaient issues d'infections hématogènes, selon la définition de Zimmerli *et al*., soit 5 épisodes sur 20 associés à des hémocultures positives et 8 épisodes sur 20 de survenue tardive (plus de deux ans après la pose de prothèse) (Zimmerli *et al*., 2014). Vingt autres souches de *E. coli* isolées au C.H.U. de Nantes, de flacons d'hémocultures, chez 20 patients porteurs de prothèse(s) de genou et/ou de hanche, sans signe clinique d'IOAM secondaire à la bactériémie, ont été sélectionnées de façon aléatoire, pour composer un groupe témoin. Dans cette étude comparative, afin de minimiser le risque de biais de sélection lié à la virulence des souches, les *E. coli* témoins ont été appariés aux cas sur leur groupe phylogénétique. De façon non surprenante, une porte d'entrée urinaire était documentée ou suspectée dans 75% des cas de bactériémie, après analyse rétrospective des dossiers médicaux des 20 cas témoins sélectionnés.

Dans cette étude, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'interaction *E. coli* – système du complément et avons souhaité investiguer les mécanismes déployés par *E. coli* pour échapper à l'action lytique du système du complément. Pour des raisons de coût et parce qu'il aurait été techniquement trop contraignant d'analyser les 40 *E. coli*, nous avons retenu, pour certaines expériences, 11 souches de groupe phylogénétique B2 considérées comme pertinentes, soit 5 *E. coli* résistants au sérum (grade 6) choisis aléatoirement dans le panel IOAM et 6 *E. coli* sensibles au sérum (grade 1). Ne disposant que d'une souche de groupe phylogénétique B2 sensible au sérum et de grade 1 dans la cohorte IOAM, les 5 autres *E. coli* ont été sélectionnés dans le panel bactériémie.

Méthodes

Lors de ce travail, notre principal objectif était d'explorer la résistance au système immunitaire inné des *E. coli* responsables d'IOAMs. En raison de la complexité des interactions entre les différents effecteurs immunitaires de la réponse innée, nous avons focalisé cette étape exploratoire sur les deux acteurs principaux de cette première ligne de défense (le système du complément et les polynucléaires neutrophiles), en partant de l'hypothèse que les IOAMs à *E. coli* seraient plutôt d'origine hématogène. S'il était envisagé que ces infections soient plutôt secondaires à une inoculation directe des bactéries au site de

l'infection ou à une contamination par contiguïté, il aurait peut-être été plus intéressant d'étudier la résistance de nos souches à l'activité phagocytaire des macrophages résidents. Par ailleurs, au terme de la phase d'étude de la résistance des 40 *E. coli* à l'activité bactéricide du sérum, plusieurs questions se sont posées : Quel(s) mécanisme(s) contribue(nt) à la survie bactérienne dans le sérum ? Ce(s) mécanisme(s) est(sont)-il(s) directement impliqué(s) dans le processus infectieux local ? Les données de la littérature ont souligné l'importance de différents facteurs bactériens dans la résistance au complément. Ainsi, nous nous doutions qu'en étudiant un petit effectif de souches cliniques de *E. coli*, nous ne pourrions pas répondre à ces questions. Néanmoins, notre approche a le mérite de vérifier et mettre en doute certaines hypothèses issues de l'analyse de souches prototypes et de leurs mutants isogéniques délétés.

3.3.2 RESULTATS

Les polynucléaires neutrophiles, premières cellules phagocytaires à migrer du sang circulant vers un foyer infectieux, jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire innée. Ils reconnaissent leurs cibles grâce à un vaste répertoire de récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor), incluant tous les récepteurs de la famille TLR (Toll-like receptor), sauf TLR3. Cette reconnaissance est facilitée par des opsonines, à savoir des immunoglobulines et/ou des protéines du complément dérivées du composant C3, déposées à la surface des agents pathogènes. La phagocytose est suivie d'une lyse bactérienne dans l'espace protégé du phagolysosome, suite à des mécanismes de dégranulation. La production rapide de formes réactives de l'oxygène et de l'azote (H_2O_2, $O2^{-\cdot}$, O, $^{\cdot}OH$, HClO, ou NO) crée un environnement toxique pour les bactéries, mais d'autres produits bactéricides contenus dans les granulations cytoplasmiques, interviennent aussi (Tableau VI). Les polynucléaires neutrophiles peuvent aussi libérer le contenu de leurs granulations dans le milieu extracellulaire et par suicide, émettre des filaments composés d'ADN et de protéines, appelés NETs (Neutrophil Extracellular Traps), capables de piéger et tuer les bactéries non phagocytées (Mantovani *et al*., 2011 ; Amulic *et al*., 2012). Différentes stratégies peuvent être développées par les bactéries pour échapper à la phagocytose ou aux mécanismes microbicides intra- ou extracellulaires. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence les capacités particulières des UPEC à échapper à la phagocytose sous forme filamenteuse, à réduire la production de radicaux libres oxygénés par les polynucléaires, ou à résister à l'activité bactéricide de dérivés nitrogénés ou de peptides antimicrobiens (Bower *et al*., 2009 ; Loughman *et* Hunstad, 2011 ; Ulett *et al*., 2013). L'origine urinaire d'une majorité des

bactériémies ou IOAMs de notre étude, pourrait expliquer la grande résistance à la lyse par les polynucléaires des *E. coli* étudiés. Il est toutefois important de préciser qu'une porte d'entrée urinaire était détectée, dans cinq des six épisodes (bactériémies ou IOAMs) impliquant les *E. coli* les plus tués par les polynucléaires. D'autres expériences pourraient être envisagées pour préciser si les *E. coli* issus d'IOAMs déploient les mêmes stratégies pour contourner les mécanismes bactéricides des polynucléaires, et voir si celles-ci correspondent à celles déjà décrites chez les UPEC. En effet, notre protocole expérimental ne nous a pas permis de faire la distinction entre résistance à la phagocytose et résistance aux mécanismes microbicides, par exemple. Nos résultats mettent en lumière l'action leucolytique rapide de l'alpha-hémolysine produite par certaines souches de *E. coli*. Nous ne pouvons pas exclure que d'autres toxines puissent participer à une lyse plus tardive des polynucléaires, après phagocytose des bactéries. En effet, différentes études de l'interaction *S. aureus*-polynucléaires neutrophiles ont permis d'associer la survie intra-phagosomale de certaines souches, à la production de phénol-soluble modulines (PSMs) capables de lyser les polynucléaires (Surewaard *et al*., 2013 ; Otto, 2014).

Tableau VI : Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens produits par les polynucléaires neutrophiles (Source : Amulic *et al*., 2012).

Antimicrobial peptide	Antimicrobial mechanism[a]
Cationic antimicrobial peptides	
α-defensins (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4)	■ Permeabilize membrane bilayers containing negatively charged phospholipids ■ Inhibit DNA, RNA as well as protein biosynthesis ■ Inhibition of bacterial cell wall synthesis
LL-37	Transmembrane pore-forming
BPI	Increase bacterial permeability and hydrolysis of bacterial phospholipids by binding to LPS
Histones	Unknown mechanism
Proteolytic enzymes	
Lysozyme	Degrades bacterial cell wall
Proteinase 3 (PR3)	Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Neutrophil elastase (NE), cathepsin G (CG)	■ Cleaves bacterial virulence factors and outer membrane proteins ■ Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Azurocidin	Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Metal chelator proteins	
Lactoferrin	■ Alters bacterial growth by binding to iron, an essential bacterial nutrient ■ Binds to the lipid A part of LPS, causing a release of LPS from the cell wall and an increase in membrane permeability
Calprotectin	Alters bacterial growth by sequestering manganese and zinc

Le système du complément est le principal facteur humoral des défenses immunitaires non-spécifiques, impliqué dans l'opsonisation et la lyse bactérienne, ou le recrutement de phagocytes au niveau du site infectieux. Ce système comprend une trentaine de protéines activées en cascade, selon trois voies effectrices (voie classique, voie des lectines, ou voie alterne), qui aboutissent à la formation de complexes d'attaque membranaires (C5b-C9) ancrés dans la membrane des bactéries, induisant leur lyse osmotique. La voie classique est activée par la fixation des protéines C1q, puis C1r et C1s à des anticorps complexés à des antigènes membranaires, tandis que la voie des lectines est induite par la liaison d'une lectine spécifique des mannannes (MBL ou Mannan Binding Lectin) à la surface de structures carbohydrates de certains pathogènes. Ces deux voies participent à la formation d'une C3 convertase classique (C4b2a). La voie alterne s'active spontanément au contact des parois bactériennes et génère une C3 convertase alterne (C3bBb). Ces deux C3 convertases assurent le clivage des protéines C3 en anaphylatoxines C3a et en fragments C3b qui alimentent la boucle amplificatrice de la voie alterne et génèrent des C5 convertases (C4b2a3b et C3bBb3b) responsables de la formation d'anaphylatoxines C5a et de fragments C5b convertis en complexes d'attaque membranaires (Figure 13) (Ricklin *et al*., 2010).

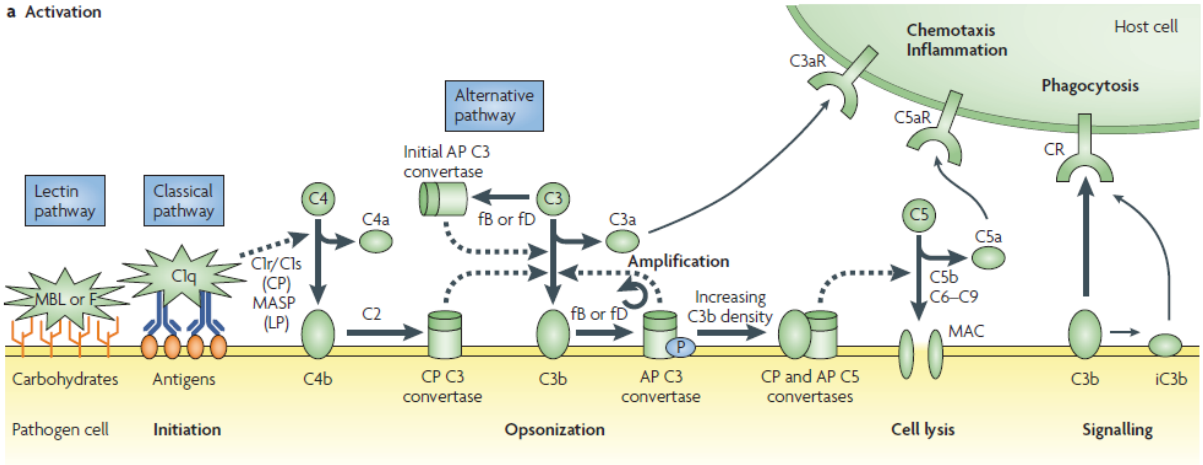


Figure 13 : Cascade d'activation du complément (Source : Lambris *et al*., 2008).
CP, Classical Pathway ; LP, Lectin Pathway ; AP, Alternative Pathway ; CR, Complement receptor ; MAC, Membrane-Attack Complex.

Différentes stratégies d'échappement à l'action lytique du complément ont été décrites chez *E. coli* (production d'une capsule, rôle protecteur du LPS ou de diverses protéines bactériennes (TraT, Prc, OmpA, OmpC, NlpI, Iss), recrutement à la surface bactérienne de protéines régulatrices du complément comme la C4bp). Aucune n'a été rapportée à ce jour comme déterminante dans la physiopathologie des infections urinaires (Miajlovic *et al*.,

2014). Plusieurs auteurs ont souligné l'importance de ces mécanismes pour le passage des bactéries dans le sang circulant (McNally *et al*., 2013 ; Miajlovic *et al*., 2014). Pourtant, dans notre étude, seuls 10% des *E. coli* du groupe bactériémie, résistaient à la bactéricidie du sérum, peut-être parce que de grandes quantités de sérum (concentrations finales v/v de 75%) étaient employées lors de nos essais. En revanche, une forte proportion des *E. coli* responsables d'IOAMs, soit 65%, contraient ou contournaient ces mécanismes bactéricides. Ces capacités d'échappement au système immunitaire inné pourraient contribuer à la survie et à la multiplication de *E. coli* au contact du matériel implanté et des tissus périprothétiques. Ces résultats corroborent aussi l'hypothèse selon laquelle des bactériémies intenses et prolongées pourraient rendre possible un ensemencement des tissus ostéo-articulaires. Dans le groupe témoin, seul un cas de bactériémie impliquant une souche de sensibilité intermédiaire au sérum (grade 3) était compliqué d'infection secondaire (endocardite à *E. coli*). D'autres facteurs liés à l'hôte auraient également pu favoriser par ailleurs la survenue de cette infection peu banale.

