

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2008

N°105

THESE

Pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
DES DE BIOLOGIE MEDICALE**

Par

Élodie Barre-Amirault

Née le 3 février 1976 à Suresnes

Présentée et soutenue publiquement
le 20 mars 2008

**ÉTUDE DES FACTEURS PRÉDICTIFS DE L'ACTIVITÉ
IN VIVO DE LA TEICOPLANINE VIS A VIS DES
SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

Président : Monsieur le Professeur Potel

Directeurs de thèse : Dr J. Caillon
Dr E. Batard

Membres du jury : Pr F. Ballereau
Dr N. Caroff

SOMMAIRE	PAGES
Liste des tableaux	5
Liste des figures	6
Liste des abréviations	7
 INTRODUCTION	 8
I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	9
<i>I-1- Staphylococcus epidermidis</i>	10
I-1-1- Habitat	10
I-1-2- Caractères bactériologiques	10
I-1-3- Pouvoir pathogène	11
I-2- Glycopeptides	13
<i>I-2-1-Mode d'action des glycopeptides</i>	13
I-2-2 Pharmacocinétique	15
I-2-3 Elimination	15
<i>I-2-4- Effets indésirables</i>	15
I-2-5- Indications	15
I-2-6- Posologie	16
I-3- Etat actuel de la sensibilité des souches de <i>S. epidermidis</i> aux glycopeptides	16
I-3-1- Détermination des CMI des glycopeptides chez les souches de	17

I-3-2- Sensibilité des staphylocoques à coagulase négative aux glycopeptides	20
I-4- Facteurs d'échecs lors d'un traitement par glycopeptides	22
I-4-1- Résistance aux glycopeptides	22
I-4-2- Tolérance	23
I-4-3- Biofilm	24
I-4-3-1- Formation du biofilm	24
I-4-3-2- Persistance bactérienne liée au biofilm	26
I-4-3-3- Dissémination cellulaire à partir du biofilm – delta toxine	27
I-4-3-4- Régulation de la production de biofilm	28
 II- MATERIEL ET METHODES	 32
II-1- Souches bactériennes	33
II-2- Antibiotique	33
II-3-Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice de la teicoplanine	33
II-3-1 CMI en milieu solide	33
II-3-2 CMI en milieu liquide	34
II-4 Etudes in vivo	34
II-4-1 Etude de la virulence des souches bactériennes	34

II-4-2 Etude de la dose efficace médiane de la teicoplanine (Dose Efficace 50 : DE₅₀)	34
II-4-3 Bactériémie	35
II-5- Autres facteurs prédictifs de l'activité de la teicoplanine	35
II-5-1 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et étude de la tolérance des souches à la teicoplanine	35
II-5-2 Analyse de population	36
II-6- Etude des facteurs de pathogénicité	36
II-6-1- Typage <i>agr</i> par PCR multiplex, amplification des gènes <i>icaA</i> , <i>atlE</i> par PCR	36
II-6-2- Production de biofilm	38
II-6-3- Hémolyse delta	38
II-7- Etude de l'activité autolytique des souches	39
II-7-1 Autolyse sous Triton X-100	39
II-7-2 Etude de l'expression du gène <i>atlE</i> (impliqué dans l'autolyse) par RT-PCR	39
 III- RESULTATS	 41
III-1- Caractéristiques des souches sélectionnées	42
III-2- Etude in vivo	43
III-2-1 Détermination de la DE ₅₀	43
III-2-2- Bactériémie	44
III-3- Autres facteurs prédictifs de l'activité de la teicoplanine	45
III-3-1- Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide et étude de la tolérance des souches à la teicoplanine	45
III-3-2- Analyse de population	46

III-4- Etude des facteurs de pathogénicité	47
III-4-1- Typage <i>agr</i> des souches	47
III-4-2- Recherche du gène <i>icaA</i>	49
III-4-3- Formation de biofilm	50
III-4-4- Hémolyse delta	53
III-5- Etude de l'activité autolytique des souches	54
III-5-1- Autolyse induite par le Triton X-100	54
III-5-2- Recherche du gène <i>atlE</i> et analyse de son expression par RT-PCR	56
 IV- DISCUSSION	 59
IV-1- Limites du modèle animal	60
IV-2 Etude des facteurs de virulence	62
IV-3- Tolérance, analyse de population	65
IV-4- Autolyse	66
IV-5- Application pratique en thérapeutique	67
 CONCLUSION	 68
ANNEXES	69
BIBLIOGRAPHIE	76

	LISTE DES TABLEAUX	PAGES
Tableau 1	Caractéristiques des amorces et des protocoles employés en PCR	38
Tableau 2	Caractéristiques des souches de <i>S. epidermidis</i> sélectionnées	42
Tableau 3	Doses Efficaces 50 de la teicoplanine pour les 10 souches de <i>S. epidermidis</i> étudiées dans le modèle de sepsis/péritonite de souris.	43
Tableau 4	Bactériémies à 4 et 24 heures	44
Tableau 5	Etude de la Concentration Minimale Bactéricide	45
Tableau 6	Caractéristiques des souches 1279 et 7989	47
Tableau 7	Typage <i>agr</i> des 10 souches de <i>S. epidermidis</i>	48
Tableau 8	Détection du gène <i>icaA</i> chez les 10 souches de <i>S. epidermidis</i>	50
Tableau 9	Médianes des densités optiques après lecture des puits colorés à la safranine par spectrométrie	51
Tableau 10	Recherche de formation de biofilm chez les 10 souches de <i>S. epidermidis</i>	52
Tableau 11	Recherche de la synthèse de delta toxine	53
Tableau 12	Résultats des manipulations d'autolyse sous Triton X-100	55
Tableau 13	Bactériémies et ASC des 10 souches de <i>S. epidermidis</i>	56
Tableau 14	Récapitulatif des résultats	58

	LISTE DES FIGURES	PAGES
Figure 1	Aspect de <i>S. epidermidis</i> après coloration de Gram	11
Figure 2	Aspect de colonies de <i>S. epidermidis</i> après 24 heures de culture sur gélose nutritive au sang	11
Figure 3	Mécanisme d'action de la teicoplanine	14
Figure 4	Antibiogramme de staphylocoque par la méthode de diffusion en gélose	18
Figure 5	Détermination de la CMI de la teicoplanine par bandelette E test	19
Figure 6	Etapas de la formation du biofilm et molécules en cause chez <i>S. epidermidis</i>	25
Figure 7	Fonctionnement du système <i>agr</i>	29
Figure 8	Relation entre la CMI de la teicoplanine et la DE ₅₀	44
Figure 9	Relation CMB - DE ₅₀	46
Figure 10	Analyse de la relation CMI - DE ₅₀ en terme de tolérance à la teicoplanine des souches de <i>S. epidermidis</i> .	46
Figure 11	Profils d'analyses de populations des souches 1279 et 7989	47
Figure 12	Typage <i>agr</i> des 10 souches de <i>S. epidermidis</i> par PCR multiplex	48
Figure 13	Relation CMI-DE ₅₀ en fonction des groupes <i>agr</i>	49
Figure 14	Amplification du gène <i>icaA</i> par PCR	49
Figure 15	Relation CMI-DE ₅₀ en fonction de la présence du gène <i>icaA</i>	50
Figure 16	Formation de biofilm sur plaque à puits à fonds plats	51
Figure 17	Relation CMI-DE ₅₀ en fonction de la capacité des souches à former un biofilm	52
Figure 18	Recherche d'hémolyse delta	53
Figure 19	Relation CMI-DE ₅₀ en fonction de la synthèse de delta toxine	54
Figure 20	Exemple de courbes obtenues au cours d'une manipulation d'autolyse induite par le Triton	54
Figure 21	Corrélation ASC autolyse sous Triton X-100– DE ₅₀	55
Figure 22	Amplification du gène <i>atlE</i> par PCR	57
Figure 23	Etude de l'expression du gène <i>atlE</i> chez 4 souches de l'étude	57

LISTE DES ABREVIATIONS

AGR	Accessory gene regulator
ARN	Acide Ribonucléique
ASC	Aire sous la courbe
ATL	Autolysine
ATLE	Autolysine majeure de <i>S. epidermidis</i>
CASFM	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CFU	Colony forming unit
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DE₅₀	Dose efficace 50
DO	Densité optique
E-Test	Epsilometer test
GISA	Glycopeptide intermediate <i>S. aureus</i>
ICA	Intercellular adhesion
IS	Séquence d'insertion
MH	Müller-Hinton
PB	Paire de base
PBS	Phosphate buffer salt
PCR	Polymerase chain reaction
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
PLP	Protéine liant les pénicillines
PSM	Phenol soluble modulín
RPM	Rotations par minute
RT-PCR	Reverse-transcription Polymerase chain reaction
TS	Trypcase-Soja
SARM	<i>S. aureus</i> résistant à la méticilline
SERM	<i>S. epidermidis</i> résistant à la méticilline
VRSA	Vancomycin resistant <i>S. aureus</i>

INTRODUCTION

Pendant 30 ans, les glycopeptides ont été considérés comme les antibiotiques de choix pour le traitement des infections à staphylocoques résistants à la méticilline. Or, des souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) de sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été isolées depuis les années 1990 au Japon, aux USA puis en Europe, auxquelles ont fait suite les premiers échecs thérapeutiques. L'émergence de ces souches a conduit les microbiologistes à explorer les mécanismes responsables de cette diminution de sensibilité et a renforcé la nécessité d'élaborer de nouveaux antibiotiques actifs sur ces souches. De la même manière, on observe une diminution progressive de la sensibilité aux glycopeptides chez les staphylocoques à coagulase négative et en particulier une diminution de la sensibilité des souches de *Staphylococcus epidermidis* à la teicoplanine, alors que la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de la vancomycine reste stable (Sloos, 1998; Trueba, 2006). Ce constat est d'autant plus alarmant que ces bactéries opportunistes sont aujourd'hui une des premières causes d'infections nosocomiales. En conséquence, dans la lignée des travaux menées sur *S. aureus*, plusieurs équipes s'attachent aujourd'hui à décrire les mécanismes de résistance aux glycopeptides chez les staphylocoques à coagulase négative et les facteurs de virulence de *S. epidermidis* afin de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, le but de notre étude était de déterminer quel était l'impact in vivo de l'augmentation de la CMI de la teicoplanine sur des animaux infectés par des souches cliniques de sensibilité variable à la teicoplanine in vitro. En l'absence de corrélation, divers paramètres explicatifs devaient être explorés, qui échappent à la simple mesure de la CMI: population hétérogène, autolyse réduite, tolérance, facteurs de virulence particuliers.

La question telle qu'elle est posée présente en effet un très grand intérêt pour la pratique clinique, dans le dialogue entre le clinicien et le biologiste, en terme de conseil thérapeutique.

Ce travail a fait l'objet d'une présentation affichée à l'Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy en septembre 2006, et d'une présentation orale courte au congrès de la Société Française de Microbiologie en juin 2006: voir en Annexes

I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I-1- *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis appartient au genre *Staphylococcus*, famille des *Micrococcaceae*.
S. epidermidis est un staphylocoque à coagulase négative.

I-1-1- Habitat

Les staphylocoques sont des espèces de la flore commensale cutanéomuqueuse des mammifères et des oiseaux. On décrit actuellement chez l'Homme environ 17 espèces de staphylocoques diversement représentées selon les sites anatomiques, *S. epidermidis* est toutefois l'espèce la plus présente sur la peau et les muqueuses (muqueuse nasale, aisselles, aine, région périnéale, espaces interdigitaux, mains, bras, jambes). Cette flore résidente (de 1 à 6 log CFU/cm² selon les sites) constitue une barrière protectrice primordiale contre les bactéries potentiellement pathogènes de la flore transitoire, mais les souches de *S. epidermidis* (comme les autres espèces de staphylocoques à coagulase négative) peuvent à leur tour devenir infectieuses à la faveur d'une rupture de la barrière cutanéomuqueuse (Brun, 2000).

I-1-2- Caractères bactériologiques

S. epidermidis est un staphylocoque à coagulase négative, coque à Gram positif de 0.5 à 1 µm de diamètre, groupé en amas, immobile. Sur gélose nutritive au sang, les colonies mesurent 2.5 à 4 mm, sont circulaires, lisses et luisantes, non pigmentées. Ces souches sont aéro-anaérobies facultatives et possèdent une catalase. Elles n'agglutinent pas lors des tests d'agglutination au latex recherchant

le clumping factor et la protéine A présents chez *S. aureus*. Elles possèdent une uréase, produisent de l'acide à partir du maltose, saccharose, du mannose mais pas à partir du tréhalose. Ces caractères biochimiques permettent l'identification de *S. epidermidis* par les galeries d'identification actuellement commercialisées.

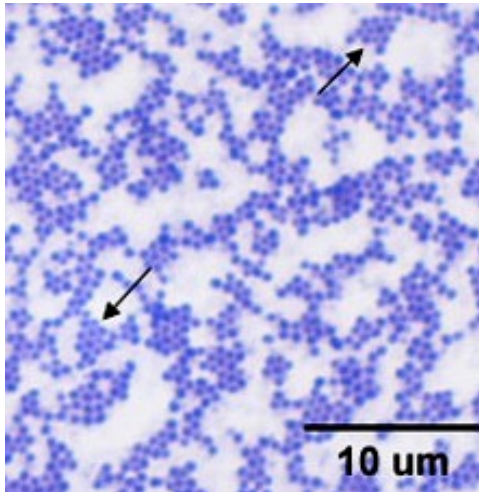


Figure 1



Figure 2

Figure 1 : Aspect de *S. epidermidis* après coloration de Gram

Figure 2 : Aspect de colonies de *S. epidermidis* après 24 heures de culture sur gélose nutritive au sang

I-1-3- Pouvoir pathogène

Les staphylocoques à coagulase négative ont longtemps été considérés comme contaminants des prélèvements bactériologiques avant d'être reconnus comme pathogènes émergents. Ce sont actuellement une des causes majeures d'infections nosocomiales (4^e cause d'infections nosocomiales en France en 2006) (Thiolet, 2008) en particulier chez les nouveaux-nés prématurés (Venkatesh, 2006). Ces germes produisent peu de toxines contrairement aux souches de *S. aureus* dont l'arsenal de pathogénicité conduit à des infections

graves accompagnées d'un syndrome inflammatoire majeur. Les souches de *S. epidermidis* ont surtout la capacité d'adhérer aux matériaux et de former un biofilm. L'accumulation de bactéries dans cette « communauté » est lente et stimule peu le système immunitaire. On conçoit donc très bien que ces germes soient responsables d'infections latentes, de diagnostic retardé, le plus souvent sur matériel implanté, n'en conduisant pas moins parfois à des conséquences lourdes. Le diagnostic clinique paraît donc parfois peu évident et le diagnostic bactériologique s'en avère alors plus délicat : en effet, *S. epidermidis* étant une bactérie de la flore, sa présence dans un prélèvement ne signe pas obligatoirement sa responsabilité dans un processus infectieux. La présence de la bactérie sur plusieurs prélèvements est parfois nécessaire pour affirmer le caractère pathogène de la souche.