Parmi les mécanismes déjà incriminés par plusieurs auteurs dans la résistance à la bactéricidie du sérum et investigués ici (antigènes capsulaires K1 et K2, sérotypes O1, O6 et O18, LPS à longues chaînes, réduction de la perméabilité membranaire, protéine de membrane externe TraT, recrutement membranaire de C4bp), seules de longues chaînes O-polysaccharidiques s'avéraient indispensables à une survie bactérienne dans le sérum. Les huit *E. coli* de notre étude avec un LPS à chaîne courte ou absente étaient catégorisés comme sensibles au sérum. Le LPS est un composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et joue un rôle primordial dans les processus d'échange entre la bactérie et son hôte, à la fois responsable de l'activation de la cascade du complément, il apparait aussi ici que certaines conformations tridimensionnelles du LPS, aident la bactérie à échapper à l'action bactéricide du complément. La biosynthèse des chaînes O-polysaccharidiques est un processus séquentiel faisant intervenir différentes enzymes, dont la protéine Wzz contrôlant la longueur des chaînes. D'après Kalynych *et al*., l'activité de cette enzyme est modulée par sa séquence en acides aminés au niveau de trois régions protéiques (67-95, 200-255, et 269-274) (Kalynych *et al*., 2012). L'analyse des séquences peptidiques Wzz de nos souches, n'a pas permis d'identifier des mutations en lien avec le niveau de résistance au sérum. A l'inverse, nous avons observé des polymorphismes spécifiques de sérogroupe (Tableau VII, p90), alors que par ailleurs la longueur des chaînes O-polysaccharidiques ne semblait pas dépendre de la spécificité antigénique des LPS. En outre, cette membrane externe est le point d'ancrage de

nombreuses structures (protéines de la membrane externe ou "Omp", capsule, adhésines…) contrôlant la perméabilité membranaire et interagissant de manière dynamique avec les structures de l'hôte. La capsule, enveloppe la plus externe, joue un rôle protecteur contre la phagocytose, mais son rôle potentiel dans la résistance au sérum fait l'objet de controverses (Phan *et al*. 2013). Nous n'avons pas cherché à mettre en évidence ou quantifier la production de capsule chez nos souches, l'extraction de polysaccharides capsulaires étant techniquement trop complexe. Toutefois, un antigène capsulaire de groupe 2 était détecté par PCR, chez plusieurs souches sensibles au sérum. Par ailleurs, nous avons mis au point une technique d'extraction des 3 porines majeures de *E. coli* : OmpA, OmpC et OmpF, impliquées dans le contrôle de la perméabilité membranaire et interagissant avec certaines protéines du système du complément (C1q, C4bp) (Wooster *et al*., 2006 ; Liu *et al*. 2012). Alors que des études réalisées chez des souches de *E. coli* mutées, ont montré que la perte de porine OmpC ou que la production de protéine OmpA jouaient un rôle important dans la résistance au sérum, nous n'avons pas observé de différence d'expression de ces porines entre les souches sensibles et résistantes au sérum (Figure 14, p90) (Wooster *et al*., 2006 ; Liu *et al*. 2012). Enfin, en complément de ces approches ciblées sur les surfaces bactériennes, nous avons mesuré, par cytométrie en flux, l'opsonisation de 11 *E. coli* (5 résistants et 6 sensibles au sérum) par les IgG et IgM humaines et par les composants C3b/C3bi du complément, sans mettre en évidence de différence significative entre les deux groupes de souches, tout en observant une forte variabilité inter-souche dans l'opsonisation (Figure 15, p91).

Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux de Phan *et al*., qui ont récemment montré par l'analyse d'une souche de *E. coli* par mutagénèse médiée par des transposons comme approche génomique fonctionnelle, qu'une multiplicité de facteurs bactériens influence la survie dans le sérum (Phan *et al*. 2013). La paroi bactérienne est un ensemble très complexe, dont les composition et structure sont très variables d'un *E. coli* à l'autre, et dont les propriétés antigéniques sont spécifiques de chaque bactérie. De nombreuses protéines de surface et structures fimbrillaires, capables de former des complexes stables avec des protéines sériques (fibronectine, C4bp, facteur H) ou dont la fonction reste assez floue, pourraient jouer un rôle dans la résistance au sérum. Nous avons pu observer, une différence de fixation du colorant rouge congo, entre les souches des deux panels (IOAM et hémoculture) (Figure 16, p92), peut être en lien avec la résistance au sérum. Ce colorant permet de mettre en évidence la production de fibres amyloïdes curli ayant une forte affinité pour la fibronectine, et peut-être d'autres fibres extracellulaires apparentées, potentiellement impliquées dans la liaison à des composants de la matrice extracellulaire et/ou dans la fixation

de facteurs sériques protecteurs contre l'action lytique du complément. D'autres investigations seraient nécessaires (étude des capacités de liaison des différentes souches à la fibronectine, recherche et étude de l'expression de structures fimbrillaires impliquées dans l'interaction bactéries – fibronectine, étude de l'impact d'une délétion de ces fibres sur la résistance au sérum…) pour peut-être identifier une ou des protéine(s) de surface spécifiquement impliquée(s) dans la physiopathogénèse des IOAMs et dans l'échappement au système du complément.

Points importants :

- Résistance d'une grande partie des *E. coli* responsables de bactériémies et/ou d'IOAMs à l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles.
- Très fort potentiel cytotoxique des souches de *E. coli* productrices d'alpha-hémolysine (HlyA) vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles.
- Résistance particulière des *E. coli* responsables d'IOAMs à l'action lytique du complément.
- Complexité des mécanismes impliqués dans la résistance au sérum.
- Rôle protecteur de longues chaînes de LPS contre l'action lytique du complément.
- Rôle de protéines membranaires de *E. coli* dans l'adhérence à la matrice extracellulaire osseuse et dans la résistance au complément ?

Tableau VII : Analyse des séquences peptidiques Wzz de 11 souches de *E. coli*.

Strain	Serotype	Serum[a]	LPS[b]	Wzz amino acid sequence																
				77	83	88	89	90	91	93	94	221	222	223	224	229	230	253	266	269	272
EcI	O16	**1**	LC	M	Q	V	S	D	L	E	T	G	E	D	I	L	F	P	E	K	D
EcJ	O1	**1**	**LA**	M	Q	V	S	D	L	E	T	G	E	D	I	L	F	P	E	K	D
EcM	O1	**1**	LC	M	Q	V	S	D	L	E	T	G	E	D	I	L	F	P	E	K	D
EcL	O83	**1**	**LA**	I	S	A	S	E	I	S	M	G	E	D	I	L	F	P	E	K	D
EcK	**O75**	**1**	**LA**	M	Q	V	S	D	L	E	T	-	Q	D	V	M	F	S	D	D	K
Ec2	**O75**	6	LC	M	Q	V	S	D	L	E	T	-	E	D	V	M	F	S	D	D	K
Ec3	**O75**	6	LC	M	Q	V	S	E	L	E	T	-	Q	D	V	M	F	S	D	D	K
Ec8	O6	6	LC	M	Q	V	S	D	L	E	T	-	Q	D	V	M	F	S	D	D	K
Ec1	O2	6	LC	M	Q	V	S	D	L	E	A	G	E	N	I	L	L	S	E	K	D
Ec4	-	6	LC	I	S	V	S	D	I	S	M	-	Q	D	V	M	F	S	D	D	K
Ec13	O1	**1**	**LA**	M	Q	V	A	D	L	E	T	G	E	D	I	L	F	S	-	-	-

[a] Grades of response in serum bactericidal assays; [b] LPS patterns were coded as follow: LC, Long chain O antigen (35-60 kb); LA, only the band for lipid A-core.

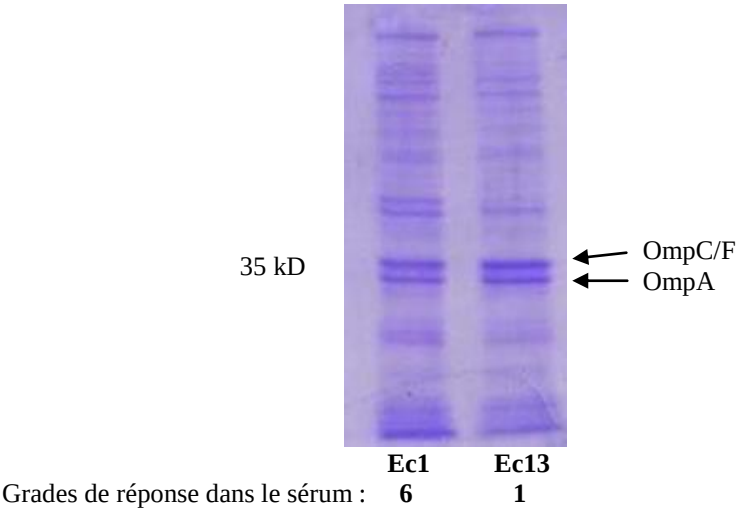


Figure 14 : Analyse des protéines de membrane externe après extraction, électrophorèse sur gel d'acrylamide, puis coloration au Bleu de Coomassie.
Exemple de profils obtenus pour deux *E. coli* de même Sequence Type (ST95), l'un sensible (grade 1), l'autre résistant (grade 6) au sérum. Les porines OmpA, OmpC et OmpF sont des protéines majoritaires de la membrane externe de *E. coli*. Elles ont des poids moléculaires proches de 35 kD. Les porines OmpC et OmpF sont quasiment indissociables dans ces conditions.

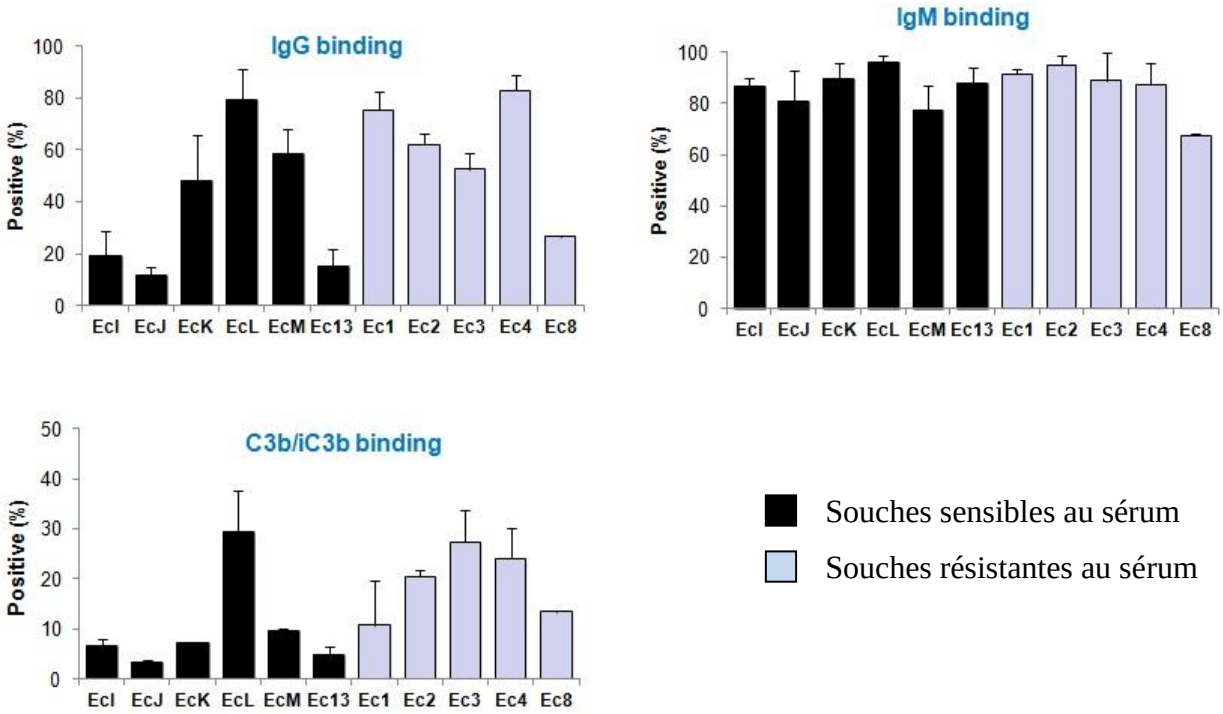


Figure 15 : Mesure par cytométrie en flux de l'opsonisation de 11 souches de *E. coli* par les IgG, IgM, ou les fragments C3b/C3bi sériques.

La mesure au cytomètre en flux FACS LSR II (BD Biosciences) du marquage membranaire des bactéries était réalisée sur 10 000 évènements. Le nombre de bactéries marquées était exprimé en pourcentage de la population analysée. Tous les essais étaient dupliqués. Globalement, nous n'avons pas observé de différence de marquage significative entre le groupe de souches sensibles au sérum (colonnes noires) et le groupe de souches résistantes au sérum (colonnes grisées).

A

B

Ec1	Ec8	Ec15	EcA	EcH	EcO
Ec2	Ec9	Ec16	EcB	EcI	EcP
Ec3	Ec10	Ec17	EcC	EcJ	EcQ
Ec4	Ec11	Ec18	EcD	EcK	EcR
Ec5	Ec12	Ec19	EcE	EcL	EcS
Ec6	Ec13	Ec20	EcF	EcM	EcT
Ec7	Ec14		EcG	EcN	

C

6	6	5	5	2	2
6	6	4	4	1	2
6	5	5	4	1	2
6	4	2	3	1	2
6	2	1	3	1	1
6	1	1	3	1	1
6	6		2	6	

Figure 16 : Etude de la fixation du colorant rouge congo par les 40 *E. coli* de notre étude. *A)* Culture des 40 *E. coli* sur gélose rouge congo (coloration rouge +/- intense des spots liée au degré de fixation du colorant) ; *B)* Plan de dépôt (panel IOAM à gauche et panel bactériémie à droite) ; *C*) Grades de résistance au sérum des souches correspondantes.

CHAPITRE III :

DISCUSSION

Les IOAMs sont des complications redoutables, parfois lourdes de séquelles, nécessitant des traitements longs et coûteux. L'évolution des techniques chirurgicales, le respect des règles d'asepsie et la prescription d'une antibioprohylaxie per-opératoire ont significativement réduit le risque d'infections post-opératoires. Cependant, malgré ces mesures, la hausse du nombre d'implantations de prothèses articulaires, en raison d'un vieillissement accentué de la population, s'accompagne et s'accompagnera d'une augmentation du nombre d'infections. Ces infections présentent de nombreuses difficultés diagnostiques et thérapeutiques. Les tableaux clinique et radiologique peuvent être très variés et parfois peu parlants. Le diagnostic microbiologique nécessite une équipe entraînée et la mise en œuvre de techniques longues, parfois complexes et coûteuses. Par ailleurs, le choix des traitements chirurgicaux et médicaux est également complexe. La grande diversité des situations rencontrées et le manque d'harmonisation dans les définitions et classifications des IOAMs, rendent difficiles l'analyse critique de la littérature scientifique et l'élaboration, par les experts des différentes organisations européennes et américaines (IDSA, ICMPJI, MSIS, EBJIS), de recommandations pour la pratique clinique consensuelles et unanimement approuvées. Alors que les études physiopathologiques, essais cliniques randomisés et analyses rétrospectives descriptives, portent essentiellement sur des infections à staphylocoques, peu de données publiées dans la littérature scientifique concernent spécifiquement les infections à bacilles à Gram négatif (Hsieh *et al*., 2009 ; Martinez-Pastor *et al*., 2009 ; Uçkay *et* Bernard, 2010 ; Zmistowski *et al*., 2011 ; Aboltins *et al*., 2011 ; Jaen *et al*., 2012 ; Rodriguez-Pardo *et al*., 2014). Néanmoins, ces études cliniques s'accordent sur le fait que les IOAMs à bacilles à Gram négatif se manifestent le plus souvent sous forme aiguë et concernent généralement des patients âgés présentant plusieurs facteurs de comorbidité. En accord avec ces données, l'ensemble des patients inclus dans notre étude, présentaient un tableau d'infection aiguë. Leur moyenne d'âge était élevée [73 ans (48-95 ans)] et dans la plupart des cas, d'autres pathologies associées, influençant les défenses immunitaires (obésité, diabète, polyarthrite rhumatoïde, arthrose, immunosuppression, …) étaient retrouvées. A ces facteurs de risque, s'ajoute une virulence de l'agent pathogène lui-même (Hsieh *et al*. 2009). Dans notre étude, malgré la grande diversité génétique des *E. coli* issus d'IOAMs (21 Sequence Type différents pour 30 souches étudiées), la majorité des *E. coli* appartenait au groupe phylogénétique B2, plus virulent que les trois autres groupes phylogénétiques (Clermont *et al*., 2000). Nous n'avons pas pu déterminer de manière objective, si les patients infectés par les souches de *E. coli* moins virulentes présentaient davantage de facteurs prédisposant, ou si ces IOAMs étaient moins sévères. En effet, en raison du caractère rétrospectif et multicentrique (Nantes,

Cholet, Orléans) de ce travail de Thèse, il est apparu difficile de comparer les caractéristiques cliniques et paracliniques des 30 infections, c'est-à-dire de prendre en compte l'ensemble des paramètres suivants : facteurs de risque liés au patient ; matériel implanté et motifs d'implantation ; caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques des infections ; cultures mono ou plurimicrobiennes ; facteurs liés à la prise en charge médicale et thérapeutique de l'infection. Lors de la collecte de nos 30 souches cliniques, nous avons inclus toutes les IOAMs diagnostiquées au CHU de Nantes ou dans les centres associés, impliquant l'espèce *E. coli*, en n'excluant aucune souche. Notre objectif était d'obtenir un échantillonnage important et parfaitement représentatif des différentes situations conduisant à l'isolement de *E. coli* de tissus ostéo-articulaires au contact d'un matériel. Ce mode de recueil présentait l'avantage d'obtenir, dans un premier temps, des résultats expérimentaux certainement plus extrapolables aux patients infectés et à traiter en pratique médicale courante, que ceux issus de l'étude de sous-groupes de souches cliniques sélectionnées, ou de souches prototypes. Cependant, ce type de démarche globale nécessite aussi d'être complété par d'autres études, plus ciblées, pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors du processus infectieux. Dans notre étude, en raison du grand nombre de variables à prendre en compte et du petit effectif de souches pour chacune des variables, nous n'avons malheureusement pas pu tiré bénéfice des données cliniques dont nous disposions, notamment pour mettre en évidence des facteurs pronostics d'infections plus sévères ou à risque de complications. Nous pouvons toutefois émettre des hypothèses qui pourraient servir de point de départ à la mise en place d'études prospectives.

A. IOAMs à *E. coli* et infections urinaires

Nos recherches suggèrent que les souches de *E. coli* responsables d'IOAMs pourraient être, à l'origine, responsables d'infections urinaires, en raison de leurs propriétés de virulence, leur sérotype, et les antécédents urologiques présentés par plusieurs patients. Bien qu'aucune définition génétique ou phénotypique, précise et consensuelle, d'une souche UPEC n'ait été établie, nous avons identifié chez les souches les plus virulentes de *E. coli* issues d'IOAMs (groupe phylogénétique B2), des gènes de virulence (*papGII/papGIII*, *sfa/foc*, *hlyA*, *cnf1*, *hra*) habituellement réunis au sein d'îlots de pathogénicité largement distribués chez les UPEC (PAI II_{536} en particulier). Les fimbriae de type P ou S/F1C (gènes *papGII*, *papGIII*, et *sfa/foc*) confèrent aux UPEC la capacité de s'attacher à des récepteurs spécifiques des cellules urothéliales (glycosphingolipides à motif galabiose, ou α-2,3-sialylés), permettant la

colonisation et l'infection du tractus urinaire, jusqu'au rein (Bäckhed *et al*., 2002 ; Lillington *et al*., 2014). Les fimbriae de type S/F1C (gènes *sfa/foc*) étaient particulièrement présents parmi les *E. coli* issus d'IOAM (43% de souches détectées positives dans le groupe IOAM *vs* 17% dans le groupe flore fécale ; $P<0,05$). Ces fimbriae pourraient jouer un rôle dans l'adhérence de *E. coli* aux cellules osseuses, puisque des structures α-2,3-sialylées, potentiellement impliquées dans les mécanismes de minéralisation osseuse, recouvrent la surface des cellules ostéoblastiques (Xu *et al*., 2013). De même, l'adhésine non fimbriale Hra aux propriétés hémagglutinantes, habituellement très présente chez les UPEC, l'était aussi chez les *E. coli* de notre groupe IOAM (53% de souches positives *vs* 20% dans le groupe flore fécale ; $P<0,05$). Bien que la fonction exacte de cette agglutinine reste relativement difficile à préciser, il est possible que celle-ci puisse entraîner une agrégation bactérienne et donc favoriser la formation de biofilm. Ce comportement pourrait avoir des conséquences physiopathologiques lors d'IOAMs (Srinivasan *et al*., 2003). Par ailleurs, les toxines HlyA et CNF1, habituellement décrites chez les UPEC dans le cadre d'infections urinaires sévères, jouent un rôle important dans la modulation de la réponse inflammatoire et dans les phénomènes d'invasion et de destruction tissulaire, dans divers contextes infectieux (Smith *et al*., 2008). Nos travaux nous ont amenés à nous intéresser tout particulièrement au rôle de l'alpha-hémolysine HlyA, qui s'est avérée être une puissante cytotoxine vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles et des cellules ostéoblastiques. Enfin, les souches de *E. coli* uropathogènes possèdent habituellement un large répertoire de systèmes d'exploitation du fer, permettant leur survie dans l'environnement urinaire très carencé en fer. Il a été rapporté que ces systèmes de capture du fer, étaient très prévalents chez les souches de *E. coli* non-B2 les plus pathogènes, c'est-à-dire, plus souvent associés à des infections urinaires qu'à des bactériuries asymptomatiques (Jauréguy *et al*., 2007 ; Yun *et al*., 2013). Dans notre étude, l'aérobactine (gène *iucC*), un sidérophore habituellement porté par la plupart des souches responsables de bactériémies, était particulièrement prévalent parmi les *E. coli* non-B2 de notre groupe IOAM (85% de souches non-B2 détectées positives *vs* 25% de souches non-B2 positives dans le groupe flore fécale ; $P<0,01$). Ce déterminant génétique pourrait avoir contribué à une meilleure compétitivité et adaptabilité des souches moins virulentes lors d'une potentielle dissémination dans le torrent circulatoire. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'une grande partie des IOAMs à *E. coli* pourraient être des complications d'infections urinaires. Parmi les facteurs de virulence les plus importants des UPEC, plusieurs (fimbriae de type S/F1C, alpha-hémolysine, sidérophores…) pourraient promouvoir la diffusion hématogène des UPEC et jouer un rôle déterminant dans le développement d'IOAMs. Néanmoins, un

nombre relativement limité de gènes de virulence a été investigué lors de ce travail. Les récentes avancées de la génomique et de la transcriptomique devraient permettre d'apporter de nouvelles connaissances sur la virulence bactérienne. L'application de telles approches globales pour l'exploration physiopathologique de divers processus infectieux, devrait permettre de caractériser, de façon plus exhaustive, les principaux facteurs de pathogénicité de *E. coli* mis en jeu dans différentes situations cliniques spécifiques, y compris, dans le domaine des IOAMs.

De manière consensuelle, les diverses recommandations françaises (SPILF, HAS) ou américaines (ICMPJI) pour la prise en charge et le diagnostic des infections ostéo-articulaires sur matériel, indiquent que l'existence d'une infection bactérienne évolutive à distance du site opératoire (cutanée, respiratoire ou urinaire), au moment de la pose d'une prothèse ou d'un matériel, est un facteur de risque d'infection (SPILF *et al*., 2009 ; Parvizi *et al.*, 2013 ; HAS *et al*., 2014). Ainsi, il est recommandé de chercher la présence de signes généraux d'infection urinaire chez le futur opéré, et de traiter toute infection urinaire symptomatique avant la chirurgie (SPILF *et al*., 2009 ; Parvizi *et al.*, 2013). La question du dépistage et du traitement pré-interventionnel des colonisations urinaires suscite plus de controverses et la communauté scientifique a manifesté un regain d'intérêt pour cette question ces dernières années (Cordero-Ampuero *et al*., 2013 ; Bouvet *et al*., 2014 ; Sousa *et al*., 2014a ; Sousa *et al*., 2014b ; Uçkay *et al*., 2014). Ainsi, en France, les recommandations de pratique clinique rédigées par la SPILF pour la prise en charge des infections ostéo-articulaires sur matériel, ne fournissent aucune indication sur ce sujet (SPILF *et al*., 2009). La SFAR mentionne que "*La réalisation d'une bandelette urinaire complétée par un ECBU en cas de positivité de la recherche de nitrites ou de la leucocyte-estérase est probablement recommandée, chez les patients ne présentant pas de facteur de risque d'infection urinaire/colonisation urinaire et devant faire l'objet d'une chirurgie à risque fort de complication liée à l'infection urinaire, telle que […] la chirurgie orthopédique avec mise en place de matériel prothétique.*" (SFAR *et al*., 2012). Enfin, l'HAS ne considère pas l'existence d'une bactériurie asymptomatique comme un facteur de risque d'infection sur prothèse (HAS *et al*., 2014). Plusieurs études cliniques ont récemment souligné la prévalence élevée (de l'ordre de 12,1% à 38%) des bactériuries asymptomatiques pré-opératoires en chirurgie orthopédique (Cordero-Ampuero *et al*., 2013 ; Bouvet *et al*., 2014 ; Sousa *et al*., 2014a). Les auteurs de ces différents essais n'ont pas montré de bénéfice à dépister et/ou traiter des bactériuries asymptomatiques chez les patients programmés pour une pose de matériel orthopédique, en raison du très faible risque

d'infection urinaire post-opératoire avec une bactérie identique et des coûts induits (Cordero-Ampuero *et al*., 2013 ; Bouvet *et al*., 2014 ; Sousa *et al*., 2014a). Ainsi, l'ICMPJI indique que les patients présentant une bactériurie asymptomatique peuvent subir sans danger une arthroplastie, si une antibioprophylaxie per-opératoire est administrée (Parvizi *et al.*, 2013). Enfin, très récemment, l'étude de Sousa *et al* a démontré qu'une bactériurie pré-opératoire asymptomatique était un marqueur de vulnérabilité aux infections, et un facteur de risque associé aux infections sur prothèse à bacilles à Gram négatif, mais ces résultats ont été vivement critiqués par d'autres auteurs (Sousa *et al*., 2014a ; Sousa *et al*., 2014b ; Uçkay *et al*., 2014).