Comme nous l'évoquerons plus loin, de nombreux travaux, jusqu'à présent en échec, ont porté sur la recherche de facteurs de virulence permettant de distinguer les souches colonisantes des souches pathogènes afin de faciliter le diagnostic.

Des infections à *S. epidermidis* ont été décrites sur la plupart des matériels implantés. Ce sont aujourd'hui les germes les plus isolés dans les bactériémies sur cathéters en Néonatalogie (Venkatesh, 2006) conduisant parfois à des décès. Ils représentent également une des premières causes d'infections sur prothèses ostéo-articulaires, dont le pronostic fonctionnel est bien sûr engagé (Mohanty, 2004; Hope, 1989). Ces bactéries peuvent être responsables, lors d'infections sur lentilles intraoculaires après chirurgie de la cataracte, de la perte de l'œil infecté. *S. epidermidis* est la première cause d'endophtalmie sur lentille intraoculaire (Kodjikian, 2005). Ils sont la deuxième cause d'infections sur sondes de pacemakers, dont les signes se révèlent beaucoup plus tardivement que dans les infections à *S. aureus* (Da Costa, 2000). Des infections sur dérivations de Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) (Fan-Havard, 1987), des médiastinites après transplantations cardiaques (Sénéchal, 2004), des péritonites chez des patients dialysés (de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, 2005) ont été également

décrites. Enfin, les souches de *S. epidermidis* sont également une cause mésestimée d'endocardites graves sur valves natives (Miele, 2001).

Ces infections surviennent chez des patients fragilisés ou immunodéprimés (en particulier patients sous traitements immunosuppresseurs, nouveaux-nés prématurés).

A l'augmentation du nombre d'infections dûes à ces bactéries s'ajoute un problème thérapeutique majeur puisque le taux de *S. epidermidis* résistants à la méticilline est aujourd'hui supérieur à 50% (Fluit, 2004). La résistance à la méticilline est souvent accompagnée de résistances à de nombreux antibiotiques (aminosides, macrolides, quinolones). Les glycopeptides constituent donc actuellement le traitement de référence dans les infections à *S. epidermidis* résistants à la méticilline (SERM). D'autre part, la formation de biofilm sur le matériel implanté étant un facteur d'échec thérapeutique, le retrait du matériel implanté s'avère être souvent l'étape majeure du traitement des infections à *S. epidermidis* (multipliant ainsi les gestes invasifs et les séjours hospitaliers).

***S. epidermidis* est un staphylocoque à coagulase négative responsable d'un nombre important d'infections sur matériels étrangers.**

Les niveaux actuels de résistance aux antibiotiques sont tels qu'il est fréquent que ces souches ne soient plus sensibles qu'aux

I-2- Glycopeptides

La vancomycine et la teicoplanine sont actuellement les deux seuls glycopeptides utilisés en Médecine humaine.

La vancomycine a été le premier glycopeptide isolé dans le milieu des années 1950 lors d'un programme de recherche d'antibiotiques antistaphylococciques actifs sur des staphylocoques producteurs de β -lactamase. Après sa première mise sur le marché en 1958, cet antibiotique fut rapidement supplanté par la méticilline qui présentait moins d'effets indésirables. La vancomycine connut un regain d'intérêt dans les années 1970 après amélioration de la pureté de l'antibiotique (diminuant la toxicité) lors de l'apparition d'un nombre important de souches bactériennes multirésistantes et notamment de staphylocoques résistants à la méticilline (Biavasco, 2000).

La teicoplanine fut isolée à partir de *Actinoplanes teichomycetus* dans les années 1970 lors d'un programme visant à découvrir de nouveaux glycopeptides. Sa mise sur le marché eut lieu en Europe dans les années 1980 (elle reste indisponible aux USA et au Japon).

I-2-1- Mode d'action des glycopeptides

Les glycopeptides sont des antibiotiques de structure complexe et de poids moléculaire élevé uniquement actifs sur les bactéries à Gram positif (ils ne peuvent passer la membrane externe des bactéries à Gram négatif). Toutefois, certaines bactéries à Gram positif comme les *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Erysipelothryx* sont naturellement résistants à ces antibiotiques.

Ils agissent comme inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, élément principal de la paroi bactérienne. Le peptidoglycane est constitué d'un réseau de molécules de N-Acétyl-Muramique – N-Acétyl-Glucosamine - pentapeptide (disaccharide-pentapeptide dont les 2 derniers acides aminés sont des molécules d'Alanine) reliées les unes aux autres. Ces motifs identiques sont

synthétisés dans le cytoplasme bactérien et incorporés au peptidoglycane sous l'action des transglycosylases et des transpeptidases.

La structure des glycopeptides leur donne une conformation tridimensionnelle en forme de « poche » qui se fixe sur la terminaison D-Ala-D-Ala du pentapeptide en cours d'intégration dans le peptidoglycane. Cette fixation et l'encombrement stérique qui en résulte empêchent l'action des transglycosylases et des transpeptidases et donc la croissance du peptidoglycane. L'action bactéricide finale des glycopeptides est encore de mécanisme mal élucidé.

Les glycopeptides sont des antibiotiques bactéricides, temps dépendants.

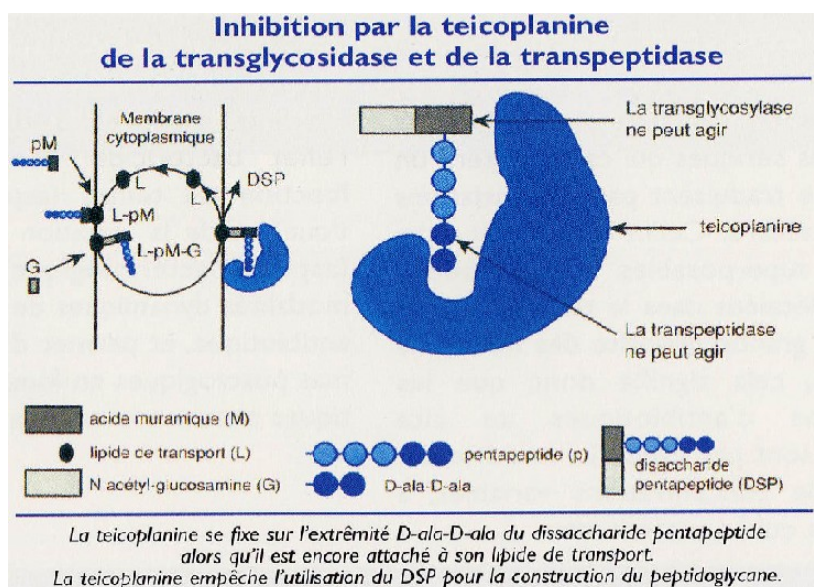


Figure 3: Mécanisme d'action de la teicoplanine
(D'après Al-Obeid, 1991)

I-2-2- Pharmacocinétique

Ils ne sont pas absorbés par voie orale, présentent une forte fixation aux protéines (50 % pour la vancomycine et 90% pour la teicoplanine).

La diffusion des glycopeptides dans les séreuses comme la plèvre, le péritoine et le péricarde est bonne. Le passage dans le LCR est dose dépendant et dépendant du degré d'inflammation des méninges (Léone, 2000). La diffusion dans l'os et le

poumon est modeste.

I-2-3- Elimination

Leur élimination est rénale sous forme inchangée, une adaptation des posologies, des dosages sériques sont nécessaires chez l'insuffisant rénal.

La demie-vie d'élimination présente d'importantes variations interindividuelles. Elle est courte pour la vancomycine (6-8 heures) et longue pour la teicoplanine (entre 70 et 100 heures) .

I-2-4- Effets indésirables

Le plus fréquent des effets indésirables est la phlébite au niveau du site d'injection (13 % des cas pour la vancomycine, pas de cas pour la teicoplanine).

Le « red man syndrome », observé lors de l'utilisation de la vancomycine est un érythème survenant au niveau du cou et à la partie supérieure du tronc accompagné de prurit et d'angoisse, lié à une perfusion trop rapide de l'antibiotique.

La néphrotoxicité est réversible et apparaît lors de traitements prolongés ou lors de l'association avec d'autres antibiotiques néphrotoxiques. L'ototoxicité est secondaire à une altération de la fonction rénale, concentration dépendante, réversible à l'arrêt du traitement (Léone, 2000).

I-2-5- Indications

Actuellement, les indications sont les mêmes pour la vancomycine et la teicoplanine : traitement des infections documentées à cocci à Gram positif en cas de résistance ou d'allergie aux β -lactamines et traitement probabiliste de choix des infections graves en association avec des antibiotiques actifs sur les bactéries

à Gram négatif.

Ils sont également utilisés en antibioprophylaxie contre les bactéries à Gram positif chez les sujets allergiques aux β -lactamines. Ils sont indiqués dans la prophylaxie de l'endocardite bactérienne avant un acte chirurgical.

La vancomycine peut être utilisée per-os lors du traitement de la colite pseudo-membraneuse à *Clostridium difficile*.

I-2-6- Posologie

La vancomycine est administrable par voie intraveineuse centrale, 2 fois par jour ou en continu (30 à 60 mg/kg/j) alors que la teicoplanine peut être administrée par injection intra-veineuse périphérique, intramusculaire et une seule fois par jour (6 à 12 mg/kg toutes les 12 heures 5 fois de suite puis 12 mg/kg /24 heures).

En l'absence de sensibilité à la méticilline, les glycopeptides sont le traitement de choix lors des infections à *S. epidermidis*.

La teicoplanine présente certains avantages par rapport à la vancomycine : injection unique journalière, pas de nécessité de pose de voie

I-3- Etat actuel de la sensibilité des souches de *S. epidermidis* aux glycopeptides

Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) définit comme sensible aux glycopeptides un staphylocoque dont la

CMI de la teicoplanine ou de la vancomycine est inférieure ou égale à 4 mg/L et comme résistante une souche dont la CMI est supérieure à 8 mg/L (Recommandations CASFM janvier 2007).

Nous ferons tout d'abord un rappel des méthodes de détermination des CMI des glycopeptides afin de souligner les difficultés rencontrées lors de l'étude de la sensibilité des souches de *S. epidermidis*.

I-3-1- Détermination des CMI des glycopeptides chez les souches de staphylocoques

Le milieu de référence pour la détermination de la CMI des glycopeptides vis à vis des staphylocoques est le milieu de Muller-Hinton (MH).

La plupart des études utilisent comme technique de référence la méthode de dilution en gélose : on utilise des géloses contenant des quantités croissantes de raison 2 de

l'antibiotique à tester sur lesquelles on inocule en spot un inoculum bactérien calibré. La CMI est la première dilution pour laquelle il n'y a pas de pousse visible de la bactérie sur la gélose après 24 heures d'incubation à 37°C.

Une étude menée en 1989 sur des staphylocoques à coagulase négative montrait des différences minimales lors de la détermination de la CMI de la teicoplanine par les méthodes de dilution en gélose ou en milieu liquide (Kenny, 1989). D'autres travaux ont souligné le fait que les CMI de la teicoplanine chez les souches de staphylocoques à coagulase négative présentent des différences importantes selon les milieux et les lots utilisés (Leclercq, 2001).

La détermination de la CMI par la méthode de référence est donc difficile et rend complexe la comparaison d'autres méthodes plus simples d'utilisation à la méthode de référence.

En effet, les méthodes de dilution sont difficiles à utiliser en routine et on a recours en pratique à d'autres méthodes validées pour un grand nombre de couples bactérie –antibiotique que sont la méthode de diffusion en gélose (antibiogramme), la méthode en milieu liquide Vitek2® (à Nantes), et l'utilisation de bandelettes imprégnées d'antibiotiques E-test. Il apparaît que toutes ces méthodes ne sont pas équivalentes pour évaluer la sensibilité des souches de staphylocoques aux glycopeptides.

En pratique, l'antibiogramme par diffusion en gélose est largement utilisé. Le principe est le suivant : un inoculum bactérien standardisé est étalé à la surface d'une gélose sur laquelle on dispose ensuite des disques de papier imprégné d'antibiotique. L'antibiotique diffuse alors dans la gélose avec un gradient de concentration diminuant du disque vers la périphérie. Lors de l'incubation, les bactéries vont pousser jusqu'à l'endroit où la concentration de l'antibiotique est suffisante pour inhiber la croissance bactérienne. On observe des cercles d'inhibition de pousse autour des disques dont le diamètre est inversement proportionnel à la CMI. Le principe est en fait assez complexe puisque la concentration de l'antibiotique varie autour du disque en fonction du temps et la croissance bactérienne connaît également des phases différentes en fonction du temps. Cette méthode est utilisable pour un certain nombre d'antibiotiques et de bactéries à croissance rapide. Cependant, les études s'accordent pour dire que la méthode de diffusion en gélose ne doit pas être utilisée pour déterminer la sensibilité des staphylocoques aux glycopeptides. Ces antibiotiques étant des molécules de grande taille, ils diffusent mal dans la gélose, et en particulier la teicoplanine (Cavenaghi, 1992)

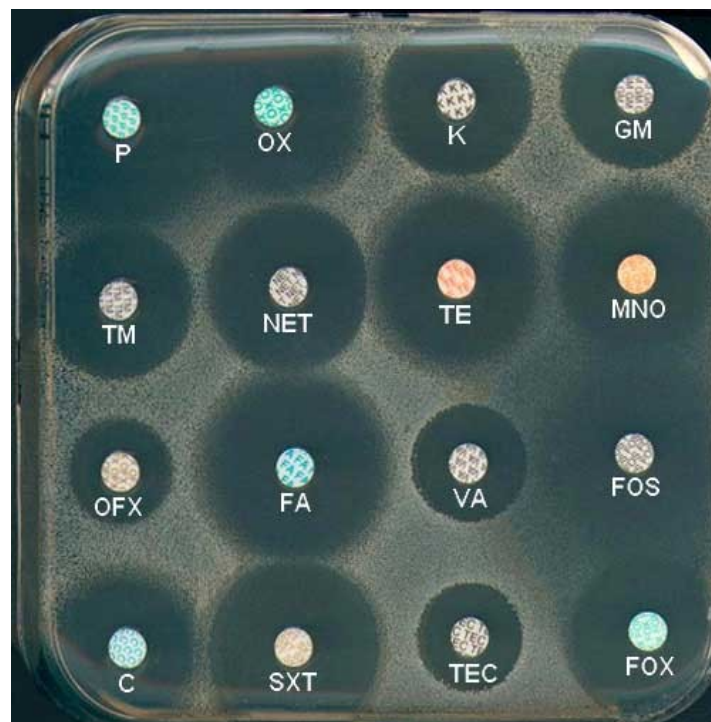


Figure 4 : Antibiogramme d'une souche de staphylocoque par la méthode de diffusion en gélose (VA : vancomycine, TEC : teicoplanine)

L'automate Vitek2® utilise une méthode modifiée de microdilution. Des cartes en plastiques sont creusées de cellules obturées par un film plastique. Les alvéoles contiennent chacune un antibiotique lyophilisé (3 concentrations par antibiotique). Un système d'aspiration va permettre à une suspension calibrée de la bactérie à analyser de migrer vers les alvéoles et de rentrer en contact avec l'antibiotique. Au cours de l'incubation à 37°C, la pousse bactérienne est mesurée par néphélométrie. L'automate calcule à partir de la courbe de croissance bactérienne des courbes dérivées grâce auxquelles il détermine une aire sous la courbe, une pente, un pourcentage de variation de croissance. Le calculateur détermine pour chaque concentration d'antibiotique un point dont les coordonnées correspondent aux données pré-citées et compare ces points aux coordonnées en mémoire pour des CMI connues de l'antibiotique testé vis à vis de la bactérie. La CMI peut donc être évaluée par comparaison à des données stockées en mémoire.