Les données de la littérature montrent que l'incidence des infections urinaires après une arthroplastie de hanche ou de genou varie entre 0,7% et 2,4%, et peut atteindre 15% chez les patients présentant une rétention urinaire post-opératoire (Bouvet *et al*., 2014). Koulouvaris *et al*. ont démontré que la plupart de ces infections post-opératoires n'étaient pas provoquées par des bactéries entériques, et non associées à un risque accru d'infections du site opératoire (Koulouvaris *et al*., 2009). Pourtant, les infections urinaires sont, sans conteste, un facteur de risque d'infections secondaires de prothèse, par passage systémique (Pulido *et al*., 2008 ; Cordero-Ampuero *et al*., 2010 ; Zmistowski *et al*., 2011 ; Sousa *et al*., 2014a). Ainsi, si *S. aureus* est l'espèce bactérienne la plus fréquemment rencontrée lors d'infections aiguës hématogènes (38 % des cas), l'espèce *E. coli* arrive en 3ème position (5 à 16 % des cas selon les études), derrière les streptocoques, alors que le bacille pyocyanique n'apparaît pas être un acteur important dans ce contexte (Rodriguez *et al*., 2010 ; Konigsberg *et al*., 2014). Le point de départ habituel de ces infections hématogènes est cutané pour *S. aureus*, et urinaire pour *E. coli* (Rodriguez *et al*., 2010 ; Bouvet *et al*., 2011 ; Zmistowski *et al*., 2011). Enfin, selon l'étude de Bouvet *et al* portant sur 182 infections de prothèse, la part des bacilles à Gram négatif, et en particulier de *E. coli*, lors d'infections tardives hématogènes (plus de 2 ans après l'arthroplastie) est plus élevée que celle des bactéries à Gram positif (Bouvet *et al*., 2011). Ainsi, en accord avec ces données, une grande proportion des IOAMs de notre étude, soit 40 % (12/30) étaient d'origine hématogène, selon la définition de Zimmerli *et al* (Zimmerli *et al*., 2014). Parmi celles-ci, 10 (83%) étaient de survenue tardive (plus de 2 ans après la pose de matériel), et 8 (67%) étaient associées à un ECBU positif à *E. coli*. La majorité des infections polymicrobiennes de notre étude, soit 5 sur 7 (71%) étaient d'apparition précoce (survenue au cours du premier mois suivant la pose de matériel). Parmi les 11 infections précoces de notre étude, seules trois infections (27%), monomicrobiennes, étaient associées à un ECBU pré-opératoire positif à *E. coli* au moment de la pose du matériel.

Il est estimé que jusqu'à 15% des infections urinaires peuvent s'accompagner de bactériémie et *E. coli* est la principale espèce bactérienne en cause dans ce cas (plus de 70% des urosepsis) (Al-Hasan *et al*., 2010 ; Marschall *et al*., 2012). Les UPEC disposent de plusieurs facteurs de virulence déterminants pour survivre, s'adapter et diffuser dans le sang (Pili de type 1, P, ou IV, capsule polysaccharidique de groupe 2, polymère de β-1,6-N-acétyl-D-Glucosamine, fibres amyloïdes curli, sidérophores…). La plupart des *E. coli* de notre groupe IOAM, hébergeaient ces gènes de virulence (Marschall *et al*., 2012 ; McNally *et al*., 2013 ; Subashchandrabose *et al*., 2013). Par ailleurs, les UPEC emploient diverses stratégies pour contrôler les réponses immunitaires innées de l'hôte, au niveau local et systémique. Ainsi, plusieurs études montrent que les souches de *E. coli* uropathogènes peuvent se défendre contre les cellules phagocytaires par différents mécanismes : i) inhibition du recrutement des neutrophiles au site de l'infection, ii) évitement de l'opsonophagocytose grâce à des polysaccharides de surface ou par filamentation, iii) survie intraphago-lysosomiale par résistance aux dérivés oxygénés et azotés ou aux peptides antimicrobiens, iv) induction de l'apoptose des neutrophiles, v) destruction des neutrophiles et autres cellules hôtes par sécrétion de toxines cytolytiques appelées aussi "pore-forming toxins". (Davis *et al*., 2006 ; Bower *et al*., 2009 ; Loughman *et* Hunstad, 2011 ; Lau *et al*., 2012 ; Garcia *et al*., 2013 ; Ulett *et al*., 2013). Grâce à l'analyse d'un échantillonnage important de souches cliniques de *E. coli* isolées de bactériémies ou d'IOAMs, nous apportons de nouveau la preuve que des ExPEC, pour la plupart d'origine urinaire, peuvent survivre à l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles. Bien que cette propriété ne soit pas seulement l'apanage des *E. coli* responsables d'IOAMs, elle pourrait toutefois être déterminante dans ce contexte pour faciliter la greffe bactérienne au niveau du matériel implanté, en permettant aux bactéries : i) d'atteindre des titres circulants plus élevés, ii) de contrecarrer les cellules phagocytaires présentes autour de l'implant, et iii) de se multiplier rapidement au site de l'infection. Enfin, bien que plusieurs études aient suggéré qu'une résistance à l'activité bactéricide du sérum puisse permettre aux UPEC de survivre dans le sang à l'occasion d'une diffusion hématogène, nous n'avons pas confirmé cette tendance dans notre étude, en analysant les 20 souches de *E. coli* isolées de bactériémies (McNally *et al*., 2013 ; Miajlovic *et al*., 2014). En revanche, la plupart des *E. coli* issus d'IOAMs, soit 65% des souches, étaient capables de se multiplier dans le sérum, échappant ainsi à l'action lytique du système du complément.

Plusieurs essais cliniques ont montré, qu'à la faveur d'une bactériémie à *S. aureus*, les patients ayant bénéficié d'une arthroplastie, étaient exposés à un risque important d'infection

secondaire de leur prothèse (30 à 40% des cas) (Murdoch *et al*., 2001 ; Sendi *et al*., 2011b). Des expériences effectuées sur un modèle animal ont également permis de mettre en évidence qu'un faible inoculum de *S. aureus* (100 UFC) suffisait à infecter par voie hématogène un implant sous-cutané (Zimmerli *et al*., 1982). Ces données cliniques et expérimentales soulignent les fortes capacités invasives de *S. aureus* et sous-tendent l'échec des réponses immunitaires innées dans le contrôle de la dissémination hématogène de cette bactérie. De la même façon, nous montrons que les UPEC présentent un fort potentiel de diffusion, et que les souches les plus aptes à détourner ou neutraliser la réponse immune innée pourraient être responsables d'IOAMs.

B. IOAMs à *E. coli* et résistance à l'action lytique du système du complément

La résistance bactérienne à l'activité bactéricide du sérum est un mécanisme couramment évoqué pour expliquer la survenue d'infections chez des sujets immunocompétents. Une multitude de mécanismes peuvent être développés par les bactéries pathogènes, pour se soustraire à l'action du complément. De nombreux exemples dans la littérature, associent cette propriété biologique à divers processus physiopathologiques (Blom *et al*., 2009 ; Singh *et al*., 2010). Chez les bactéries à Gram négatif, différentes protéines de surface, capables de se lier à des glycoprotéines libres dans le sang (fibronectine, vitronectine, C4bp, facteur H…) et à des composants de la matrice extracellulaire de différents tissus (fibronectine, vitronectine…), jouent un rôle crucial à la fois dans le pouvoir invasif local ou systémique et dans l'échappement au système de défense de l'hôte. Ainsi, l'adhésine PE produite par les souches non encapsulées de *Haemophilus influenzae* responsables d'otites moyennes, induit l'adhérence des bactéries à la vitronectine de la surface des cellules épithéliales. Elle permet également la capture de vitronectine soluble dans le sang, protégeant ainsi les bactéries du dépôt membranaire d'opsonines et de la formation de complexes d'attaque membranaires (Hallström *et al*., 2009 ; Singh *et al*., 2010). Le pouvoir pathogène de *Yersinia enterocolitica*, une entérobactérie potentiellement responsable d'entérocolites, est lié à la présence d'un plasmide de virulence pYV codant pour différents facteurs de virulence, dont l'adhésine YadA, aux multiples facettes. Cette adhésine permet à la bactérie de se lier à la fibronectine, au collagène, ou la laminine de la matrice extracellulaire des cellules intestinales endommagées, mais présente aussi la propriété d'inhiber la voie alterne d'activation du complément, par fixation du facteur H (El Tahir *et* Skurnik, 2001).

Un parallèle peut être réalisé chez les bactéries à Gram positif. Ainsi, de manière identique, *S. aureus* est équipé d'un arsenal de facteurs de virulence efficaces contre la cascade d'activation du complément. Parmi ces facteurs figurent diverses protéines sécrétées (SCIN ou "Staphylococcal Complement INhibitor", Ecb ou "Extracellular Complement Binding protein", et Efb ou "Extracellular Fibrinogen Binding protein") et des protéines membranaires appartenant à la famille des MSCRAMMs, soit la protéine de liaison au collagène Cna, la protéine de la famille des "Serine-aspartate Dipeptide Repeat" SdrE, et son variant allélique Bbp ou "Bone sialoprotein Binding Protein" (Blom *et al*., 2009 ; Hair *et al*., 2013 ; Kang *et al*., 2013). La protéine Cna impliquée dans l'adhérence de *S. aureus* au tissu cartilagineux, joue un rôle crucial dans les ostéomyélites hématogènes, alors que son rôle semble moins important lors d'ostéomyélites par contamination directe (Kalinka *et al*., 2014). Cette protéine se lie au domaine collagène du composant C1q, qui ne peut donc plus interagir avec le composant C1r, et bloque ainsi la voie classique d'activation du complément (Kang *et al*., 2013). La protéine Bbp capable de se lier au fibrinogène et à la sialoprotéine de l'os, joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'ostéomyélite, avec production d'anticorps anti-Bbp chez l'hôte (Tung *et al*., 2000). Hair *et al* ont récemment mis en évidence le rôle de cette protéine dans l'inhibition des voies classique et alterne du complément, par fixation des facteurs H et C4bp (Hair *et al*., 2013).

Nos travaux mettent en lumière la formidable capacité des souches de *E. coli* responsables d'IOAMs à échapper à une lyse par le complément. Nos investigations ont démontré que la biosynthèse de LPS à longues chaînes pourrait permettre aux bactéries de se soustraire à l'activation du complément et à la formation de complexes d'attaque membranaires, mais d'autres mécanismes entrent en jeu. En vue de préciser les liens entre la survie bactérienne dans le sérum et la genèse d'IOAMs, d'autres investigations seraient intéressantes, afin de rechercher une stratégie partagée par toutes les souches de *E. coli* résistantes au sérum isolées dans ce contexte particulier. En effet, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse qu'une ou plusieurs protéines membranaires de *E. coli* engagées dans l'échappement aux défenses immunes de l'hôte puisse(nt) aussi interagir spécifiquement avec des glycoprotéines de la matrice extracellulaire osseuse.

C. IOAMs à *E. coli* : adhérence et/ou virulence ?

La formation de biofilm à la surface des prothèses articulaires est un élément important de la pathogenèse des IOAMs. Ces dernières années ont vu le développement de nouveaux

biomatériaux et revêtements aux propriétés intrinsèques anti-adhésives et/ou antibactériennes (Elizabeth *et al*., 2014 ; Gallo *et al*., 2014 ; Zhao *et al*., 2014). De façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité, ou la charge électrostatique d'une surface, et la présence de films protéiques de surface favorisent la formation d'un biofilm. Les protéines du complément et l'albumine plasmatique sont deux composantes principales de ce film primaire, mais d'autres protéines plasmatiques (fibrinogène, fibronectine, vitronectine, α2-macroglobuline, thrombospondine, immunoglobulines, collagène, laminine…) plus ou moins adsorbées, selon les matériaux, participent également à ce phénomène. Une voie de recherche est le développement de surfaces anti-adhésives, réduisant l'adsorption des protéines de l'hôte et donc l'adhérence bactérienne (surfaces micro/nano-structurées, en titane préadsorbées d'albumine, ou greffées d'hydrogels…), mais ces nouvelles surfaces de moindre porosité, offrent une moins bonne ostéointégration, entraînant un risque de descellement mécanique (Campoccia *et al*., 2013 ; Gallo *et al*., 2014). Les recherches actuelles s'orientent vers l'élaboration de matériaux aux propriétés antibactériennes intrinsèques, greffés de nanoparticules métalliques (argent, zinc, cuivre, zirconium…) ou non (sélénium), ou de substances organiques (vancomycine, peptides anti-microbiens, chitosan…). Les dernières innovations technologiques sont des revêtements intelligents, conçus pour détecter différents stimuli (bactéries, corrosion, changements de température ou de pH…), et y répondre par libération d'agents biocides, cicatrisants, ou anticorrosifs, contenus dans des nanocapsules (Shchukin *et al*., 2013 ; Yu *et al*., 2013 ; Gallo *et al*., 2014). Ainsi, bien que les implants ostéo-articulaires ne soient pas vivants, leur interaction avec le sang, les liquides biologiques et les diverses cellules des tissus environnants, ainsi que les nombreuses réactions engendrées par l'environnement biologique et par les déformations mécaniques (réaction inflammatoire, oxydation, corrosion, frottement) rendent compte de la complexité d'étudier *in vitro* le comportement adopté par les bactéries à une telle interface.

Grâce à deux méthodes complémentaires, nous avons recherché si les souches de *E. coli* isolées d'IOAMs présentaient une capacité particulière à former du biofilm au contact d'une surface inerte. Seule une faible proportion des souches étudiées présentait un potentiel "biofilmogène" dans nos conditions expérimentales. Parmi les quatre *E. coli* détectés producteurs de biofilm par nos deux techniques, trois étaient issus d'infections polymicrobiennes. Aucune de ces quatre infections n'était survenue plus de 2 ans après la pose de matériel, et toutes se sont manifestées sous forme aiguë. Aucun des 30 *E. coli* étudiés ne formait des microcolonies en culture, pouvant faire suspecter un phénotype "Small Colony Variant" (SCV). L'absence d'infection pauci-symptomatique persistante explique très

certainement ces caractéristiques (Tuchscherr *et al*., 2011). A noter que Sendi *et al* ont rapporté de rares infections prothétiques chroniques à *E. coli*, sans tableau clinico-biologique particulièrement sévère, associées à l'isolement de SCV de *E. coli* adaptés à la vie intracellulaire ou en biofilm (Sendi *et al*., 2010). En outre, des travaux expérimentaux ont pu mettre en évidence la capacité particulière des UPEC à coloniser la surface de sondes urinaires de Foley en latex ou silicone, tandis que des *E. coli* isolés de bactériuries asymptomatiques, étaient fortement producteurs de biofilms sur d'autres surfaces, couramment employées lors d'expérimentations *in vitro* (verre ou polystyrène). Ces données illustrent l'importance d'étudier la formation de biofilms directement à partir des dispositifs médicaux servant en pratique clinique, et d'employer une approche expérimentale la plus proche possible des conditions cliniques (Ferrières *et al*., 2007).

Par ailleurs, l'adhérence des UPEC à la surface des cellules vésicales, peut mener à leur internalisation et à la constitution de biofilms intracellulaires responsables de cystites récidivantes (Hannan *et al*., 2012). Nos travaux indiquent que les *E. coli* isolés d'IOAMs ne semblent pas capables d'induire leur propre invasion dans les cellules ostéoblastiques, et que leur adhérence à ce type cellulaire semble très limitée. Les ostéoblastes sont des cellules qui ont une activité métabolique importante, associée à la synthèse d'une matrice extracellulaire osseuse et à sa minéralisation. Les cellules ostéoblastiques n'expriment probablement pas les mêmes récepteurs membranaires que les cellules vésicales. Il est tout de même possible que, comme nous l'avons vu précédemment, certaines adhésines (de type S/F1C notamment), habituellement très prévalentes chez les UPEC, puissent interragir avec ces deux types cellulaires. Néanmoins, les données disponibles sur l'interaction de *S. aureus* avec les ostéoblastes mettent en évidence le rôle déterminant des protéines de la famille MSCRAMMs, capables de lier les protéines de la matrice extracellulaire, dans l'internalisation de la bactérie par les ostéoblastes (Wright *et* Nair, 2010). Les protéines de liaison à la fibronectine (FnbpA/FnbpB) de *S. aureus* semblent, en particulier, très impliquées dans ce processus. Ces données permettent de suggérer que les fibres amyloïdes curli, largement présentes chez *E. coli*, et capables de se fixer à des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, pourraient jouer un rôle fonctionnel dans l'adhérence de *E. coli* au tissu osseux (Henderson *et al*., 2011). La biosynthèse de ces fibres amyloïdes est étroitement régulée par différents facteurs environnementaux (Evans *et* Chapman, 2014). De récentes études attestent d'un rôle majeur des curli dans la colonisation des surfaces et le développement ultérieur de biofilm, ainsi que dans la virulence des UPEC (Kai-Larsen *et al*., 2010 ; Hung *et al*., 2014). D'après Hung *et al*, les UPEC capables de produire des curli à

37°C, pourraient migrer plus facilement du tractus urinaire vers le sang (Hung *et al*., 2014). Ces fibres amyloïdes stimulent la production de médiateurs de l'inflammation et protègent de l'effet bactéricide de peptides antimicrobiens (LL-37) produits par les cellules urothéliales ou les polynucléaires neutrophiles. Nos travaux montrent qu'une grande partie des souches de *E. coli* issues d'IOAM fixaient le colorant rouge congo, habituellement employé pour la détection *in vitro* des fibres curli, mais détectant aussi des polymères extracellulaires de cellulose (Hung *et al*., 2014). L'expression combinée des curli et de cellulose est un phénotype commun chez les UPEC, et d'après Kai-Larsen *et al*, cette cellulose extracellulaire pourrait, en masquant les fibres curli, réduire l'adhérence des UPEC aux cellules épithéliales vésicales ou rénales, et peut être expliquer la faible adhérence de nos *E. coli* aux cellules ostéoblastiques, dans nos conditions expérimentales (Kai-Larsen *et al*., 2010). Ainsi, plusieurs données de la littérature laissent supposer que les fibres amyloïdes curli ou d'autres structures membranaires similaires, pourraient être impliquées dans la physiopathologie des IOAMs à *E. coli*. Cependant, d'autres explorations seront nécessaires pour préciser le rôle de telles structures dans l'adhérence des *E. coli* responsables d'IOAMs aux cellules osseuses, et/ou dans l'échappement au système immunitaire inné.

Les infections ostéo-articulaires sont le plus souvent associées à une destruction osseuse dont l'importance dépend de l'état clinique de l'hôte et des capacités intrinsèques invasives de la bactérie incriminée. L'infection des ostéoblastes et ostéoclastes par *S. aureus* induit une sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires et accroît la résorption osseuse (Marriott, 2004). Cette réponse inflammatoire et l'ostéoclastogénèse induite sont liées en partie à l'activation de récepteurs TNFR1 des ostéoblastes par la protéine A de surface de *S. aureus* (Claro *et al*., 2013). Plusieurs études ont montré que le LPS de *E. coli* pouvait générer, après fixation sur les récepteurs TNFR1 et/ou TLR4 des ostéoblastes, des signaux responsables d'une perte osseuse (Inada *et al*., 2006 ; Ochi *et al*., 2010 ; Guo *et al*., 2014). Lors de nos travaux, nous avons en effet observé une surexpression des gènes IL-6 et TNF-α par les cellules ostéoblastiques infectées, avec toutefois des variations de réponse en fonction des souches bactériennes infectantes (*S. aureus*, *P. aeruginosa* ou *E. coli*). Une réponse pro-inflammatoire de moindre intensité a, en particulier, été observée pour les ostéoblastes infectés par les souches de *E. coli* les moins adhérentes aux cellules. Toutefois, le pouvoir pathogène de *E. coli* vis-à-vis des ostéoblastes est surtout à relier à l'expression de facteurs de virulence. En effet, il a été expérimentalement montré que *S. aureus* avait la capacité de sécréter, après invasion des ostéoblastes, différentes enzymes ou toxines, dont des phénol-

soluble modulines de type α, capables de lyser les ostéoblastes (Rasigade *et al*., 2013). Comme nous l'avons vu précédemment, un certain nombre de facteurs cytotoxiques (HlyA, CNF1, Sat, Vat, Usp…) est communément exprimé par les UPEC. Nous montrons pour la première fois, la puissante activité cytolytique de l'alpha-hémolysine HlyA sécrétée par certains *E. coli*, vis-à-vis des ostéoblastes. Cette cytolysine appartient à la même classe de toxines que les PSMs de type α de *S. aureus* (seules "pore-forming toxins" caractérisées comme capables de lyser les ostéoblastes), mais présente une action lytique beaucoup plus rapide, indépendante de l'internalisation des bactéries (Rasigade *et al*., 2013). Cette toxine, détectée chez environ 50% des UPEC, présente un spectre d'action très large (cellules urothéliales, érythrocytes, polynucléaires neutrophiles, ostéoblastes…) et pourrait provoquer d'importants dommages tissulaires (Wiles *et* Mulvey, 2013). Il est concevable que la production d'HlyA puisse augmenter la gravité des IOAMs, mais de nouvelles investigations appréciant de façon prospective, la relation entre la production de cette cytolysine et la sévérité et/ou l'évolution défavorable des IOAMs concernées, seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Nos résultats révèlent par ailleurs, que ce facteur de virulence peut être faiblement exprimé chez certaines souches. Il sera donc souhaitable de déterminer sous quelles conditions cette protéine manifeste des propriétés cytolytiques ou sublytiques, pour faire de cette cytolysine un éventuel facteur pronostic d'infection sévère.

D. Prise en charge des IOAMs à *E. coli*

La prise en charge des IOAMs est complexe, à la fois chirurgicale et médicale. Il n'existe pas de recommandations chirurgicales spécifiques d'une espèce bactérienne ; cependant, plusieurs études cliniques apportent des éléments de réponse pour le choix des procédures chirurgicales et des traitements antibiotiques, dans le cadre d'infections à bacilles à Gram négatif. L'étude de Hsieh *et al* est l'une des premières à s'être intéressée au devenir des patients infectés par des bacilles à Gram négatifs (53 cas d'infections de prothèses analysés de façon rétrospective, dont 27 (51%) épisodes traités par débridement-lavage). Les auteurs ont mis en évidence un risque important d'évolution défavorable (73%), en cas de traitement chirurgical conservateur (Hsieh *et al*., 2009). Néanmoins, ces résultats ont été contestés, parce que cette solution chirurgicale était proposée trop tardivement dans plusieurs cas (après apparition d'une fistule chez 6 patients), et parce que le nombre d'infections à *P. aeruginosa* était excessivement élevé dans cette étude (21/53, soit 40%) (Uçkay *et* Bernard, 2010). Dans une autre série rétrospective de 47 infections aiguës de prothèses à bacilles à

Gram négatif traitées par débridement-lavage, Martinez-Pastor *et al* ont rapporté l'efficacité de cette modalité thérapeutique dans 74,5% des cas, puis ce pourcentage a été corrigé à 63,8% par Jaen *et al* après un suivi à plus long terme (plus de 3 ans) (Martinez-Pastor *et al*., 2009 ; Jaen *et al*., 2012). Un taux de succès de l'ordre de 70% (7/10) a également été rapporté par Zmistowski *et al*, lors de l'étude rétrospective de 31 infections de prothèses à bacilles à Gram négatif, dont 10 (32%) traitées par débridement-lavage (Zmistowski *et al*., 2011). De même, dans l'étude d'Aboltins *et al*, une évolution favorable était constatée dans 15 des 17 cas (88%) d'infections précoces (moins de 3 mois) de prothèses à bacilles à Gram négatif, ayant bénéficié d'un traitement conservateur (Aboltins *et al*., 2011). Enfin, l'intérêt du débridement-lavage a été confirmé très récemment, par Rodriguez-Pardo *et al*, lors de l'étude rétrospective d'une très grande cohorte d'IOAMs à bacilles à Gram négatif (174 infections traitées par débridement-lavage, dont 63 (30%) à *E. coli* ; 68% de réussite après un suivi médian de 25 mois, voire 79% de réussite pour les infections traitées par ciprofloxacine et impliquant des bactéries sensibles aux fluoroquinolones) (Rodriguez-Pardo *et al*., 2014). Ainsi, cette approche chirurgicale suscite un vif intérêt dans le cadre du traitement d'IOAMs à bacilles à Gram négatif, en association avec une antibiothérapie par fluoroquinolone, et a plus été discutée que le changement de prothèse en un ou deux temps, ou la dépose définitive de prothèse. Ce type de traitement chirurgical, moins invasif et de moindre coût, se prête assez bien aux infections à bacilles à Gram négatif, qui surviennent le plus souvent sous forme aiguë. Ainsi, 72% des 242 cas d'IOAMs à bacilles à Gram négatif étudiés par Rodriguez-Pardo *et al*, étaient traités par débridement-lavage (Rodriguez-Pardo *et al*., 2014). 47% (14/30) des patients inclus dans notre étude ont bénéficié de ce type de traitement chirurgical, mais nous n'avons pas pu exploiter et/ou recueillir les données d'évaluations cliniques, avec un recul suffisant, pour juger de l'évolution de ces infections. Toutefois, plusieurs résultats de nos recherches fondamentales laissent supposer que cette modalité de prise en charge chirurgicale pourrait être efficace dans le contexte d'IOAMs à *E. coli* : i) faible potentiel "biofilmogène" des souches de *E. coli* isolées dans ce contexte, ii) faible adhérence et très faible internalisation des *E. coli* dans les ostéoblastes, iii) forte virulence de la plupart des souches et tableaux cliniques d'infections aiguës.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

La chirurgie orthopédique prothétique a vu son activité augmenter de façon importante ces dernières années dans de nombreux pays. Ces techniques ont permis d'améliorer de façon importante la qualité de vie de centaines de milliers de patients à travers le monde. Malgré des progrès considérables dans la prévention des risques de complications, le nombre d'IOAMs devrait continuer à croître ces prochaines années, compte tenu du vieillissement de la population et de l'augmentation du nombre d'arthroplasties chez les personnes âgées. Cette situation pourrait s'accompagner d'une progression de l'incidence des IOAMs à bacilles à Gram négatif, favorisées par les nombreuses comorbidités chez ces sujets. Pourtant, les connaissances scientifiques accumulées ces dernières années sur les infections à bacilles à Gram négatif demeurent assez maigres, et basées essentiellement sur des données cliniques et épidémiologiques.