Une étude d'évaluation avait montré en 2002 que l'automate était une bonne méthode pour évaluer la sensibilité des bactéries à Gram positif aux antibiotiques (Ligozzi, 2002).

La méthode Epsilometer test (E test) peut également être utilisée. Une bandelette de plastique contenant l'antibiotique est appliquée sur une gélose sur laquelle a été placé une suspension bactérienne de concentration connue. L'antibiotique diffuse alors dans la gélose et la bactérie pousse autour de la bandelette au cours de l'incubation à 37°C. Le point d'intersection entre les colonies bactériennes et la bandelette correspond à la CMI de l'antibiotique indiquée sur la bandelette.

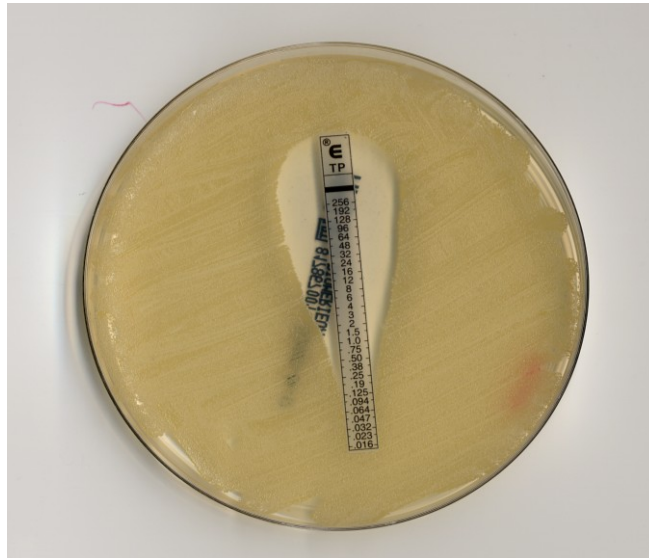


Figure 5: Détermination de la CMI de la teicoplanine par bandelette E test

Martin et coll., en 1995, ont comparé les CMI de la teicoplanine obtenues pour 118 souches de staphylocoques à coagulase négative, dont 82 *S. epidermidis*, par diffusion en gélose, par E test et par dilution en agar. Ils confirmaient l'inefficacité de la méthode de diffusion en gélose pour la détermination de la sensibilité à la teicoplanine et montraient d'importantes discordances entre les CMI obtenues par E test et par dilution en gélose (36% d'erreurs majeures). Dans cette étude la méthode E test conduit à sous-estimer la CMI de la teicoplanine et les auteurs suggèrent qu'il faut augmenter l'inoculum bactérien (Martin, 1985).

Les inocula bactériens sont calibrés en routine par densitométrie sur l'échelle de Mac Farland selon laquelle 0.5 Mc Farland équivaut à 1.5×10^7 Colony Forming Unit par mL (CFU/mL). Cette échelle a été élaboré à partir de suspensions de bactéries à Gram négatif et il est tout à fait possible qu'elle ne soit pas adaptée aux bactéries à Gram positif. D'après cette échelle, la concentration bactérienne est probablement surestimée, expliquant ainsi que la méthode E test ne détecte pas bien la résistance aux glycopeptides.

Ces difficultés sont rencontrées au quotidien par les laboratoires d'analyse médicale. Une étude menée dans 70 laboratoires dans 9 pays d'Europe montre que la plupart des souches de staphylocoques à coagulase négative

intermédiaires ou résistantes à la teicoplanine sont mal catégorisées (toutes méthodes confondues) (Brown, 1998)

I-3-2- Sensibilité des staphylocoques à coagulase négative aux glycopeptides

Les premières souches bactériennes résistantes aux glycopeptides ont été décrites dans les années 1980 (nous ne traiterons pas ici de la résistance des entérocoques aux glycopeptides).

Au début des années 1980, l'activité in vitro de la teicoplanine et de la vancomycine sur les souches de staphylocoques était tout à fait équivalente.

On note toutefois dès 1983, dans une étude analysant l'action de divers antibiotiques sur des bactéries à Gram positif, une souche de *S. epidermidis* résistante à la teicoplanine (CMI=12,5 mg/L) alors que la CMI de la vancomycine est plus basse. Plusieurs études ont rapporté par la suite un nombre considérable de souches de *S. haemolyticus* dont la CMI de la teicoplanine était particulièrement élevée contrairement aux autres souches de staphylocoques à coagulase négative. La première souche de *S. epidermidis* pathogène dont la CMI de la teicoplanine était élevée (12,5 mg/L) fut isolée en 1986 chez un patient souffrant de péritonite à la suite de dialyses péritonéales (Hiramatsu, 2001).

En 1990, Maugein et coll. rapportaient l'analyse de l'activité in vitro de souches isolées chez des patients neutropéniques, ces souches étaient toutes sensibles à la vancomycine mais présentaient des CMI de la teicoplanine de 0,5 à 32 mg/L dont les souches les plus résistantes étaient identifiées comme des *S. epidermidis* (Maugein, 1990). Cette étude montrait la corrélation directe entre l'utilisation des glycopeptides et l'émergence de cette résistance puisque peu de souches isolées de patients sans traitement par glycopeptides étaient de intermédiaires ou résistantes à la teicoplanine alors que la moitié des souches de patients ayant reçu des glycopeptides étaient dans ces mêmes catégories.

On voit donc dans ces premières données l'accumulation progressive de souches de *S. epidermidis* de sensibilité diminuée à la teicoplanine, fait inquiétant puisque

les glycopeptides constituent parfois le seul traitement possible sur les souches multirésistantes.

Ce fait est remarquablement bien illustré par une étude montrant l'évolution sur 10 ans des CMI des glycopeptides sur des souches cliniques de staphylocoques à coagulase négative dans un établissement hospitalo-universitaire des Pays-Bas (Sloos, 1998). Pendant cette période, le nombre de staphylocoques à coagulase négative dont la CMI est supérieure ou égale à 8 passe de 2 à 20%, ces souches étant identifiées à 85% comme des *S. epidermidis* et isolées de services différents. Une étude similaire portant sur des souches françaises montre une augmentation de 7 à 46% entre 2000 et 2003 du nombre de souches de *S. epidermidis* dont la CMI est supérieure à 8 (Trueba, 2006).

Cette augmentation des CMI ne semble pas liée à l'expansion clonale de souches de sensibilité diminuée. En effet, la comparaison des souches de sensibilité diminuée en électrophorèse en champs pulsé montre que ces souches ont des profils différents (Trueba, 2006 ; Schlegel, 2001).

La CMI de la teicoplanine vis à vis des souches de *S. epidermidis* est difficile à déterminer.

Malgré cela , on observe depuis quelques années un nombre croissant de souches dont les CMI sont de plus en plus élevées.

L'ensemble de ces constatations, qualifiées par Trueba d' « alarmantes », nous a amenés à étudier l'activité in vivo de la teicoplanine sur des

I-4- Facteurs d'échecs lors d'un traitement par glycopeptides

Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'échec des traitements par glycopeptides.

I-4-1- Résistance aux glycopeptides

Les mécanismes de résistance de *S. epidermidis* aux glycopeptides et en particulier à la teicoplanine ne sont actuellement pas connus. Ils ont été étudiés par analogie avec les travaux menés sur des souches de *S. aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides (GISA) et résistantes à la vancomycine (VRSA dont les CMI de la teicoplanine sont également élevées).

L'acquisition de la résistance aux glycopeptides serait précédée par l'apparition d'une sous-population bactérienne capable de pousser en présence de forte concentrations d'antibiotiques, sous-population ne modifiant pas la CMI de la souche et seulement détectable par analyse de population (hétérorésistance).

Les souches résistantes aux glycopeptides ont comme caractéristique commune une augmentation de l'épaisseur de la paroi bactérienne comme Cui et coll. l'ont montré sur des souches d'origines géographiques différentes. Ces souches VRSA ont des CMI de la teicoplanine réparties entre 6 et 29 mg/L. Il existe de plus une nette corrélation entre l'épaisseur de la paroi et la CMI de la vancomycine, cette corrélation existe à un moindre degré pour la teicoplanine (Cui, 2003).

Cette augmentation de l'épaisseur est liée à une diminution de l'autolyse chez ces souches. Boyle – Vavra et coll. ont montré, sur des souches sélectionnées par passage sur des géloses contenant de la vancomycine, que la diminution de l'autolyse précède l'augmentation des CMI aux glycopeptides (Boyle-Vavra, 2003). La diminution de l'autolyse n'est pas due à une mutation du gène *atl* codant pour l'autolysine majeure de *S. aureus*.

Koehl et coll. ont étudié des dérivés de souches cliniques passées sur des géloses contenant des glycopeptides. Ces souches montrent une diminution de la polymérisation de leur paroi dont la quantité d'acide teichoïque est diminuée. La signification de cette diminution n'est pas encore connue. L'équipe a également montré chez ces souches une diminution de l'activité autolytique sur cellules entières comme sur fragments de paroi. Ceci n'est pas dû à une diminution de la

sensibilité aux autolysines mais à une diminution de la quantité et de l'activité de celles-ci. Notamment, Koehl observe par Northern Blot une diminution de l'expression du gène *atl* (Koehl, 2004).

Wooton, en 2005, a également fait la preuve d'une diminution de l'autolyse due à l'expression du gène *atl* (par Reverse Transcription –Polymerase Chain Reaction ou RT-PCR) chez des souches cliniques de *S. aureus* (Wooton, 2005).

Les mécanismes de régulation négative de *atl* restent à explorer.

La plupart de ces souches étant résistantes à la teicoplanine, on peut penser que l'augmentation de l'épaisseur de la paroi bactérienne par diminution du turn-over, secondaire à une diminution de l'expression des autolysines comme Atl, a un rôle majeur dans la résistance aux glycopeptides. Toutefois, il existe une diminution des CMI de la vancomycine chez ces souches après culture répétées en l'absence de glycopeptide, s'accompagnant de diminution de l'épaisseur de la paroi. Ces souches conserve une CMI de la teicoplanine élevée, ce qui suggère qu'il existe d'autres mécanismes de résistance aux glycopeptides.

Shlaes et coll. ont montré en que les souches résistantes à la teicoplanine on une surproduction de la PLP2 (Schlaes, 1993).

Peu d'études ont porté sur les souches de staphylocoques à coagulase négative de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Sieradzki a montré en 1998, sur des souches cliniques, l'existence de sous-populations de CMI augmentées aux glycopeptides, une augmentation de l'épaisseur de la paroi, la formation d'agrégats lors des cultures en présence de glycopeptides sans diminution de l'autolyse chez ces souches (Sieradzki, 1998). Nunes, en 2006, a également montré l'existence de populations hétérogènes chez les souches de staphylocoques blancs mais sans montrer de nette diminution de l'autolyse chez les dérivés issus des analyses de population (Nunes, 2006).

I-4-2- Tolérance

La tolérance est la capacité d'une bactérie à survivre en présence d'une concentration forte d'un antibiotique auquel elle est normalement sensible et pour lequel la CMI n'est pas modifiée. Ce mécanisme de « résistance » constitue une des hypothèses lors de certains échecs thérapeutiques mais est parfois difficile à mettre en évidence par le manque de reproductibilité des méthodes de détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB). En pratique, on considère comme tolérante une souche pour laquelle le rapport CMB/CMI est supérieur ou égal à 32. La détermination de la CMB nécessite certaines précautions importantes : inoculum standardisé, prévention de l'effet antibiotique. Cette analyse en « point final » après 24 heures d'incubation est probablement un mauvais reflet de la cinétique de la lyse bactérienne pendant ces 24 heures. Certains auteurs recommandent une étude différente de la bactéricidie avec détermination du taux de bactéricidie après 2 à 4 heures de contact avec une concentration d'antibiotique égale à 5 à 10 fois la CMI (Handwerger, 1985).

Le phénomène de tolérance a été rapporté chez des souches cliniques de *S. pneumoniae*, chez des souches responsables d'endocardites telles que des entérocoques, des souches de staphylocoques dorés, des souches de staphylocoques à coagulase négative (May, 1998 ; Perry, 1999 ; Bourgeois, 2007). Cette tolérance peut peut-être parfois expliquer certains échecs de traitement comme l'ont montré Safdar et coll. en 2006 dans un travail portant sur des patients atteints de néoplasies et porteurs d'une infection à cocci à Gram positif dont le traitement par vancomycine était inefficace. Sur 25 cas rapportés d'échecs thérapeutiques, 8 souches bactériennes s'avéraient tolérantes à la vancomycine (Safdar, 2006). La modification des systèmes d'autolyses bactériennes constitue une hypothèse pouvant expliquer le phénomène de tolérance (Koch, 2001).

I-4-3- Biofilm

I-4-3-1 Formation de biofilm par les souches de *S. epidermidis*

Contrairement à *S. aureus*, *S. epidermidis* produit peu de toxines et c'est surtout sa capacité à adhérer et à former un biofilm qui lui confère son pouvoir pathogène. La formation de biofilm par *S. epidermidis* est considérée comme une cause d'échec dans les traitements des infections à ce germe (Costerton, 1999).

La formation du biofilm comprend une première phase d'attachement au support qui fait intervenir les propriétés physicochimiques du support et de la surface bactérienne (caractère hydrophobe de la surface bactérienne et du support).

L'autolysine majeure de *S. epidermidis*, AtlE, intervient également dans cette étape. Cette molécule fait partie d'un ensemble de molécules nommées autolysines /adhésines car elle intervient à la fois lors de la division cellulaire en lysant le peptidoglycane pour séparer les 2 cellules filles et lors de l'adhésion dans la phase initiale de formation du biofilm (Heilmann, 1997). La présence de AtlE semble procurer une certaine hydrophobicité à la surface cellulaire permettant ainsi l'adhésion à des supports également hydrophobes. Certains domaines de la molécules pourraient également procurer à la bactérie la capacité d'adhérer à des molécules de l'hôte et permettre ainsi l'adhésion sur du matériel implanté depuis longtemps. L'importance de AtlE a été prouvée in vitro comme in vivo dans un modèle d'infection sur cathéter central chez le rat (Heilmann, 1997 ; Rupp, 2001). De plus, il a été vu dans la partie ci-dessus que les autolysines semblent également impliquées chez les staphylocoques dans la diminution de sensibilité aux glycopeptides. Aae, une autre autolysine/adhésine est également suspectée d'intervenir dans la phase d'attachement au support (Heilmann, 2003).