Notre étude est la première à s'intéresser à la physiopathogenèse des IOAMs à *E. coli*. Les résultats obtenus au cours de ce travail de Thèse montrent que les infections urinaires représentent une source fréquente d'IOAMs à *E. coli*, par diffusion hématogène. Nos travaux soulignent la virulence des souches de *E. coli* isolées dans ce contexte, en corrélation avec une symptomatologie clinique bruyante. Nous mettons en évidence l'effet cytolytique rapide des *E. coli* producteurs d'alpha-hémolysine, vis-à-vis des ostéoblastes et des polynucléaires neutrophiles. Une nouvelle étude prospective multicentrique pourrait être entreprise afin d'évaluer si cette cytolysine est associée à des lésions tissulaires ou osseuses plus importantes, ou à des formes cliniques plus sévères, auquel cas ce facteur de virulence pourrait être utilisé comme marqueur prédictif de sévérité. Par ailleurs, nos résultats montrent que la plupart des *E. coli* responsables d'IOAMs parviennent à échapper à l'activité bactéricide du système du complément, impliqué dans la réponse immunitaire précoce à l'infection. Cette caractéristique particulière distingue ces derniers d'autres *E. coli* isolés de bactériémies non compliquées d'IOAMs et pourrait jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des IOAMs à *E. coli*. D'autres investigations seront nécessaires afin de déterminer si cette propriété favorise l'ensemencement des tissus périprothétiques, et/ou si elle est directement liée au processus infectieux local.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

Aboltins, C.A., Dowsey, M.M., Buising, K.L., Peel, T.N., Daffy, J.R., Choong, P.F., Stanley, P.A.. 2011. Gram-negative prosthetic joint infection treated with debridement, prosthesis retention and antibiotic regimens including a fluoroquinolone. Clin. Microbiol. Infect. 17 : 862-7

Aboltins, C., Daffy, J., Choong, P., Stanley, P.. 2014. Current concepts in the management of prosthetic joint infection. Intern. Med. J. 44 : 834-40

Achermann, Y., Stasch, P., Preiss, S., Lucke, K., Vogt, M.. 2014. Characteristics and treatment outcomes of 69 cases with early prosthetic joint infections of the hip and knee. Infection. 42 : 511-9

Achermann, Y., Goldstein, E.J., Coenye, T., Shirtliff, M.E.. 2014. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 27 : 419-40

Ahmed, N., Dobrindt, U., Hacker, J., Hasnain, S.E.. 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. Nat. Rev. Microbiol. 6 : 387-94

Al-Hasan, M.N., Eckel-Passow, J.E., Baddour, L.M.. 2010. Bacteremia complicating Gram-negative urinary tract infections: a population-based study. J. Infect. 60 : 278-85

Al-Mayahi, M., Betz, M., Muller, D.A., Stern, R., Tahintzi, P., Bernard, L., Hoffmeyer, P., Suva, D., Uckay, I.. 2013. Remission rate of implant-related infections following revision surgery after fractures. Int. Orthop. 37 : 2253-8

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., Zychlinsky, A.. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annu. Rev. Immunol. 30 : 459-89

Ascione, T., Pagliano, P., Mariconda, M., Rotondo, R., Balato, G., Toro, A., Barletta, V., Conte, M., Esposito, S.. 2014. Factors related to outcome of early and delayed prosthetic joint infections. J. Infect. [Epub ahead of print]

Bäckhed, F., Alsen, B., Roche, N., Angström, J., Von Euler, A., Breimer, M.E., Westerlund-Wikström, B., Teneberg, S., Richter-Dahlfors, A.. 2002. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. J. Biol. Chem. 277 : 18198-205

Bar-Shavit, Z.. 2008. Taking a Toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. Autoimmunity. 41 : 195-203

Barberan, J.. 2006. Management of infections of osteoarticular prosthesis. Clin. Microbiol. Infect. 12 : 93-101

Barbieri, N.L., Nicholson, B., Hussein, A., Cai, W., Wannemuehler, Y.M., Dell'Anna, G., Logue, C.M., Horn, F., Nolan, L.K., Li, G.. 2014. FNR regulates the expression of important virulence factors contributing to the pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 82 : 5086-98

Barnhart, M.M., Chapman, M.R.. 2006. Curli biogenesis and function. Annu. Rev. Microbiol. 60 : 131-47

Barrett, L., Atkins, B.. 2014. The clinical presentation of prosthetic joint infection. J. Antimicrob. Chemother. 69 Suppl 1 : i25-i27

Bémer, P., Plouzeau, C., Tande, D., Léger, J., Giraudeau, B., Valentin, A.S., Jolivet-Gougeon, A., Vincent, P., Corvec, S., Gibaud, S., Juvin, M.E., Héry-Arnaud, G., Lemarié, C., Kempf, M., Bret, L., Quentin, R., Coffre, C., De Pinieux, G., Bernard, L., Burucoa, C., and the CRIOGO study team. 2014. Evaluation of 16S rDNA PCR sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic-joint infection: a prospective multicenter cross-sectional study. J. Clin. Microbiol. 52 : 3583-9

Blom, A.M., Hallström, T., Riesbeck, K.. 2009. Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. Mol. Immunol. 46 : 2808-17

Bouvet, C., Tchernin, D., Seirafi, M., Stern, R., Lew, D., Hoffmeyer, P., Uçkay, I.. 2011. No need to search for the source of haematogenous arthroplasty infections. Swiss Med. Wkly. 141 : w13306

Bouvet, C., Lübbeke, A., Bandi, C., Pagani, L., Stern, R., Hoffmeyer, P., Uçkay, I.. 2014. Is there any benefit in pre-operative urinary analysis before elective total joint replacement? Bone Joint J. 96 : 390-4

Bower, J.M., Gordon-Raagas, H.B., Mulvey, M.A.. 2009. Conditioning of uropathogenic *Escherichia coli* for enhanced colonization of host. Infect. Immun. 77 : 2104-12

Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R.. 2013. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. Biomaterials. 34 : 8533-54

Cazanave, C., Greenwood-Quaintance, K.E., Hanssen, A.D., Karau, M.J., Schmidt, S.M., Gomez Urena, E.O., Mandrekar, J.N., Osmon, D.R., Lough, L.E., Pritt, B.S., Steckelberg, J.M., Patel, R.. 2013. Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. J. Clin. Microbiol. 51 : 2280-7

Chassin, C., Vimont, S., Cluzeaud, F., Bens, M., Goujon, J.M., Fernandez, B., Hertig, A., Rondeau, E., Arlet, G., Hornef, M.W., Vandewalle, A.. 2008. TLR4 facilitates translocation of bacteria across renal collecting duct cells. J. Am. Soc. Nephrol. 19 : 2364-74

Claro, T., Widaa, A., McDonnell, C., Foster, T.J., O'Brien, F.J., Kerrigan, S.W.. 2013. *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. Microbiology. 159 : 147-54

Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., Frankel, G.. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes. 3 : 71-87

Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E.. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 4555-4558

Cordero-Ampuero, J., De Dios, M.. 2010 What are the risk factors for infection in hemiarthroplasties and total hip arthroplasties ? Clin. Orthop. Relat. Res. 468 : 3268-77

Cordero-Ampuero, J., Gonzalez-Fernandez, E., Martinez-Velez, D., Esteban, J.. 2013. Are antibiotics necessary in hip arthroplasty with asymptomatic bacteriuria ? Seeding risk with/without treatment. Clin. Orthop. Relat. Res. 471 : 3822-9

Corvec, S., Illiaquer, M., Touchais, S., Boutoille, D., Van der Mee Marquet, N., Quentin, R., Reynaud, A., Lepelletier, D., Bémer, P., Bone and joint infection study group. 2011. Clinical features of group B *Streptococcus* prosthetic joint infections and molecular characterization of isolates. J. Clin. Microbiol. 49 : 380-2

Corvec, S., Portillo, M.E., Pasticci, B.M., Borens, O., Trampuz, A.. 2012. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. Int. J. Artif. Organs. 35 : 923-34

Crémet, L., Corvec, S., Batard, E., Auger, M., Lopez, I., Pagniez, F., Dauvergne, S., Caroff, N.. 2013. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75 : 252-5

Cross, M.C., Kransdorf, M.J., Chivers, F.S., Lorans, R., Roberts, C.C., Schwartz, A.J., Beauchamp, C.P.. 2014. Utility of percutaneous joint aspiration and synovial biopsy in identifying culture-positive infected hip arthroplasty. Skeletal Radiol. 43 : 165-8

Davis, J.M., Carvalho, H.M., Rasmussen, S.B., O'Brien, A.D.. 2006. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. Infect. Immun. 74 : 4401– 4408

Delpino, M.V., Fossati, C.A., Baldi, P.C.. 2009. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. Infect. Immun. 77 : 984-95

De Sanctis, J., Teixeira, L., Van Duin, D., Odio, C., Hall, G., Tomford, J.W., Perez, F., Rudin, S.D., Bonomo, R.A., Barsoum, W.K., Joyce, M., Krebs, V., Schmitt S.. 2014. Complex prosthetic joint infections due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a unique challenge in the era of untreatable infections. Int. J. Infect. Dis. 25 : 73-8

Ekdahl, K.N., Lambris, J.D., Elwing, H., Ricklin, D., Nilsson, P.H., Teramura, Y., Nicholls, I.A., Nilsson, B.. 2011. Innate immunity activation on biomaterial surfaces: a mechanistic model and coping strategies. Adv. Drug Deliv. Rev. 63 : 1042-50

Elizabeth, E., Baranwal, G., Krishnan, A.G., Menon, D., Nair, M.. 2014. ZnO nanoparticule incorporated nanostructured metallic titanium for increased mesenchymal stem cell response and antibacterial activity. Nanotechnology. 25 : 115101

El Tahir, Y., Skurnik, M.. 2001. YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. Int. J. Med. Microbiol. 291 : 209-18

Evans, M.L., Chapman, M.R.. 2014. Curli biogenesis: order out of disorder. Biochim. Biophys. Acta. 1843 : 1551-8

Ferrières, L., Hancock, V., Klemm, P.. 2007. Specific selection for virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains during catheter-associated biofilm formation. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51 : 212-9

Gallo, J., Holinka, M., Moucha, C.S.. 2014. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. Int. J. Mol. Sci. 15 : 13849-80

Garcia, T.A., Ventura, C.L., Smith, M.A., Merrell, D.S., O'Brien, A.D.. 2013. Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. Infect. Immun. 81 : 99-109

Grammatico-Guillon, L., Baron, S., Gaborit, C., Rosset, P., Rusch, E., Bernard, L.. 2013. Letter in response to the article on bone and joint infection in the United States : French data. J. Arthorplasty. 28 : 1055

Grosz, M., Kolter, J., Paprotka, K., Winkler, A.C., Schäfer, D., Chatteriee, S.S., Geiger, T., Wolz, C., Ohlsen, K., Otto, M., Rudel, T., Sinha, B., Fraunholz, M.. 2014. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape trigerred by phenol-soluble modulin-α. Cell. Microbiol. 16 : 451-65

Guo, C., Yuan, L., Wang, J.G., Wang, F., Yang, X.K., Zhang, F.H., Song, J.L., Ma, X.Y., Cheng, Q., Song, G.H.. 2014. Lipopolysaccharide (LPS) induces the apoptosis and inhibits osteoblast differentiation through JNK pathway in MC3T3-E1 cells. Inflammation 37 : 621-31

Hair, P.S., Foley, C.K., Krishna, N.K., Nyalwidhe, J.O., Geoghegan, J.A., Foster, T.J., Cunnion, K.M.. 2013. Complement regulator C4BP binds to *Staphylococcus aureus* surface proteins SdrE and Bbp inhibiting bacterial opsonization and killing. Results Immunol. 3 : 114-21

Hallström, T., Blom, A.M., Zipfel, P.F., Riesbeck, K.. 2009. Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. J. Immunol. 183 : 2593-601

Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R.. 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair river and Detroit river areas. Appl. Environ. Microbiol. 73 : 477-84

Hamza, T., Li, B.. 2014. Differential responses of osteoblasts and macrophages upon *Staphylococcus aureus* infection. BMC Microbiol. 14 : 207

Hannan, T.J., Totsika, M., Mansfield, K.J., Moore, K.H., Schembri, M.A., Hultgren, S.J.. 2012. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. FEMS Microbiol. Rev. 36 : 616-48

Hartley, J.C., Harris, K.A. 2014. Molecular techniques for diagnosing prosthetic joint infections. J. Antimicrob. Chemother. 69 Suppl 1 : i21-i24

Haute Autorité de Santé (HAS) *et al*. 2014. Recommandation de bonne pratique - Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation. www.has-sante.fr

Hejnova, J., Dobrindt, U., Nemcova, R., Rusniok, C., Bomba, A., Frangeul, L., Hacker, J., Glaser, P., Sebo, P., Buchrieser, C.. 2005. Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83:K24:H31). Microbiology 151 : 385-98

Henderson, B., Nair, S., Pallas, J., Williams, M.A.. 2011. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. FEMS Microbiol. Rev. 35 : 147-200

Hsieh, P.H., Lee, M.S., Hsu, K.Y., Chang, Y.H., Shih, H.N. and Ueng, S.W.. 2009. Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. Clin. Infect. Dis. 49 : 1036-1043

Hung, C., Marschall, J., Burnham, C.A., Byun, A.S., Henderson, J.P.. 2014. The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. PLoS One. 9 : e86009

Hunstad, D.A., Justice, S.S.. 2010. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. 64 : 203-21

Ibnoulkhatib, A., Lacroix, J., Moine, A., Archambaud, M., Bonnet, E., Laffosse, J.M., CRIOAC-GSO.. 2012. Post-traumatic bone and/or joint limb infections due to *Clostridium* spp. Orthop. Traumatol. Surg. Res. 98 : 696-705