S. epidermidis présente d'autres molécules de surface telle que Fbe (fibrinogen-binding protein of *S. epidermidis*) qui montre certaines similarités avec le clumping factor de *S. aureus* et qui permet aux souches d'adhérer aux molécules de l'hôte (Vuong, 2002).

Après adhésion au support, *S. epidermidis* forme une structure complexe en couches ou biofilm par multiplication cellulaire et adhésion des bactéries entre elles. Les bactéries doivent donc posséder des récepteurs de surface afin d'adhérer les unes aux autres. La principale molécule intervenant durant cette étape est la molécule PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) codée par l'opéron *ica* (intercellular adhesion). L'importance de cette molécule a été prouvée in vivo (Rupp, 2001). Le locus *ica* est composé de 4 gènes *ica* A, D, B, C (dans cet ordre, *ica* D chevauchant les gènes *ica* A et B). La présence des gènes *ica* A, D et C est indispensable pour la synthèse de la molécule PIA dans toute sa longueur. Le rôle du gène *ica* B est encore inconnu (Vuong, 2002).

Ont été décrites plus récemment des protéines de surface capable de médier la formation de biofilm indépendamment de PIA : Aap (accumulation protéine), protéine de surface qui permet l'adhésion dans sa forme tronquée et Bap (Biofilm associated protéine) (Vuong, 2002).

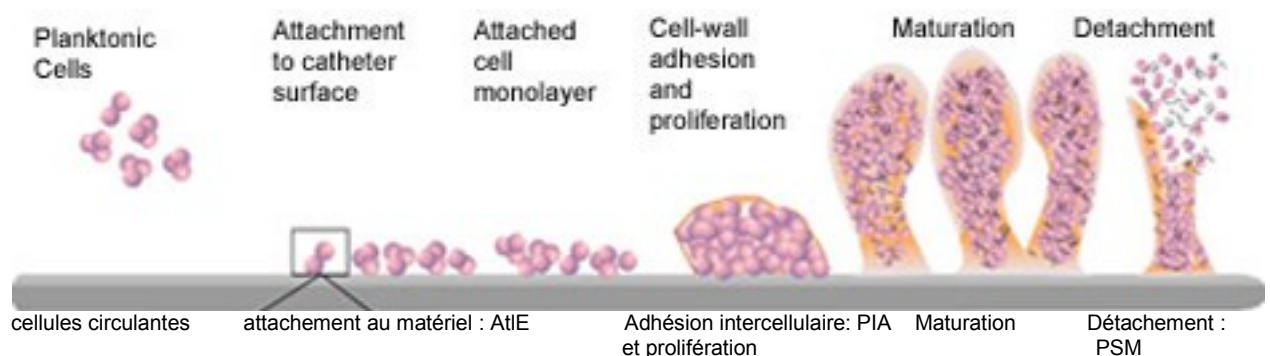


Figure 6 : Etapes de la formation du biofilm et molécules en cause chez *S. epidermidis*
(D'après Vuong, 2002)

Depuis l'amélioration des connaissances de la physiopathologie des infections à *S. epidermidis*, de nombreux travaux ont cherché à déterminer si la présence de certains facteurs de virulence permettrait de différencier les souches pathogènes des souches contaminantes lors des diagnostics difficiles. Ceci présente un intérêt

particulièrement important dans les infections ostéo-articulaires où le traitement est extrêmement contraignant, et chez les nouveaux-nés prématurés ou les transplantés de moëlle osseuse pour qui le pronostic vital est en jeu.

La majorité des études a porté sur l'analyse de la formation de biofilm et sur les gènes impliqués dans ce processus. Ces études sont contradictoires et il n'est aujourd'hui pas possible de trancher.

A titre d'exemple, Frebourg et coll. ont étudié la présence des gènes *ica*, *atlE* et *mecA* (conférant la résistance à la méticilline) chez des souches de *S. epidermidis* issues de sepsis et d'infections sur cathéters en comparaison à des souches issues de volontaires sains et contaminantes de prélèvements. Cette étude trouve une différence significative de la présence des gènes *ica* et *mecA* entre ces 2 groupes (Frebourg, 2000). Une étude similaire menée sur des souches issues d'infections ostéo-articulaires en comparaison à des souches prélevées sur volontaires sains montre la présence du gène *ica* et la formation de biofilm en plus grande proportion dans le 1^{er} groupe (Galdbart, 2000).

A contrario, un travail analysant la présence de *ica*, *atlE*, *fbe* chez des souches contaminantes et de septicémies de nouveaux-nés ne trouve pas de différence pour ces facteurs de virulence entre les groupes (Bradford, 2006). Enfin, une étude menée sur des souches issues d'infections sur prothèses ostéo-articulaires en comparaison à des souches colonisantes de prothèses contredit l'étude de Galdbart et coll. en montrant que ces 2 groupes de souches possèdent le gène *ica* dans les mêmes proportions (Frank, 2004).

Les moyens d'analyse ont progressé et les équipes travaillent désormais sur l'expression des facteurs de virulence : l'étude de Yang et coll. sur 2 souches de référence (l'une formant du biofilm et l'autre pas) par analyse protéomique par spectrométrie de masse ouvre probablement une nouvelle ère pour ces études (Yang, 2006).

I-4-3-2 Persistance bactérienne liée au biofilm

La formation de biofilm par les souches de *S. epidermidis* est un facteur d'échec majeur du traitement et est la cause des infections persistantes à ce germe. L'étape indispensable du traitement lors de ces infections est donc le retrait du matériel infecté.

Les mécanismes de persistance bactérienne liés au biofilm sont encore mal compris. Les mécanismes habituels de résistance aux antibiotiques n'interviennent pas (modification de cible, efflux, acquisition d'enzymes...). A titre d'exemple, certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* n'exprimant pas d'efflux MexAB-OprM (conférant une résistance aux quinolones) forment des biofilms sur lesquels l'action de la ciprofloxacine est la même que pour des cellules exprimant ce mécanisme de résistance (Brooun, 2000)

Les études avancent 3 hypothèses majeures (Stewart, 2001).

(1) L'antibiotique pénètre moins bien dans la structure complexe que constitue le biofilm. Ceci n'est probablement pas dû à la taille de l'antibiotique puisque la substance intercellulaire du biofilm est surtout composée d'eau. Mais les antibiotiques peuvent pénétrer et être inefficaces : dans un modèle de biofilm de *P. aeruginosa*, la tobramycine pénètre mais est rendue inactive par l'alginate sécrété par les bactéries (Nichols, 1988). En ce qui concerne *S. epidermidis*, le glycocalix seul est capable de rendre inefficace les glycopeptides in vitro (Mathur, 2005 ; Farber, 1990) et l'efficacité de certains antibiotiques comme la teicoplanine est diminuée in vivo comme in vitro sur des souches de *S. epidermidis* capables de synthétiser du biofilm (Shwank, 1998)

(2) Les conditions à l'intérieur du biofilm sont défavorables à l'activité de certains antibiotiques. Les variations de pH, d'osmolarité et du taux d'oxygène altèreraient l'efficacité de certains antibiotiques. Par exemple, le métabolisme anaérobie des bactéries les plus profondes pourrait empêcher l'action des aminosides. De plus, l'accumulation de déchets acides issus du métabolisme bactérien diminue le pH local et peut inactiver directement l'antibiotique.

(3) Les bactéries les plus profondes acquièrent un état latent (comparable à la

formation de spore chez certaines espèces) par le manque d'accès aux nutriments et sont donc peu sensibles aux antibiotiques qui agissent lors de la phase exponentielle de croissance bactérienne (comme les β lactamines et les glycopeptides)

I-4-3-3- Dissémination bactérienne à partir du biofilm – delta toxine

S. epidermidis est capable de synthétiser une seule toxine : la delta toxine. Le rôle de cette toxine est controversé. Elle a été retrouvée chez certaines souches de *S. epidermidis* isolés chez des nouveaux-nés ayant présenté une entérocolite nécrosante (Scheifele, 1987) et dans des prélèvements de selles issus des patients atteints sans que le rôle précis de cette molécule soit connu. Une étude menée par comparaison entre des nouveaux-nés atteints d'entérocolite nécrosante et des nouveaux nés sans cette pathologie trouve la toxine chez les souches de staphylocoques à coagulase négative portées dans l'intestin dans les 2 groupes de patients sans différence significative (Rotbart, 1989).

Cette toxine est codée par le gène *hld* situé dans le régulon *agr* (accessory gene regulator) (Donvito, 1997). La delta toxine est une hémolysine qui conduit à la destruction des globules rouges par formation de pores dans la membrane. Si son rôle direct en pathologie est controversé, il semble clair qu'elle soit impliquée dans la dissémination des cellules à partir du biofilm et posséderait un rôle important dans l'inflammation secondaire à l'infection due à *S. epidermidis*. A ce titre, elle fait partie d'un groupe plus large de polypeptides nommés « Phenol Soluble Modulins », ainsi appelés en raison de leur rôle sur la régulation des cytokines produites par les cellules de la lignée macrophagique. Ces protéines ont un rôle prépondérant dans les manifestations systémiques des septicémies à staphylocoques (Liles, 2001). La recherche d'hémolyse delta est également considérée chez les souches de *S. aureus* comme un test de fonctionnalité du système *agr*, système de régulation de facteurs de virulence (Fowler, 2004).

I-4-3-4- Régulation de la production de biofilm

Lors d'une infection, les bactéries doivent orchestrer l'expression de différents groupes de molécules qui sont responsables de la pathogénicité. En particulier lors de la formation de biofilm, la bactérie doit exprimer les unes après les autres les molécules responsables de l'adhésion au support, de l'adhésion intercellulaire puis du détachement du biofilm. Ceci est possible grâce au système de communication intercellulaire ou quorum sensing comme le système *agr*, le mieux décrit chez les Staphylocoques.

Le système de régulation *agr* a été décrit chez *S. aureus* avant d'être exploré chez *S. epidermidis*. *agr* est un système de quorum sensing sensible à la densité cellulaire. Ce système est composé de 2 unités différentes, RNAII et RNAPIII, dont la transcription est dirigée par les promoteurs P2 et P3 respectivement (Kong, 2006).

RNA II est constitué de 4 gènes différents A, B, C et D. Ce système est polymorphique et l'on distingue chez *S. epidermidis* 3 groupes selon la séquence en acides aminés de AgrD (4 groupes chez *S. aureus*). Le système est sensible à la densité cellulaire par l'intermédiaire de

la molécule AgrD, autoinductrice. AgrD subit une maturation sous l'action de AgrB et peut ainsi activer un système du même groupe (et inhiber des systèmes *agr* d'autres groupes et d'autres espèces). AgrC est une molécule transmembranaire qui agit comme récepteur du signal extracellulaire constitué par AgrD. AgrC active alors AgrA qui induit l'expression de RNA II et de RNA III. AgrA active à son tour AgrB qui provoque ainsi la maturation de AgrD. RNA III est la molécule effectrice du système par un mécanisme encore inconnu (Kong, 2006).

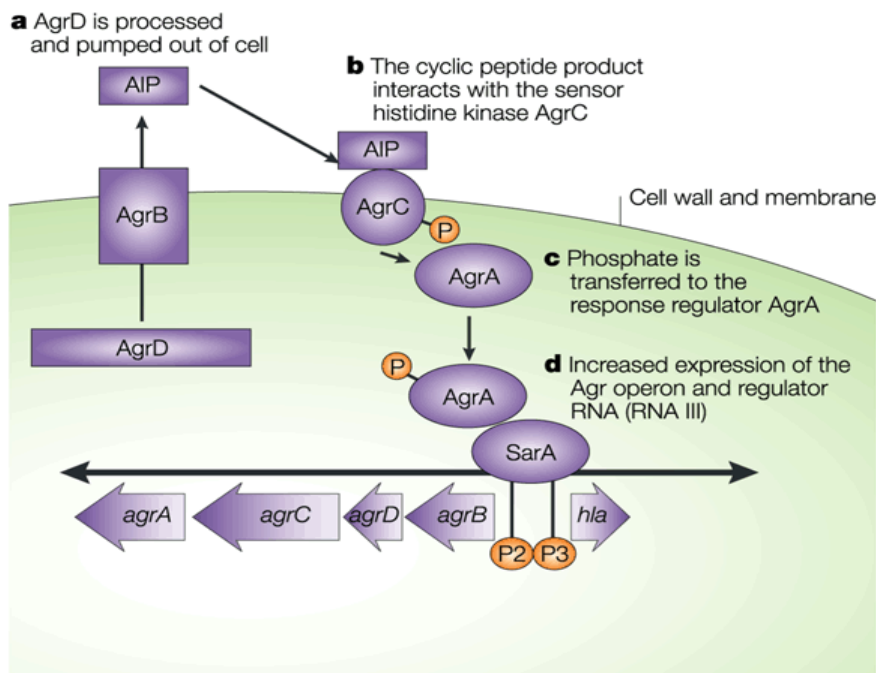


Figure 7 : Fonctionnement du système *agr*
(D'après Fuqua, 2002)

AIP : Autoinducing Peptid

- a**: AgrD est excrété sous forme d'un peptide circulaire après maturation par AgrB
- b**: AgrD interagît avec le récepteur membranaire AgrC
- c**: AgrC active AgrA par phosphorylation
- d**: AgrA stimule l'expression de l'opéron *agr*, induisant la synthèse d'un certain nombre de facteurs de virulence et la synthèse de AgrD

Pour l'espèce *S. epidermidis*, lorsque la densité cellulaire est basse, *agr* est peu activé et les protéines de surface comme AtlE sont synthétisées afin de permettre à la bactérie de coloniser son environnement. Lors d'une augmentation de la densité cellulaire, le système *agr* est très activé, conduisant à la production de RNAIII, effecteur du système *agr* (Vuong, 2003). On assiste alors à une diminution de l'expression de facteurs de surface comme AtlE et à une

augmentation des enzymes dégradatives comme la delta toxine. La production de PIA (phase d'accumulation cellulaire) semble régulée par un autre système de quorum sensing, *luxS* (Xu, 2006).

Depuis la description du système *agr*, les souches de staphylocoques ont été étudiées afin de déterminer s'il existait un lien entre groupe *agr* et pathogénicité d'une part, et résistance aux antibiotiques d'autre part.

En ce qui concerne *S. epidermidis*, certaines études montrent qu'on peut relier le groupe *agr* au caractère pathogène des souches : dans une étude portant sur 53 souches de *S. epidermidis* responsables d'infections ostéo-articulaires (en région parisienne), il apparaît que les souches appartiennent pour la majorité au groupe *agr* I (89%) alors que 11% des souches appartiennent au groupe *agr* II et que le groupe *agr* III n'est pas représenté (Carmody, 2004). Une étude menée en Corée sur 100 souches issues de 3 hôpitaux montre que les souches impliquées dans les infections sont plutôt du groupe I (100% des souches responsables d'infections sur cathéters sont du groupe I) alors que les souches des volontaires sains sont du groupe II (Li, 2004).

En ce qui concerne *S. aureus*, pour lequel il existe 4 groupes *agr* (I à IV), certaines études ont pu établir un lien entre pouvoir pathogène et groupe *agr* : Jarraud et coll. ont montré une surreprésentation des souches *agr* II dans les endocardites infectieuses (Jarraud, 2002) ; les souches responsables de toxic shock syndrome appartiennent au groupe III, le groupe IV rassemble les souches produisant l'exfoliatine (Jarraud, 2000).

D'autre part, on peut relier le groupe *agr* à la sensibilité aux antibiotiques : certains travaux ont montré que l'on pouvait relier, chez *S. aureus*, les groupes *agr* I et II à une diminution de la sensibilité aux glycopeptides (Verdier, 2004 ; Sakoulas, 2002) et le groupe *agr* II aux échecs thérapeutiques des glycopeptides lors de septicémies à SARM (Moise-Broder, 2004). A notre connaissance, ce lien n'a pas encore été étudié chez les staphylocoques à coagulase négative.

Le but de cette étude était d'évaluer les conséquences de l'augmentation de la CMI de la teicoplanine en étudiant l'action de cet antibiotique in vivo chez des animaux infectés par des souches de *S. epidermidis* de CMI variables. Dans notre étude, la CMI n'étant pas un facteur prédictif de l'activité in vivo de la teicoplanine, nous avons étudié les facteurs susceptibles d'expliquer le manque de corrélation entre CMI et activité in vivo de cet antibiotique:

II- MATERIEL ET METHODES

II-1- Souches bactériennes

Les souches de *S. epidermidis* sélectionnées pour cette étude ont été isolées dans des prélèvements infectieux de différents patients hospitalisés au CHU de Nantes en 2005 (une souche par patient).

Les souches ont été identifiées au laboratoire de Bactériologie sur la base des caractéristiques phénotypiques habituelles c'est à dire par aspect des colonies sur gélose au sang, activité catalasique, coloration de Gram, groupement des cocci, production de clumping factor et de protéine A (agglutination de particules de latex sensibilisées, kit Pastorex® Staph-Plus, Biorad) et par caractères biochimiques détectés par l'automate Vitek 2®.

Pour cette étude, les souches ont été choisies de manière à avoir des CMI de la teicoplanine comprises entre 0,25 et 8 mg/L.

II-2- Antibiotiques

L'antibiotique utilisé est la teicoplanine. Pour les études in vitro, la teicoplanine est utilisée sous forme de poudre pure, titrée, pesée et mise en solution dans de l'eau distillée stérile. Pour les études in vivo, la forme pharmaceutique commerciale (Targocid®, Aventis) est utilisée.

II-3-Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice de la teicoplanine

II-3-1- CMI en milieu solide

La CMI est déterminée par la méthode de dilution en gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations du CASFM (CASFM, Janvier 2007)

Après 24 heures d'incubation à 37°C sur gélose nutritive trypticase - soja (TS), l'inoculum est ajusté en sérum physiologique (NaCl 9 ‰) de façon à obtenir une suspension d'environ 10^7 CFU/mL. 1 µL de cet inoculum est appliqué par l'appareil multipoint inoculator (Denley®) sur gélose MH contenant des concentrations croissantes de teicoplanine de 0,125 à 64 mg/L.

La lecture est effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible.

La souche témoin est la souche de *S. aureus* ATCC 29213.

II-3-2 CMI en milieu liquide

La CMI en milieu liquide est déterminée par macrométhode. Un inoculum d'environ 5.10^6 CFU/mL est incubé dans un tube contenant du bouillon MH et l'antibiotique à dose croissante. La lecture est effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C (CASFM, Janvier 2007)

II-4 Etudes in vivo

II-4-1 Etude de la virulence des souches

Des souris femelles Swiss de 20g sont conservées en cage avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Le protocole utilisé est celui décrit par Goldstein (Goldstein, 1995). Après acclimatation, les souris sont immunodéprimées par injection intrapéritonéale de cyclophosphamide à la dose de 150 mg/kg, 5 jours, 3 jours et 1 jour avant inoculation de la souche bactérienne.

Les souches bactériennes sont incubées une nuit en bouillon TS. L'inoculum est ajusté en sérum physiologique de façon à obtenir une suspension bactérienne à 2.10^7 CFU/mL que l'on mélange volume à volume à une solution de mucine de porc (Sigma®) à 10% reconstituée en bouillon TS. Un volume de 0,7 mL de cette solution est injecté par voie intrapéritonéale à chaque souris (8 souris par souche).

La mortalité est surveillée quotidiennement pendant 6 jours. Les dernières souris vivantes sont sacrifiées par injection intrapéritonéale létale de Nesdonal®.

Les souches sélectionnées sont celles qui tuent au moins la moitié des souris en 24 heures.

II-4-2 Etude de la dose efficace médiane de la teicoplanine (Dose Efficace 50 : DE₅₀)

Le protocole d'infection est le même que précédemment décrit.

Pour déterminer la dose efficace médiane de la teicoplanine, les souris sont traitées par injections sous cutanées de teicoplanine aux doses 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 et 1000 mg/kg, immédiatement, 4 heures et 8 heures après inoculation (8 souris par dose d'antibiotique). Un groupe contrôle de 8 souris est traité par sérum physiologique pour chaque souche bactérienne. La mortalité est surveillée quotidiennement pendant 6 jours. Les dernières souris vivantes sont sacrifiées par injection intrapéritonéale létale de Nesdonal®.

La dose efficace médiane (assurant la survie de 50 % des souris à J6) est calculée par régression non linéaire basée sur une courbe dose effet sigmoïde à pente variable. La régression linéaire est calculée par le logiciel Graphpad Prism®.

II-4-3 Bactériémie

Pour chaque souche, en parallèle de l'étude de la DE₅₀, la bactériémie à 4 heures et à 24 heures après inoculation intrapéritonéale est mesurée chez 3 souris du groupe témoin. On prélève 0.5 mL de sang en rétro-orbitaire grâce à une pipette en verre contenant de l'héparine. Le sang hépariné est placé en cône Eppendorf et dilué en tube dans de l'eau distillée stérile. 20µL de la dilution sont ensemencés sur gélose TS à l'aide de l'ensemencement Spiral System®. Après 24 heures d'incubation à 37°C, on détermine le nombre de bactéries par mL de sang.

II-5- Autres facteurs prédictifs de l'activité de la teicoplanine

II-5-1 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et étude de la tolérance des souches à la teicoplanine

La CMB de la teicoplanine est déterminée en milieu liquide de Mueller Hinton.

Un millilitre d'une suspension bactérienne contenant 5.10^6 CFU/mL est mis en présence de différentes concentrations de l'antibiotique dans un volume final de 10 mL. Un tube sans antibiotique est utilisé comme témoin de croissance. Aux temps 0 et 24 heures, les suspensions bactériennes pures et diluées au 1/10e sont ensemencées sur gélose MH à l'aide d'un ensemencement Spiral System®. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la numération des colonies est effectuée.

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est la première concentration d'antibiotique pour laquelle ne subsiste que 0,1% (pour les pays anglo-saxons) du nombre initial de bactéries (Meylan, 1986).

Une souche est considérée comme tolérante si le rapport CMB/CMI est supérieur ou égal à 32 (Tomasz, 1971)

II-5-2 Analyse de population

L'analyse de population permet de révéler, au sein d'une population bactérienne, l'existence d'une sous-population dont la sensibilité à un antibiotique est moins importante que la population bactérienne globale et qui est susceptible d'être sélectionnée au cours d'un traitement par cet antibiotique.

Les souches sont incubées une nuit à 37°C en bouillon TS sous agitation. La suspension bactérienne est diluée au 1/100^e, au 1/10⁴ et au 1/10⁶ (Sieradzki, 1999). Un volume de 50µL de chaque suspension est ensemencé à l'aide de l'ensemencement spiral sur des géloses MH ne contenant pas d'antibiotique et sur des géloses contenant des concentrations croissantes de teicoplanine de 0,5 à 128 mg/L. Les géloses sont incubées à 37°C et la numération des colonies est effectuée à 24 et 48 heures.

Les aires sous la courbe (ASC) des profils d'analyse de population sont calculées par le logiciel GraphPad Prism® 4.0 (GraphPad San Diego, California) (Walsh, 2001).

II-6- Etude des facteurs de pathogénicité

II-6-1- Typage *agr* par PCR multiplex, amplification des gènes *icaA*, *atlE* par PCR

Le système *agr* est un système de quorum sensing impliqué dans l'expression des facteurs de virulence des staphylocoques (3 groupes chez les souches de *S. epidermidis*).

Le gène *ica* est impliqué lors la formation de biofilm par les souches de *S. epidermidis*. Le gène *atlE* code pour une autolysine/adhésine impliquée à la fois lors de la formation de biofilm et la division cellulaire des souches de *S. epidermidis*.

Ces manipulations visent à établir si les souches dont la DE₅₀ est élevée possèdent les éléments génétiques utiles à la formation de biofilm.

Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait par méthode rapide à partir de culture de *S. epidermidis* de 18 heures en gélose TS. Quelques colonies sont placées 1 heure à 37°C dans une solution contenant de la lysostaphine (50/200mg/L), puis 1 heure à 55°C dans une solution de Tris HCl (0.05M) et de protéinase K (10 mg/mL) et sont enfin portées 10 minutes à 100°C. L'ADN est récupéré dans le surnageant après centrifugation 5 minutes à 12 000 rotations par minute (rpm).

Cycles d'amplification

Les réactions de PCR sont réalisées en thermocycleur Perkin-Elmer 480 (Perkin-Elmer Applied Biosystems ®) dans un mélange final de 50 µL contenant 10 mM de tampon Tris-HCl pH=9, 50 mM KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chacun des nucléotides, 0,5 µM de chaque amorce, 1,25 unité de Taq DNA polymérase (Promega®).

Pour chaque PCR, on utilise un blanc sans ADN constitué d'eau distillée stérile et comme témoin interne d'extraction une amplification de l'ADN de la sous-unité ribosomale 16S.

Le tableau 1 résume les caractéristiques des amorces utilisées, les protocoles d'amplification et la taille des fragments attendus.

Ninin et col. ont montré que les souches possèdent toujours les 4 gènes *ica* A, D, B et C lorsque le gène *ica* est présent ; nous avons donc recherché seulement le gène *icaA* chez les souches de cette étude. Pour l'amplification du gène *icaA*, la souche *S. epidermidis* ATCC 35984 est utilisée comme témoin positif et la souche *S. hominis* ATCC 35982 comme témoin négatif (Ninin, 2006). La souche ATCC 35984 est également utilisée comme témoin positif pour l'amplification du gène *atlE*. Pour le typage *agr*, les souches témoins sont : *S. epidermidis* CCM2124 (*agr* 1), N910160 (*agr* 2), N910191 (*agr* 3).

Révélation

La visualisation des produits de PCR est effectuée grâce au bromure d'éthidium sous Ultra-Violets (UV) après migration électrophorétique (1 heure à 130 Volts) sur gel d'agarose (Amersham Biosciences®).

Amplicon	Amorces	Programme	Taille de l'amplicon
<i>agr1</i>	F 5'GGCATTAGTCGGATTAATTATTACG3'	5 min., 95°C	438 pb
	R 5'TGTAGGCCTGCAAACGG3'	1 min., 94°C	
<i>agr2</i>	F 5'TTTACCATTTCGAGCTATACAAGTG3'	1 min., 55°C	575 pb
	R 5'ATAACAATAATATAACCAAACCTCAAAAGTACAG3'	1 min., 72°C	
<i>agr3</i>	F 5'GAAAGAGTGTATTCAATGGATGAGC3'	10 min., 72°C	338 pb
	R5'TAAATATTATGTATTATATCTTCAGTATATAAAGA GATGA3'		
<i>ica A</i>	F 5'GAATCAAAATTAGGCGCAG3'	5 min., 94°C	455 pb
	R 5'AGACCCATGTAATCGATGCG3'	30 sec., 94°C	
<i>atlE</i>	F 5'TTTGTAGATGTTGTGCCCCA3'	30 sec., 55°C	681 pb
	R 5'CAACTGCTCAACCGAGAACA3'	1 min., 72°C	
		7 min., 72°C	
ARN 16S	F 5'GGAGGAAGGTGGGGATGACG3'		241 pb
	R 5'ATGGTGGACGGGCGGTGTG3'		

Tableau 1: Caractéristiques des amorces et des protocoles employés en PCR (pb : paires de bases)

II-6-2- Production de biofilm

La production de biofilm est déterminée en utilisant la méthode décrite par Christensen (Christensen, 1985). Les souches sont incubées une nuit à 37°C sous agitation en bouillon TS contenant 2,5% de glucose. La suspension bactérienne est diluée au 1/200^e en bouillon TS et 200µL de cette suspension sont utilisés pour inoculer chaque puits d'une plaque en polystyrène (microplaques stériles à puits à fonds plats, Merck Eurolab®). La plaque est incubée 24 heures à 37°C. Chaque puits est rincé 2 fois par 200µl de tampon PBS (Phosphate Buffer Salt) puis le contenu de chaque puits est fixé 10 minutes à l'éthanol absolu refroidi avant d'être coloré à la safranine. La lecture est effectuée par spectrométrie à 492 nm (Spectromètre LP 400, Diagnostics Pasteur®).

La souche *S. epidermidis* ATCC 35984 est utilisée comme témoin positif et la souche *S. epidermidis* ATCC 12228 comme témoin négatif.

II-6-3- Hémolyse delta

On utilise la propriété que possède cette toxine de produire une hémolyse totale en présence d'hémolysines d'autres staphylocoques.

Une souche de *S. aureus* (ATCC 25923) est ensemencée en strie centrale sur une gélose contenant du sang de mouton. Chaque souche de *S. epidermidis* est ensemencée en strie perpendiculairement à la souche de *S. aureus*, à quelques millimètres de celle-ci. La gélose est incubée 24 heures à 37°C. Les souches sécrétant la delta toxine présentent une zone d'hémolyse totale à proximité de la souche de *S. aureus*.