Inada, M., Matsumoto, C., Uematsu, S., Akira, S., Miyaura, C.. 2006. Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. J. Immunol. 177 : 1879-85

Itoh, Y., Rice, J.D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J., Beveridge, T. J., Preston III, J. F. and Romeo, T.. 2008. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin Poly-β-1,6-*N*-Acetyl-$_D$-Glucosamine. J. Bacteriol. 190 : 3670-3680

Izquierdo, M., Alvestegui, A., Nataro, J.P., Ruiz-Perez, F., Farfan, M.J.. 2014. Participation of integrin α5β1 in the fibronectin-mediated adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to intestinal cells. BioMed Res. Int. [Epub ahead of print]

Jaen, N., Martinez-Pastor, J.C., Munoz-Mahamud, E., Garcia-Ramiro, S., Bosch, J., Mensa, J., Soriano, A.. 2012. Long-term outcome of acute prosthetic joint infections due to Gram-negative bacilli treated with retention of prosthesis. Rev. Esp. Quimioter. 25 : 194-8

Jandhyala, D.M., Vanguri, V., Boll, E.J., Lai, Y., McCormick, B.A., Leong, J.M.. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: an emerging pathogen with enhanced virulence. Infect. Dis. Clin. North Am. 27 : 631-49

Jauréguy, F., Carbonnelle, E., Bonacorsi, S., Clec'h, C., Casassus, P., Bingen, E., Picard, B., Nassif, X., Lortholary, O.. 2007. Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. Clin. Microbiol. Infect. 13 : 854-62

Johnson, J.R., Russo, T.A.. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". J. Lab. Clin. Med. 139 : 155-162

Johnson, J.R., Owens, K., Gajewski, A., Kuskowski, M.A.. 2005. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J. Clin. Microbiol. 43 : 6064-72

Jorgensen, I., Seed, P.C.. 2012. How to make it in the urinary tract: a tutorial by *Escherichia coli*. PLoS Pathog. 8 : e1002907

Kai-Larsen, Y., Lüthje, P., Chromek, M., Peters, V., Wang, X., Holm, A., Kadas, L., Hedlund, K.O., Johansson, J., Chapman, M.R., Jacobson, S.H., Römling, U., Agerberth, B., Brauner, A.. 2010. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. PLoS Pathog. 6 : e1001010

Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D., Hansen, U., Niemann, S., Oetermann, S., Peters, G., Löffler, B., Tuchscherr, L.. 2014. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. Int. J. Med. Microbiol. [Epub ahead of print]

Kalynych, S., Yao, D., Magee, J., Cygler, M.. 2012. Structural characterization of closely related O-antigen lipopolysaccharide (LPS) chain length regulators. J. Biol. Chem. 287 : 15696-705

Kang, M., Ko, Y.P., Liang, X., Ross, C.L., Liu, Q., Murray, B.E., Höök, M.. 2013. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation *via* the classical pathway. J. Biol. Chem. 288 : 20520-31

Kartsogiannis, V., Ng, K.W.. 2004. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. Mol. Cell. Endocrinol. 228 : 79-102

Köhler, C.D., Dobrindt, U.. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int. J. Med. Microbiol. 301 : 642-7

Konigsberg, B.S., Della Valle, C.J., Ting, N.T., Qiu, F., Sporer, S.M.. 2014. Acute hematogenous infection following total hip and knee arthroplasty. J. Arthroplasty 29 : 469-72

Kostakioti, M., Stathopoulos, C.. 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli strain*. Infect. Immun. 72 : 5548-5554

Koulouvaris, P., Sculco, P., Finerty, E., Sculco, T., Sharrock, N.E.. 2009. Relationship between perioperative urinary tract infection and deep infection after joint arthroplasty. Clin. Orthop. Relat. Res. 467 : 1859-67

Kurtz, S.M., Lau, E., Watson, H., Schmier, J.K., Parvizi, J.. 2012. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. J. Arthorplasty. 27 : 61-5

Lambris, J.D., Ricklin, D., Geisbrecht, B.V.. 2008. Complement evasion by human pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 6 : 132-142

Landraud, L., Gibert, M., Popoff, M.R., Boquet, P., Gauthier, M.. 2003. Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. Mol. Microbiol. 47 : 1653-67

Lau, M.E., Loughman, J.A., Hunstad, D.A.. 2012. YbcL of uropathogenic *Escherichia coli* suppresses transepithelial neutrophil migration. Infect. Immun. 80 : 4123-32

Leeds, J.A., Welch, R.A.. 1997. Enhancing transcription through the *Escherichia coli* hemolysin operon, *hlyCABD*: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. J. Bacteriol. 179 : 3519-27

Li, D., Liu, B., Chen, M., Guo, D., Guo, X., Liu, F., Feng, L., Wang, L.. 2010. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. J. Microbiol. Methods 82 : 71-7

Lillington, J., Geibel, S., Waksman, G.. 2014. Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. Biochim. Biophys. Acta. 1840 : 2783-93

Liu, Y.F., Yan, J.J., Lei, H.Y., Teng, C.H., Wang, M.C., Tseng, C.C., Wu, J.J.. 2012. Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. Infect. Immun. 80 : 1815-22

Lloyd, A.L., Rasko, D.A., Mobley, L.T.. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 189 : 3532-46

Lloyd, A.L., Henderson, T.A., Vigil, P.D., Mobley, H.L.. 2009. Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. J. Bacteriol. 191 : 3469-81

Lora-Tamayo, J., Murillo, O., Iribarren, J.A., Soriano, A., Sanchez-Somolinos, M., Baraia-Etxaburu, J.M., Rico, A., Palomino, J., Rodriguez-Pardo, D., Horcajada, J.P., Benito, N., Bahamonde, A., Granados, A., Del Toro, M.D., Cobo, J., Riera, M., Ramos, A., Jover-Saenz, A., Ariza, J., REIPI Group for the study of Prosthetic Infection. 2013. A large multicenter study of meticillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. Clin. Infect. Dis. 56 : 182-94

Loughman, J.A., Hunstad, D.A.. 2011. Attenuation of human neutrophil migration and function by uropathogenic bacteria. Microbes Infect. 13 : 555-565

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S.. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol. 11 : 519-31

Marriott, I.. 2004. Osteoblast responses to bacterial pathogens. Immunol. Res. 30 : 291-308

Marschall, J., Zhang, L., Foxman, B., Warren, D.K., Henderson, J.P., CDC Prevention Epicenters Program.. 2012. Both host and pathogen factors predispose to *Escherichia coli* urinary-source bacteremia in hospitalized patients. Clin. Infect. Dis. 54 : 1692-8

Martinez-Pastor, J.C., Munoz-Mahamud, E., Vilchez, F., Garcia-Ramiro, S., Bori, G., Sierra, J., Martinez, J.A., Font, L., Mensa, J., Soriano, A.. 2009. Outcome of acute prosthetic joint infections due to Gram-negative bacilli treated with open debridement and retention of the prosthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 53 : 4772-7

McNally, A., Alhashash, F., Collins, M., Algasim, A., Paszckiewicz, K., Weston, V., Diggle, M.. 2013. Genomic analysis of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* urosepsis. Clin. Microbiol. Infect. 19 : E328-34

Miajlovic, H., Smith, S.G.. 2014. Bacterial self-defense: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol. Lett.* 354 : 1-9

Morand, P.C., Billoet, A., Rottman, M., Sivadon-Tardy, V., Eyrolle, L., Jeanne, L., Tazi, A., Anract, P., Courpied, J.P., Poyart, C., Dumaine, V.. 2009. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. J. Clin. Microbiol. 47 : 2489-95

Murdoch, D.R., Roberts, S.A., Fowler, V.G. Jr., Shah, M.A., Taylor, S.L., Morris, A.J., Corey, G.R.. 2001. Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin. Infect. Dis. 32 : 647–649

Mysorekar, I.U., Hultgren, S.J.. 2006. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103 : 14170-5

Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, M., Ponte Mdel, C., Soriano, F.. 2008. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. Microb. Pathog. 45 : 86-91

Ning, R., Zhang, X., Guo, X., Li, Q.. 2011. *Staphylococcus aureus* regulates secretion of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 through activation of nuclear factor kappaB signaling pathway in human osteoblasts. Braz. J. Infect. Dis. 15 : 189-94

Ochi, H., Hara, Y., Tagawa, M., Shinomiya, K., Asou, Y.. 2010. The roles of TNFR1 in lipopolysaccharide-induced bone loss: dual effects of TNFR1 on bone metabolism via osteoclastogenesis and osteoblast survival. J. Orthop. Res. 28 : 657-63

Ollivier, M., Senneville, E., Drancourt, M., Argenson, J. N., Migaud, H.. 2014. Potential changes to French recommendations about peri-prosthetic infections based on the international consensus meeting (ICMPJI). Orthop. Traumatol. Surg. Res. 100 : 583-7

Osmon, D.R., Berbari, E.F., Berendt, A.R., Lew, D., Zimmerli, W., Steckelberg, J.M., Rao, N., Hanssen, A., Wilson, W.R., Infectious Diseases Society of America. 2013. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 56 : e1-e25

Otto, M.. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu. Rev. Med. 64 : 175-88

Otto, M.. 2014. Phenol-soluble modulins. Int. J. Med. Microbiol. 304 : 164-9

Parvizi, J., Gehrke, T., Chen, A.F.. 2013. Proceedings of the international consensus on periprosthetic joint infection. Bone Joint J. 95 : 1450–2

Parvizi, J., Gehrke, T.. 2014. International consensus on periprosthetic joint infection: let cumulative wisdom be a guide. J. Bone Joint Surg. Am. 96 : 441

Peel, T.N., Cheng, A.C., Buising, K.L., Choong, P.F.. 2012. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? Antimicrob. Agents Chemother. 56 : 2386-91

Petkovsek, Z., Elersic, K., Gubina, M., Zgur-Bertok, D. and Erjavec, M. S.. 2009. Virulence potential of *Escherichia coli* isolates from skin and soft tissue infections. J. Clin. Microbiol. 47 : 1811-1817

Phan, M.D., Peters, K.M., Sarkar, S., Lukowski, S.W., Allsopp, L.P., Moriel, D.G., Achard, M.E.S., Totsika, M., Marshall, V.M., Upton, M., Beatson, S.A., Schembri, M.A.. 2013.

The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. PLoS Genet. 9 : e1003834

Platell, J.L., Trott, D.J., Johnson, J.R., Heisig, P., Heisig, A., Clabots, C.R., Johnston, B., Cobbold, R.N.. 2012. Prominence of an O75 clonal group (clonal complex 14) among non-ST131 fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* causing extraintestinal infections in humans and dogs in Australia. Antimicrob. Agents Chemother. 56 : 3898-904

Proctor, R.A., Kriegeskorte, A., Kahl, B.C., Becker, K., Löffler, B., Peters, G.. 2014. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathway involved in persistent infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4 : 99

Pulido, L., Ghanem, E., Joshi, A., Purtill, J.J., Parvizi, J.. 2008. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. Clin. Orthop. Relat. Res. 466 : 1710-5

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R.. 2004. Recognition of commensal microflora by Toll-Like Receptors is required for intestinal homeostasis. Cell 118 : 229-241

Rasigade, J.P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., Diep, B.A., Sapin, A., Lhoste, Y., Ranfaing, J., Badiou, C., Benito, Y., Bes, M., Couzon, F., Tigaud, S., Lina, G., Etienne, J., Vandenesch, F., Laurent, F.. 2013. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. PLoS One 8 : e63176

Rhode, H., Frankenberger, S., Zähringer, U. and Mack, D.. 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. Eur. J. Cell Biol. 89 : 103-111

Ribera, A., Morata, L., Moranas, J., Agullo, J.L., Martinez, J.C., Lopez, Y., Garcia, D., Cabo, J., Garcia-Ramiro, S., Soriano, A., Murillo, O.. 2014. Clinical and microbiological findings in prosthetic joint replacement due to aseptic loosening. J. Infect. 69: 235-43

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D.. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nat. Rev. 11 : 785-97

Riley, L. W.. 2014. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Infect. 20 : 380-90

Rodriguez, D., Pigrau, C., Euba, G., Cobo, J., Garcia-Lechuz, J., Palomino, J., Riera, M., Del Toro, M.D., Granados, A., Ariza, X. on behalf of the REIPI group for the study of prosthetic infection. 2010. Acute haematogenous prosthetic joint infection: prospective evaluation of medical and surgical management. Clin. Microbiol. Infect. 16 : 1789-95

Rodriguez-Pardo, D., Pigrau, C., Lora-Tamayo, J., Soriano, A., Del Toro, M.D., Cobo, J., Palomino, J., Euba, G., Riera, M., Sanchez-Somolinos, M., Benito, N., Fernandez-Sampedro, M., Sorli, L., Guio, L., Iribarren, J.A., Baraia-Etxaburu, J.M., Ramos, A., Bahamonde, A., Flores-Sanchez, X., Corona, P.S., Ariza, J. on behalf of the REIPI group for the study of prosthetic infection. 2014. Gram-negative prosthetic joint infection: outcome of a debridement, antibiotics and implant retention approach. A large multicentre study. Clin. Microbiol. Infect. [Epub ahead of print]

Saeed, K.. 2014. Diagnostics in prosthetic joint infections. J. Antimicrob. Chemother. 69 Suppl 1 : i11-i19