II-7- Etude de l'activité autolytique des souches

II-7-1 Autolyse sous Triton X-100

Le Triton X-100 est un détergent favorisant l'autolyse bactérienne in vitro. Les souches sont incubées une nuit à 37°C dans du bouillon TS. La suspension bactérienne est ajustée dans du bouillon TS à environ 10^8 CFU/mL puis 1,5 mL de cette suspension est placé dans 50 mL de bouillon TS puis incubé à 37°C en agitation jusqu'à obtention d'une densité optique (DO) de 0,3 à 620 nm (mesure par le spectromètre ABC, Secomam®). Les bactéries sont ensuite centrifugées à 13000 rpm pendant 10 minutes, rincées en tampon Tris 0,05 M à pH=7,4 (à 37°C), centrifugées une seconde fois selon les mêmes modalités et resuspendues dans le tampon auquel est ajouté une solution de Triton X-100 (Sigma®) à 0,1%. La suspension (bactéries + tampon Tris et Triton) est placée à 37°C en agitation, la DO est mesurée toutes les heures pendant 4 heures. Les manipulations d'autolyse sous Triton X-100 ont été faites 3 fois pour chaque souche. Les ASC (Walsh, 2001) et les corrélations sont calculées par le logiciel GraphpadPrism®.

II-7-2 Etude de l'expression du gène *atlE* (impliqué dans l'autolyse) par RT-PCR

Extraction d'ARN

Les souches sont mises en culture sur pente TS pendant 18 heures à 37°C. On prépare ensuite un inoculum contenant environ $1.5 \cdot 10^7$ CFU/mL dont on place 10µL dans 10 mL de bouillon LB (Luria-Bertani). Ce milieu est incubé sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO de

0.5 à 600 nm. L'ARN bactérien est alors extrait par le kit RNeasy® MiniKit (Qiagen®) selon les recommandations du fabricant (voir le protocole en Annexe : protocole d'extraction utilisé au laboratoire, traduction du protocole RNeasy® MiniKit). La quantité d'ARN obtenue est mesurée au spectrophotomètre Nanodrop® et les différentes solutions sont diluées afin d'utiliser la même quantité d'ARN pour chaque souche au cours des manipulations suivantes (environ 300 ng).

Avant transcription inverse, les ARN sont soumis à un traitement par DNase (solution contenant du tampon Tris HCl à 400mM, la RQ1 RNase Free DNase Promega® à 1U/μL) 15 minutes à température ambiante. La DNase est ensuite inactivée par une solution Stop à 20mM et incubation 10 minutes à 65° C.

Transcription inverse

5μL de cet extrait sont mis dans un mélange contenant 0.5μM de l'amorce *at/E-R* précédemment décrite, 200 μM de chaque nucléotide et la Reverse Transcriptase (MMLV-RT Promega® à 200 U/μL) et incubés une heure à 42°C puis 5 minutes à 95°C pour dénaturation.

Amplification par PCR

L'amplification de l'ADN ainsi obtenu suit le protocole décrit dans le tableau 1 dans les conditions de PCR décrites dans la partie II-6-1- Amplification du gène *at/E* par PCR

Comme témoin du niveau de transcription, nous avons utilisé le gène codant pour l'ARN 16S.

Révélation

La visualisation des produits de PCR est effectuée grâce au bromure d'éthidium sous UV après migration électrophorétique (1 heure à 130 Volts) sur gel d'agarose (Amersham Biosciences®).

III- RESULTATS

III-1- Caractéristiques des souches sélectionnées

24 souches ont été sélectionnées parmi les souches de *S. epidermidis* issues de prélèvements infectieux, isolées en 2005 au CHU de Nantes.

Leur CMI a été vérifiée en milieu solide, et leur virulence a été testée chez la souris.

Nous avons sélectionné 10 souches dont la CMI de la teicoplanine est de 0,25 à 8 mg /L en milieu solide et dont la virulence est telle que la moitié des souris inoculées meurt en 1 jour (tableau 2).

Souches de <i>S. epidermidis</i>	CMI en milieu solide (mg/L)	CMI en milieu liquide (mg/L)	Prélèvements d'origine
7026	0,25	4	Hémoculture
7318	0,5	1	Hémoculture
2239	0,5	2	Hémoculture
7989	2	4	Hémoculture
9075	2	8	Hémoculture
882	4	8	Os
1279	4	16	Hémoculture
7302	8	4	Hémoculture
584	8	8	Hémoculture
8462	8	8	Hémoculture

Tableau 2: Caractéristiques des souches de *S. epidermidis* sélectionnées

Selon les critères d'interprétation du CASFM, les souches sont sensibles à la teicoplanine si leur CMI est inférieure ou égale à 4 mg/L et résistantes si leur CMI est supérieure à 8 mg/L. Nous observons des différences de CMI selon les méthodes d'analyse utilisées comme rapporté dans la littérature.

Avec la méthode en milieu solide, 3 souches sont intermédiaires à la teicoplanine. Avec la méthode en milieu liquide, 4 souches sont intermédiaires et 1 souche est résistante à la teicoplanine.

III-2- Etudes in vivo

III-2-1 Détermination de la DE₅₀

Afin de savoir quelle était la conséquence d'une augmentation de la CMI de la teicoplanine chez les souches de *S. epidermidis*, nous devons savoir s'il existait une corrélation entre les activités in vitro et in vivo de cet antibiotique. Pour ceci, nous avons testé la teicoplanine chez des souris infectées par chacune des souches de *S. epidermidis*.

Les DE₅₀ ainsi obtenues varient de 2 à 100 mg/kg. Ces résultats sont indiqués dans le tableau 3.

Souches de <i>S. epidermidis</i>	CMI en milieu solide (mg/L)	CMI en milieu liquide (mg/L)	Doses efficaces 50 (mg/kg)
7026	0,25	4	16
7318	0,5	1	2
2239	0,5	2	55
7989	2	4	6
9075	2	8	11
882	4	8	50
1279	4	16	54
7302	8	4	100
584	8	8	11
8462	8	8	12

Tableau 3 : Doses Efficaces 50 de la teicoplanine pour les 10 souches de *S. epidermidis* étudiées dans le modèle de sepsis/péritonite de souris.

Il n'existe pas de corrélation entre la CMI de la teicoplanine déterminée en milieu solide ou en milieu liquide et la DE₅₀ dans le modèle de sepsis sur péritonite de souris à *S. epidermidis* (figure 8).

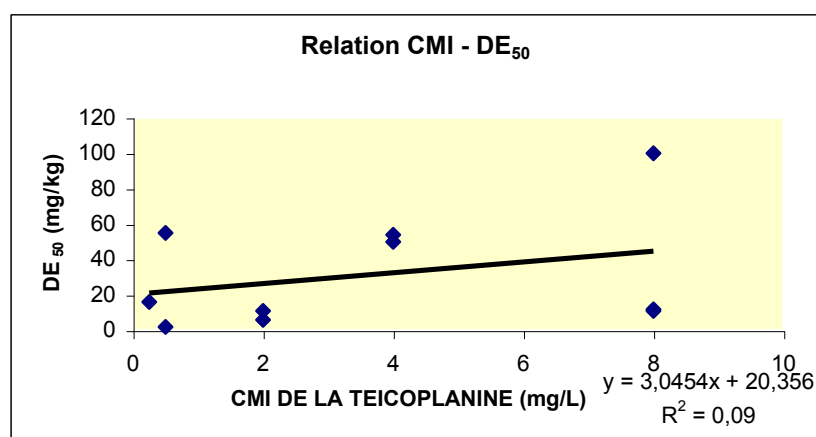


Figure 8 : Relation entre la CMI de la teicoplanine et la DE₅₀.

Dans la suite de l'étude, nous n'avons interprété les résultats qu'en fonction de la CMI déterminée en milieu solide.

III-2-2- Bactériémie

Nous n'avons pu évaluer la bactériémie que pour 6 souches sur 10. La bactériémie est mesurée 4 et 24 heures après inoculation. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 4.

Souches	Bactériémies 4H (CFU/mL)	Bactériémies 24H (CFU/mL)
584	5 10 ⁵	10 ⁷
8462	10 ⁵	10 ⁶
882	10 ⁴	10 ⁴
1279	10 ⁵	10 ⁶
9075	10 ⁶	10 ⁶
7302	10 ⁵	10 ⁶

Tableau 4: Bactériémies à 4 et 24 heures

Les bactériémies sont élevées et comparables d'une souche à l'autre. Seule la souche 882 est responsable d'une plus faible bactériémie.

Devant l'absence de corrélation entre activités in vitro et in vivo de la teicoplanine, plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- 1) Tolérance de certaines souches à la teicoplanine ou existence de sous-populations de sensibilité diminuée à la teicoplanine
- 2) Présence de facteurs de pathogénicité permettant aux souches ayant des DE_{50} élevées d'échapper au traitement.

III-3- Autres facteurs prédictifs de l'activité de la teicoplanine

III-3-1- Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide et étude de la tolérance des souches à la teicoplanine

L'étude de la tolérance des souches de cette étude vis-à-vis de la teicoplanine était destinée à savoir si les souches dont la CMI de la teicoplanine est basse et la DE_{50} élevée étaient tolérantes à cet antibiotique.

Les CMB obtenues sont comprises entre 8 et 512 mg/L et les rapports CMB/CMI entre 2 et 64 (tableau 5). Les souches 7318, 2239 et 584 sont tolérantes à la teicoplanine mais seule la souche 2239 a une DE_{50} élevée.

Souches	DE_{50} (mg/kg)	CMI en milieu liquide(mg/L)	CMB (mg/L)	CMB/CMI
7318	2	1	32	32
2239	55	2	64	32
7989	6	4	16	4
7026	16	4	8	2
7302	100	4	32	8
9075	11	8	64	8
882	50	8	128	16
584	11	8	512	64
8462	12	8	32	4
1279	54	16	32	2

Tableau 5: Etude de la Concentration Minimale Bactéricide.

Il n'existe pas de relation entre la CMB et la DE₅₀ ($r^2=0,001$; $p=0,94$) (figure 9).

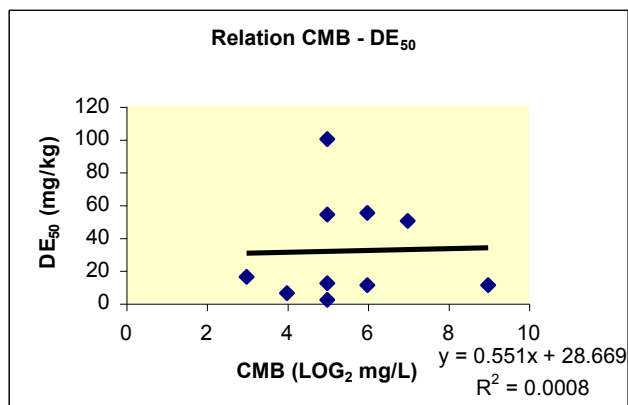


Figure 9 : Relation CMB - DE₅₀

L'augmentation de la DE₅₀ n'est pas liée à la tolérance des souches à la teicoplanine (figure 10).

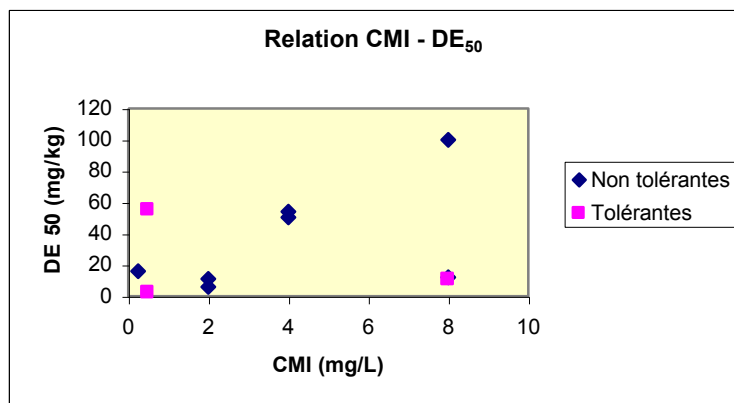


Figure 10: Analyse de la relation CMI - DE₅₀
en terme de tolérance à la teicoplanine
des souches de *S. epidermidis* .

III-3-2- Analyse de population

Cette analyse a été effectuée uniquement sur les souches 1279 et 7989 de CMI comparables et de DE₅₀ très différentes (tableau 6).

Souches	CMI (mg/ mL)	DE ₅₀
1279	4	54
7989	2	6

Tableau 6: Caractéristiques des souches 1279 et 7989.

Les aires sous la courbe des profils d'analyse de population sont de 38 pour la souche 1279 et 39,7 pour la souche 1279. Les profils des 2 souches sont superposables (figure 11).

Aucune sous-population moins sensible à la teicoplanine n'a été mise en évidence.

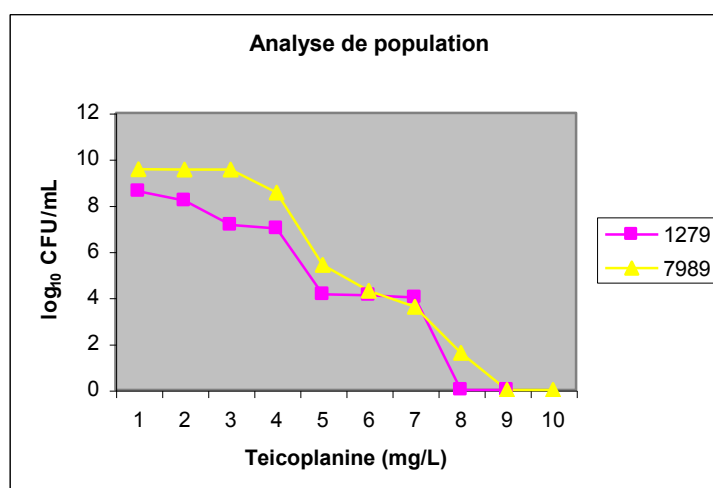


Figure 11: Profils d'analyse de populations des souches 1279 et 7989.

III-4- Etude des facteurs de pathogénicité

III-4-1- Typage *agr* des souches

La figure 12 montre les résultats du typage *agr* par PCR multiplex. Les souches 7318 et 2239 sont du groupe I ; les souches 1279 et 584 sont du groupe II et les souches 7026, 7989 et 882 sont du groupe III. Nous ne sommes pas parvenus à typer les souches 9075, 7302 et 8462.

Les souches étudiées appartiennent aux 3 groupes *agr*.

Les souches dont les DE₅₀ sont élevées n'appartiennent pas au même groupe *agr* (tableau 7)

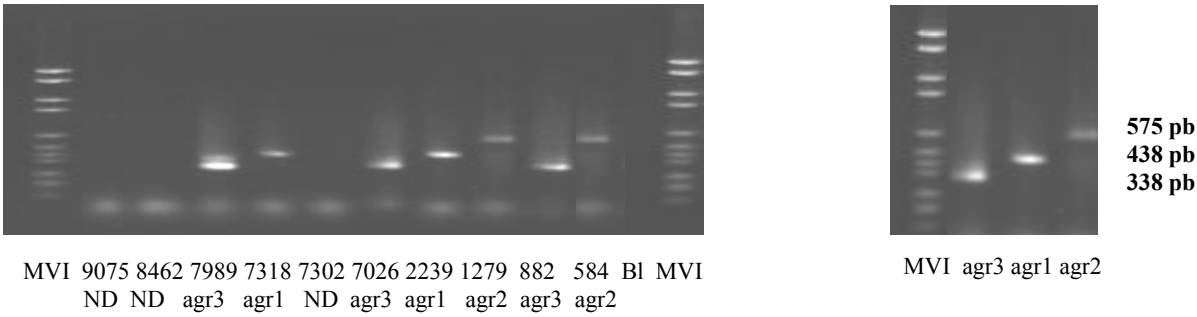


Figure 12: Typage *agr* des 10 souches de *S. epidermidis* par PCR multiplex.
A droite : taille attendue pour chaque groupe. (MVI : marqueur de taille, Bl : Blanc)

Souches	CMI (mg/L)	DE ₅₀ (mg/kg)	Groupe <i>agr</i>
7026	0,25	16	3
7318	0,5	2	1
2239	0,5	55	1
7989	2	5	3
9075	2	11	ND
1279	4	54	2
882	4	50	3
584	8	11	2
8462	8	12	ND
7302	8	100	ND

Tableau 7: typage *agr* des 10 souches de *S. epidermidis*

Nous n’avons pas mis en évidence de lien entre le groupe *agr* et la DE₅₀ (figure 13).

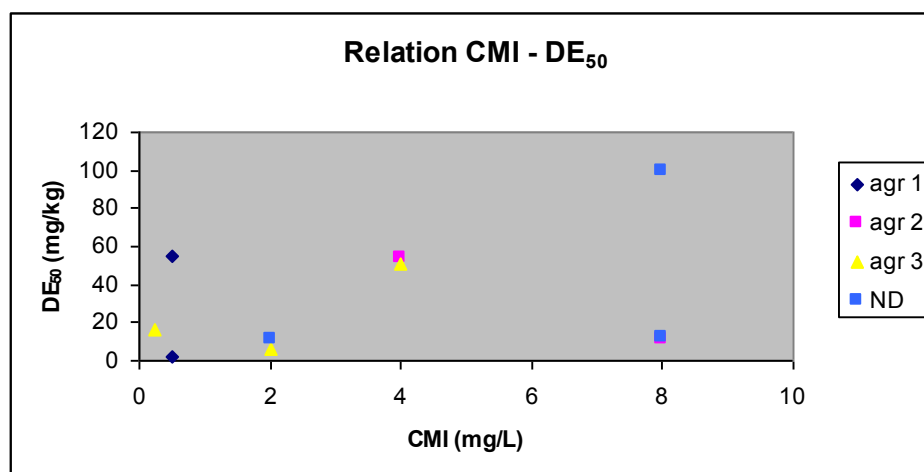


Figure 13: Relation CMI-DE₅₀ en fonction des groupes *agr*.

III-4-2- Recherche du gène *icaA*

La figure 14 montre les produits de PCR après migration en gel d'agarose.

Seules 2 souches (882 et 2239) possèdent le gène *icaA* (figure 14 et tableau 8). Ces 2 souches ont une DE₅₀ élevée, mais la présence du gène *icaA* ne semble pas à elle seule expliquer l'augmentation de la DE₅₀ puisque les souches 1279 et 7302 ayant également une DE₅₀ élevée ne possèdent pas ce gène.

Une DE₅₀ élevée ne semble pas liée à la présence du gène *ica* (figure 15)

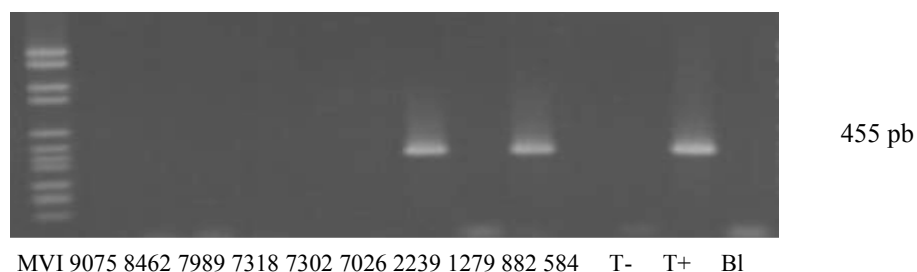


Figure 14: Amplification du gène *icaA* par PCR (T- : témoin négatif (ATCC 35982), T+ : témoin positif (ATCC 35984))

Souches	CMI (mg/L)	DE ₅₀ (mg/kg)	Présence de <i>icaA</i>
7026	0,25	16	-
7318	0,5	2	-
2239	0,5	55	+
7989	2	5	-
9075	2	11	-
1279	4	54	-
882	4	50	+
584	8	11	-
8462	8	12	-
7302	8	100	-

Tableau 8: Détection du gène *icaA* chez les 10 souches de *S. epidermidis*

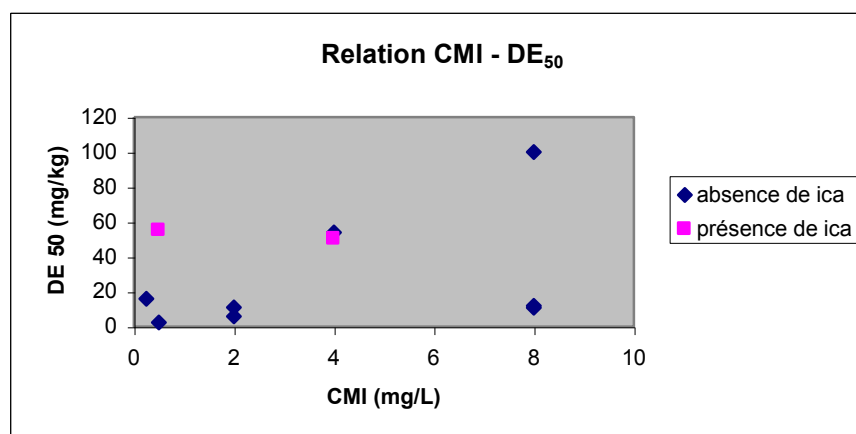


Figure 15: Relation CMI-DE₅₀ en fonction de la présence du gène *icaA*

III-4-3- Formation de biofilm

Un des principaux facteurs de virulence de *S. epidermidis* est la production de biofilm qu'il est possible de visualiser macroscopiquement en cultivant les souches sur un support auquel elles peuvent adhérer.

Les plaques inoculées pour recherche de formation de biofilm sont illustrées par la figure 16.

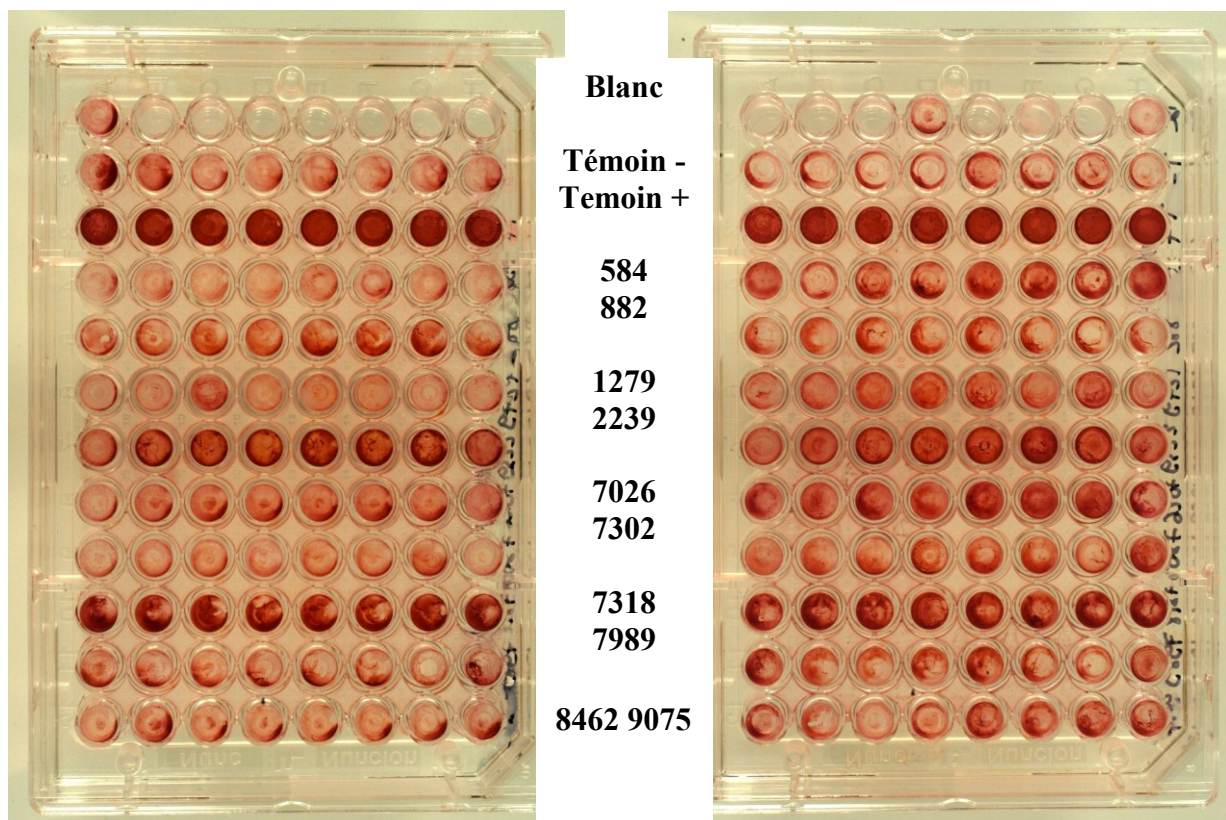


Figure 16 : Formation de biofilm sur plaque à puits à fonds plats(T- : témoin négatif (ATCC 12228 ; T+ : témoin positif (ATCC 35984)).

Les médianes des densités optiques (DO) varient de 0,137 à 0,6195 (tableau 9). L'analyse des DO fait apparaître que 3 souches (2239, 7026 et 7318) ont une médiane bien supérieure à la médiane des autres souches, ce qui confirme l'impression visuelle que ces 3 souches forment un biofilm. Les souches 2239, 7026 et 7318 forment un biofilm (tableau 10). La souche 2239 a une DE₅₀ élevée et les souches 7026 et 7318 ont une DE₅₀ basse.

	Blanc	T-	T+	584	882	1279	2239	7026	7302	7318	7989	8462	9075
DO	0,0125	0,2020	1,048	0,137	0,23	0,2215	0,548	0,577	0,2935	0,6195	0,2455	0,3	0,1645

Tableau 9 : Médianes des densités optiques après lecture par spectrométrie des puits colorés à la safranine

Souches	CMI (mg/L)	DE ₅₀ (mg/kg)	Formation de biofilm
7026	0,25	16	+
7318	0,5	2	+
2239	0,5	55	+
7989	2	5	-
9075	2	11	-
1279	4	54	-
882	4	50	-
584	8	11	-
8462	8	12	-
7302	8	100	-

Tableau 10: Recherche de formation de biofilm chez les 10 souches de *S. epidermidis*.

Nous n'avons donc pas mis en évidence de lien entre la capacité des souches à former un biofilm et l'augmentation de la DE₅₀ (figure 17).

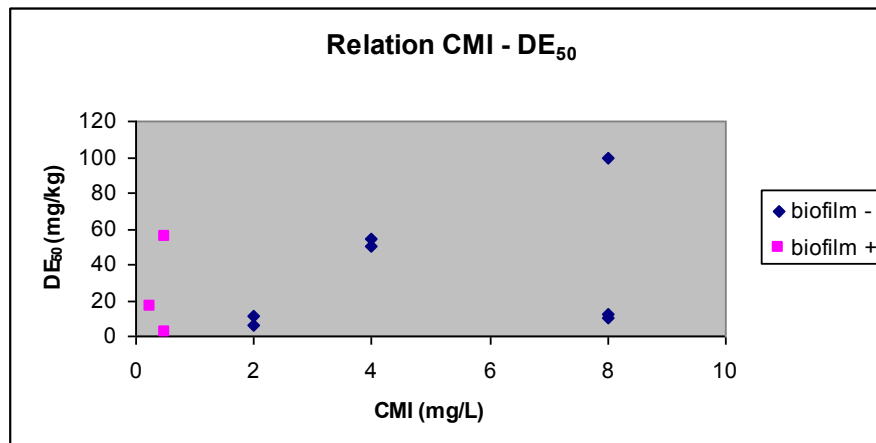


Figure 17: Relation CMI-DE₅₀ en fonction de la capacité des souches à former un biofilm.

III-4-4- Hémolyse delta

La **figure 18** montre les géloses après 24 heures d'incubation. On constate une hémolyse totale dans la zone d'intersection de la souche de *S. aureus* et des souches de *Staphylococcus epidermidis* 584, 882, 2239, 7302, 7318 et 7989.

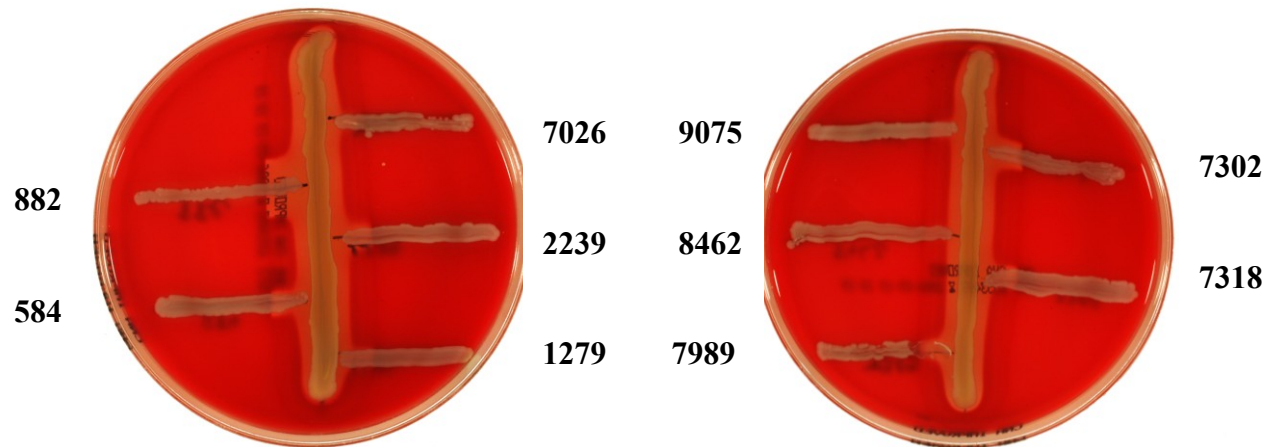


Figure 18: Recherche de hémolyse delta

La delta toxine est donc présente chez des souches dont les DE_{50} sont très différentes (tableau 11).

Souches	CMI (mg/L)	DE_{50} (mg/kg)	Synthèse de delta toxine
7026	0,25	16	-
7318	0,5	2	+
2239	0,5	55	+
7989	2	5	+
9075	2	11	-
1279	4	54	-
882	4	50	+
584	8	11	+
8462	8	12	-
7302	8	100	+

Tableau 11: Recherche de la synthèse de delta toxine.