Sanchez, C.J. Jr, Ward, C.L., Romano, D. R., Hurtgen, B.J., Hardy, S.K., Woodbury, R.L., Trevino, A.V., Rathbone, C.R., Wenke, J.C.. 2013. *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption *in vitro*. BMC Musculoskelet. Disord. 14 : 187

Sannes, M. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A. and Johnson, J. R.. 2004. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. J. Infect. Dis. 190 : 2121-2128

Schmidt, H., Hensel, M.. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 17 : 14-56

Scian, R., Barrionuevo, P., Giambartolomei, G.H., Fossati, C.A., Baldi, P.C., Delpino, M.V.. 2011. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with *Brucella abortus*. Infect. Immun. 79 : 192-202

Sendi, P., Frei, R., Maurer, T.B., Trampuz, A., Zimmerli, W., Graber, P.. 2010. *Escherichia coli* variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. J. Clin. Microbiol. 48 : 1720-5

Sendi, P., Christensson, B., Uçkay, I., Trampuz, A., Achermann, Y., Boggian, K., Svensson, D., Widerström, M., Zimmerli, W., GBS PJI study group. 2011a. Group B streptococcus in prosthetic hip and knee joint-associated infections. J. Hosp. Infect. 79 : 64-9

Sendi, P., Banderet, F., Graber, P., Zimmerli, W.. 2011b. Periprosthetic joint infection following *Staphylococcus aureus* bacteremia. J. Infect. 63 : 17–22

Shchukin, D., Möhwald, H.. 2013. Materials science. A coat of many functions. Science. 341 : 1458-9

Shi, S., Zhang, X.. 2012. Interaction of *Staphylococcus aureus* with osteoblasts (review). Exp. Ther. Med. 3 : 367-70

Singh, B., Su, Y.C., Riesbeck, K.. 2010. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. Mol. Microbiol. 78 : 545-60

Smith, Y.C., Rasmussen, S.B., Grande K.K., Conran, R.M., O'Brien, A.D.. 2008. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. Infect. Immun. 76 : 2978-90

Sobieszczanska, B., Kasprzykowska, U., Turniak, M., Maciejewski, H., Franiczek, R., Duda-Madej, A.. 2012. Virulence genes profiles and phylogenetic origin of *Escherichia coli* from acute and chronic intestinal diseases revealed by comparative genomic hybridization microarray. Pol. J. Microbiol. 61 : 105-10

Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR), *et al*.. 2012. Examens pré interventionnels systématiques. www.sfar.org/article/901/examens-pre-interventionnels-systematiques-rfe-2012

Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF), *et al*.. 2009. Recommendations for clinical practice. Osteo-articular infection therapy according to materials used (prosthesis, implants, osteosynthesis). Med. Mal. Infect. 39 : 745-74

Somayaji, S.N., Ritchie, S., Sahraei, M., Marriott, I., Hudson, M.C.. 2008. *Staphylococcus aureus* induces expression of receptor activator of NF-kappaB ligand and prostaglandin E2 in infected murine osteoblasts. Infect. Immun. 76 : 5120-6

Sousa, R., Munoz-Mahamud, E., Quayle, J., Dias da Costa, L., Casals, C., Scott, P., Leite, P., Vilanova, P., Garcia, S., Ramos, M.H., Dias, J., Soriano, A., Guyot, A.. 2014. Is asymptomatic bacteriuria a risk factor for prosthetic joint infection ? Clin. Infect. Dis. 59 : 41-7

Sousa, R., Soriano, A., Guyot, A.. 2014. Reply to Uçkay et al. Clin. Infect. Dis. 59 : 1507-8

Srinivasan, U., Foxman, B., Marrs, C.F.. 2003. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. J. Clin. Microbiol. 41 : 285-9

Stenutz, R., Weintraub, A., Widmalm, G.. 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. FEMS Microbiol. Rev. 30 : 382-403

Subashchandrabose, S., Smith, S.N., Spurbeck, R.R., Kole, M.M., Mobley, H.L.. 2013. Genome-wide detection of fitness genes in uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection. PLoS Pathog. 9 : e1003788

Suda, K., Udagawa, N., Sato, N., Takami, M., Itoh, K., Woo, J.T., Takahashi, N., Nagai, K.. 2004. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. J. Immunol. 172 : 2504-10

Surewaard, B.G., De Haas, C.J., Vervoort, F., Rigby, K.M., DeLeo, F.R., Otto, M., Van Strijp, J.A., Nijland, R.. 2013. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. Cell. Microbiol. 15 : 1427-37

Szijarto, V., Lukasiewicz, J., Gozdziewicz, T.K., Magyarics, Z., Nagy, E., Nagy, G.. 2014. Diagnostic potential of monoclonal antibodies specific to the unique O-antigen of multidrug-resistant epidemic *Escherichia coli* clone ST131-O25b:H4. Clin. Vaccine Immunol. 21 : 930-9

Tan, Y., Kagan, J.C.. 2014. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. Mol. Cell. 54 : 212-23

Tande, A.J., Patel, R.. 2014. Prosthetic joint infection. Clin. Microbiol. Rev. 27 : 302

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E.. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 8 : 207-17

Tornero, E., Garcia-Oltra, E., Garcia-Ramiro, S., Martinez-Pastor, J.C., Bosch, J., Climent, C., Morata, L., Camacho, P., Mensa, J., Soriano, A.. 2012. Prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Int. J. Artif. Organs. 35 : 884-92

Trampuz, A., Zimmerli, W.. 2008. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. Curr. Infect. Dis. Rep. 10 : 394-403

Trouillet-Assant, S., Gallet, M., Nauroy, P., Rasigade, J.P., Flammier, S., Parroche, P., Marvel, J., Ferry, T., Vandenesch, F., Jurdic, P., Laurent, F.. 2014. Dual impact of live *Staphylococcus aureus* on the osteoclast lineage, leading to increased bone resorption. J. Infect. Dis. [Epub ahead of print]

Tsay, T.B., Yang, M.C., Chen, P.H., Hsu, C.M., Chen, L.W.. 2011. Gut flora enhance bacterial clearance in lung through toll-like receptors 4. J. Biomed. Sci. 18 : 68

Tuchscherr, L., Medina, E., Hussain, M., Völker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R.A., Becker, K., Peters, G., Löffler, B.. 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response. EMBO Mol. Med. 3 : 129-41

Tung, H.S., Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K., Ryden, C.. 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. Biochem. J. 345 : 611-9

Uçkay, I., Bernard, L.. 2010. Gram-negative *versus* Gram-positive prosthetic joint infections. Clin. Infect. Dis. 50 : 795

Uçkay, I., Lübbeke, A., Huttner, B.. 2014. Preoperative asymptomatic bacteriuria and subsequent prosthetic joint infection: lack of a causal relation. Clin. Infect. Dis. 59 : 1506-7

Ulett, G.C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A.J., Sweet, M.J., Schembri, M.A.. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. Curr. Opin. Microbiol. 16 : 100-7

Valle, J., Mabbett, A.N., Ulett, G.C., Toledo-Arana, A., Wecker, K., Totsika, M., Schembri, M.A., Ghigo, J.M., Beloin, C.. 2008. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 190 : 4147-61

Valour, F., Trouillet-Assant, S., Rasigade, J.P., Lustig, S., Chanard, E., Meugnier, H., Tigaud, S., Vandenesch, F., Etienne, J., Ferry, T., Laurent, F., Lyon BJI Study Group.. 2013. *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. PLoS One 8 : e67240

Wiles, T.J., Mulvey, M.A.. 2013. The RTX pore-forming α-hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. Future Microbiol. 8 : 73-84

Wooster, D.G., Maruvada, R., Blom, A.M., Prasadarao, N.V.. 2006. Logarithmic phase *Escherichia coli* K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation. Immunology 117 : 482-93

Wright, K.M., Friedland, J.S.. 2002. Differential regulation of chemokine secretion in tuberculous and staphylococcal osteomyelitis. J. Bone Miner. Res. 17 : 1680-90

Wright, K.M., Friedland, J.S.. 2004. Regulation of chemokine gene expression and secretion in Staphylococcus aureus-infected osteoblasts. Microbes Infect. 6 : 844-52

Wright, J.A., Nair, S.P.. 2010. Interaction of staphylococci with bone. Int. J. Med. Microbiol. 300 : 193-204

Xu, L., Xu, W., Xu, G., Jiang, Z., Zheng, L., Zhou, Y., Wei, W., Wu, S.. 2013. Effects of cell surface α2-3 sialic acid on osteogenesis. Glycoconj. J. 30 : 677-85

Yoon, W.J., Heo, S.J., Han, S.C., Lee, H.J., Kang, E.J., Park, S.S., Kang, H.K., Yoo, E.S.. 2012. Sargachromanol G regulates the expression of osteoclastogenic factors in human osteoblast-like MG-63 cells. Food Chem. Toxicol. 50 : 3273-9

Yu, Q., Cho, J., Shivapooja, P., Ista, L.K., Lopez, G.P.. 2013. Nanopatterned smart polymer surfaces for controlled attachment, killing, and release of bacteria. ACS Appl. Mater. Interfaces. 5 : 9295-304

Yun, K.W., Kim, H.Y., Park, H.K., Kim, W., Lim, I.S.. 2013. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. J. Microbiol. Immunol. Infect. [Epub ahead of print]

Zhao, L., Hu, Y., Xu, D., Cai, K.. 2014. Surface functionalization of titanium substrates with chitosan-lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion. Colloids Surf. B: Biointerfaces. 119 : 115-25

Zimmerli, W., Waldvogel, F.A., Vaudaux, P., Nydegger, U.E.. 1982. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. J. Infect. Dis. 146 : 487-97

Zimmerli, W., Sendi, P.. 2011. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. Semin. Immunopathol. 33 : 295-306

Zimmerli, W.. 2012. Orthopaedic device-associated infection. Clin. Microbiol. Infect. 18 : 1160-1

Zimmerli, W.. 2014. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. J. Intern. Med. 276 : 111-9

Zmistowski, B., Fedorka, C.J., Sheehan, E., Deirmengian, G., Austin, M.S., Parvizi, J.. 2011. Prosthetic joint infection caused by Gram-negative organisms. J. Arthroplasty. 26: 104-8

RESUMÉ et MOTS CLÉS

PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES SUR MATÉRIEL À *ESCHERICHIA COLI*.

Les bacilles à Gram négatif sont impliqués dans 6 à 23% des infections ostéo-articulaires sur matériel (IOAM), et *Escherichia coli* est la première cause de ces infections. La pathogénèse des IOAMs à *E. coli* reste encore mal connue. Dans le but de déterminer si les souches de *E. coli* responsables d'IOAMs présentent une virulence spécifique et/ou une capacité particulière à échapper au système immunitaire, 30 souches cliniques de *E. coli* isolées dans ce contexte ont été étudiées. Nos travaux soulignent le fort potentiel pathogène de la majorité des *E. coli* isolés d'IOAMs, et indiquent que des souches de *E. coli* uropathogènes pourraient être responsables, après diffusion hématogène, d'un grand nombre d'IOAMs à *E. coli*. La plupart des *E. coli* isolés d'IOAMs parviennent à échapper à l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles et du système du complément, impliqués dans la réponse précoce à l'infection. Seule une faible proportion des souches semble capable de former du biofilm *in vitro*. Nous montrons aussi la faible adhérence et très faible internalisation des *E. coli* isolés d'IOAMs, dans les cellules ostéoblastiques. Les souches les plus adhérentes induisent la même réponse cytokinique (IL-6 et TNF-α) que des souches de *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, isolées dans le même contexte. Enfin, nos travaux mettent en évidence l'importante activité cytolytique des souches de *E. coli* productrices d'alpha-hémolysine, vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles et des cellules ostéoblastiques.

Mots clés : *Escherichia coli*, ostéoblastes, immunité innée, virulence, alpha-hémolysine, biofilm, adhérence, internalisation

PHYSIOPATHOLOGY OF *ESCHERICHIA COLI* ORTHOPAEDIC IMPLANT INFECTIONS.

Gram-negative bacilli are involved in 6 to 23% of orthopaedic implant infections (OII), and *E. coli* is the first cause of Gram-negative OII. However, the pathogenesis of *E. coli* has not been investigated in this context. To better understand if *E. coli* strains from OII can be distinguished on the basis of a singular virulence and/or an ability to avoid host innate immune responses, 30 clinical strains isolated in this context were studied. Most of the 30 OII *E. coli* showed a high virulence potential, and urinary tract infections and bacteremia represented a common source of implant seeding. Our results highlight the formidable subversive capacities of OII *E. coli* against two major components of the innate immunity, i.e. polymorphonuclear neutrophils and the complement system. Only a few proportion of the strains formed a strong biofilm in our experimental conditions. Furthermore, the OII *E. coli* showed low adherence rates to osteoblastic cells and were poorly internalized. The most adherent strains induced IL-6 or TNF-α responses, which were equivalent to those elicited by *S. aureus* or *P. aeruginosa* strains recovered in the same clinical context. Finally, our study highlighted the high cytolytic potential of the alpha-hemolysin-producing *E. coli* strains towards polymorphonuclear neutrophils and osteoblastic cells.

Keywords: *Escherichia coli*, osteoblasts, innate immunity, virulence, alpha-hemolysin, biofilm, adherence, internalisation

NOM : CREMET Prénom : Lise
Adresse: 7 allée de l'île Gloriette
Code Postal – Ville : 44000 NANTES