Il ne semble pas y avoir de lien entre la sécrétion de la delta toxine et la DE_{50} (figure 19)

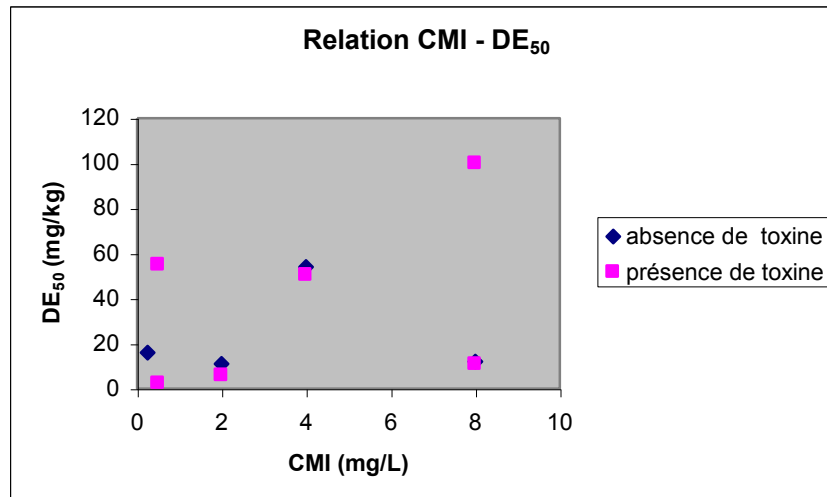


Figure 19: Relation CMI-DE₅₀ en fonction de la synthèse de delta toxine.

III-5- Etude de l'activité autolytique des souches

III-5-1- Autolyse induite par le Triton X-100

La figure 20 montre un exemple de courbe de décroissance de la DO exprimée en pourcentage de la DO initiale en fonction du temps due à l'autolyse sous Triton X 100.

L'autolyse est nette dès la 2^e heure.

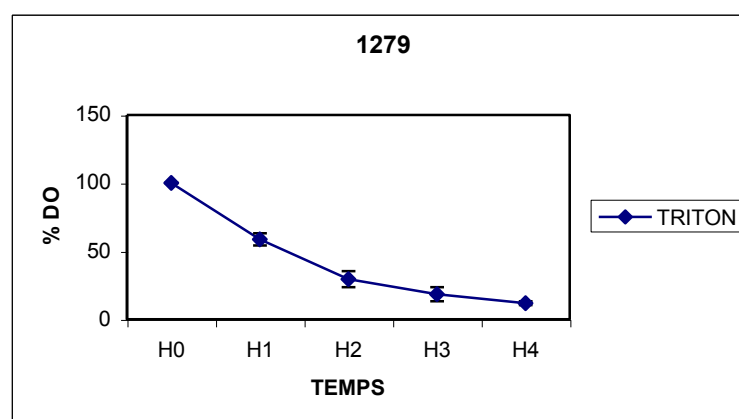


Figure 20: Exemple de courbe obtenue au cours d'une manipulation d'autolyse induite par le Triton. La courbe représente la moyenne et l'écart type de 3 manipulations.

Les courbes d'autolyse ont le même profil pour toutes les souches, seules les aires sous la courbe varient. C'est pour cette raison que nous ne présentons qu'une seule courbe de décroissance.

Les Aires Sous la Courbe de l'autolyse sous Triton sont comprises entre 126 et 248 (tableau 12).

Souches	CMI (mg/L)	DE₅₀ (mg/kg)	ASC
7026	0,25	16	181
7318	0,5	2	180
2239	0,5	55	129
7989	2	5	184
9075	2	11	156
1279	4	54	186
882	4	50	166
584	8	11	234
8462	8	12	248
7302	8	100	126

Tableau 12: Résultats des manipulations d'autolyse sous Triton X-100

Relation ASC-CMI

Il n'existe pas de relation entre l'ASC et la CMI ($r^2=0,11$; $p=0,33$).

Relation ASC - DE₅₀

Il existe en revanche une corrélation entre l'autolyse sous Triton et la DE₅₀ ($r = -0,73$, $p=0,05$) (Figure 21).

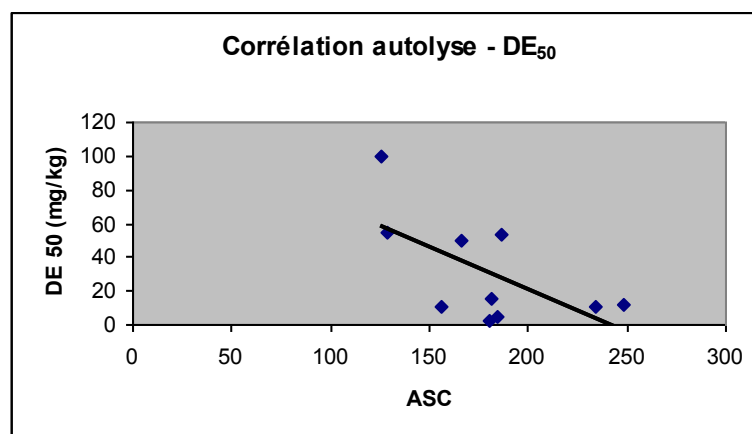


Figure 21: Corrélation ASC autolyse sous Triton X-100– DE₅₀

Nous constatons ainsi qu'une DE_{50} élevée est liée à une autolyse importante sous Triton. L'autolyse est un phénomène bactérien physiologique impliquant des enzymes liées à la division cellulaire comme à la mort bactérienne. Elle fait intervenir des enzymes telles que les autolysines. Nous avons donc voulu savoir si la différence d'autolyse des souches était due à une différence d'expression du gène *atlE*. Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que les souches possédaient ce gène afin d'en étudier l'expression dans un second temps. Nous avons en parallèle évalué la bactériémie pour savoir si les souches les plus autolytiques in vitro étaient responsables d'une plus forte bactériémie.

Relation ASC- bactériémie

Souches	Bactériémie H4 (CFU/mL)	Bactériémie H24 (CFU/mL)	ASC (autolyse sous Triton)
584	$5 \cdot 10^5$	10^7	234
8462	10^5	10^6	248
882	10^4	10^4	166
1279	10^5	10^6	186
9075	10^6	10^6	156
7302	10^5	10^6	126

Tableau 13: Bactériémies et ASC des 10 souches de *S. epidermidis*

La bactériémie est comparable pour toutes les souches et sans lien avec l'autolyse.

III-5-2- Recherche du gène *atlE* et analyse de son expression par RT-PCR

La **figure 22** montre les produits de PCR après migration en gel d'agarose.

Toutes les souches possèdent le gène *atlE*.

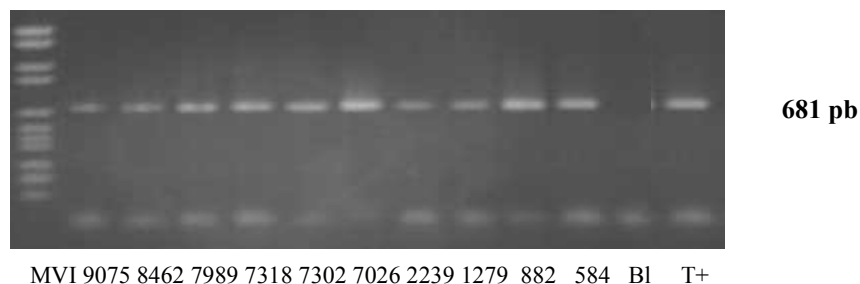


Figure 22 : Amplification du gène *atIE* par PCR (MVI : marqueur de taille VI, Roche ; BI : blanc, T+ : souche ATCC 35982).

La technique de RT-PCR du gène *atIE* n'avait jamais été utilisée au laboratoire. A des fins de mise au point technique, nous avons étudié l'expression de *atIE* chez 2 groupes de 2 souches les plus typiques ayant des profils autolytiques opposés (les souches 584 et 8462 ont des autolyses faibles contrairement aux souches 2239 et 7302).

La technique a été réalisée plusieurs fois afin d'obtenir des résultats interprétables mais s'avère encore peu reproductible. Nous avons choisi pour illustration et à titre d'exemple des profils nets mais qui ne sont pas représentatifs de toutes les manipulations (figure 23).

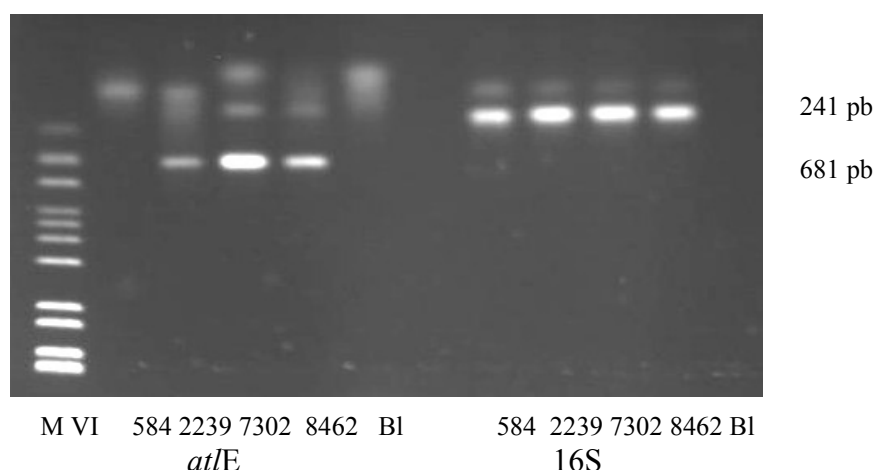


Figure 23: Etude de l'expression du gène *atIE* chez 4 souches de l'étude.

La quantité d'ARN extrait est équivalente pour les 4 souches (densités des bandes 16S comparables). Comme au cours des autres manipulations, il semble que le gène *atIE* s'exprime fortement chez la souche 7302 dont l'autolyse est importante. Sur cette figure, l'expression de *atIE* semble faible chez la souche 584 d'autolyse réduite. L'expression de ce gène est plus

difficilement interprétable pour les souches 2239 et 8462 de profils autolytiques très différents. Nous n'avons donc pas pu conclure à la suite de cette analyse dont la technique reste à améliorer.

Récapitulatif des différents résultats :

Souches	CMI	DE ₅₀	CMB/CMI	Groupe <i>agr</i>	Formation de biofilm	Présence du gène <i>icaA</i>	Synthèse de delta toxine	ASC
7026	0.25	16	32	3	+	-	-	181
7318	0.5	2	32	1	+	-	+	180
2239	0.5	55	4	1	+	+	+	129
7989	2	5	2	3	-	-	+	184
9075	2	11	8	ND	-	-	-	156
1279	4	54	8	2	-	-	-	186
882	4	50	16	3	-	+	+	166
584	8	11	64	2	-	-	+	234
8462	8	12	4	ND	-	-	-	248
7302	8	100	2	ND	-	-	+	126

Tableau 14: Synthèse des résultats

IV-DISCUSSION

Les glycopeptides constituent actuellement les antibiotiques de choix dans le traitement des infections à staphylocoques résistants à la méticilline. La diminution de la sensibilité des staphylocoques à ces antibiotiques pourrait remettre en cause cette recommandation. Nous avons voulu savoir si la diminution de sensibilité des souches de *S. epidermidis* à la teicoplanine se manifestait par une diminution de l'efficacité de cet antibiotique in vivo.

Le modèle animal que nous avons utilisé présente des limites, cependant, les facteurs de virulence et de pathogénicité que nous avons étudiés nous permettent de poser un certain nombre d'hypothèses. Le lien entre autolyse in vitro et activité de la teicoplanine ouvre de nouvelles voies de recherche.

IV-1- Limites du modèle animal

Afin de savoir quelle était la conséquence d'une augmentation de la CMI de la teicoplanine vis à vis des souches de *S. epidermidis*, il était indispensable d'établir un lien entre la CMI de la teicoplanine et son activité in vivo.

Les modèles d'expérimentations animales ainsi que les modalités d'évaluations de l'activité des antibiotiques étant multiples et variés, nous avons choisi un modèle de sepsis sur péritonite chez la souris. Ce modèle est simple, rapide et reproductible et établit une corrélation entre CMI et activité in vivo pour de nombreux antibiotiques.

Frimodt-Moller et col. utilisaient en effet ce modèle en 1986 pour étudier l'activité de céphalosporines sur des souches de *S. pneumoniae* et trouvaient une bonne corrélation entre CMI et efficacité in vivo de ces antibiotiques (Frimodt-Moller, 1986). Il ne semble pas en être de même pour le couple teicoplanine - *S. epidermidis*.

Comme critère d'évaluation de l'efficacité de la teicoplanine, nous avons choisi la DE₅₀ car c'est le paramètre le plus pertinent et utilisé par de nombreux auteurs. Domenech et col. ont étudié l'activité de plusieurs antibiotiques sur des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides dans un modèle de sepsis sur péritonite de souris, mais en évaluant l'efficacité antibiotique par des numérations bactériennes dans le liquide péritonéal et dans le sang. En utilisant ces critères, ils trouvent une corrélation entre la CMI de la vancomycine et

l'activité in vivo de cet antibiotique. La corrélation pour la teicoplanine n'est pas rapportée dans cette étude (Domenech, 2004).

Le protocole que nous avons utilisé dans le travail présenté ici avait été validé dans une étude préliminaire étudiant des souches de *S. epidermidis* soumises à l'action de la teicoplanine et de la ciprofloxacine. Dans ce travail, une corrélation a été obtenue entre activités in vitro et in vivo de la ciprofloxacine mais pas de la teicoplanine (Batard, 2004). Le modèle et le protocole de traitement sont donc corrects. Dans ce même modèle, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre CMI et DE₅₀ de la vancomycine pour les 10 souches de *S. epidermidis* présentées ici.

D'autres études avaient déjà montré une absence de corrélation entre l'activité in vitro des glycopeptides et leur efficacité in vivo : Knudsen et col ont étudié l'activité de la vancomycine et de la teicoplanine sur des souches de *S. pneumoniae* dans un modèle de sepsis sur péritonite de souris. Ils trouvent un lien entre la CMI de la vancomycine et son activité in vivo (évaluée par la DE₅₀) mais ils ne trouvent pas de corrélation entre ces deux paramètres pour la teicoplanine. Cependant, ils trouvent une corrélation entre DE₅₀ et CMI de la teicoplanine déterminée non pas en gélose, mais dans du sérum de souris. La teicoplanine étant liée à 90% aux protéines dans le sérum, il est possible que cette fixation modifie in vivo l'activité de la teicoplanine (Knudsen, 1997). Kennedy a évalué la CMI de cet antibiotique vis à vis de souches de staphylocoques à coagulase négative en absence et en présence de sérum de cheval (20%) et montrait une augmentation de la moyenne des CMI par cette méthode (Kennedy, 1996). La même constatation avait été faite en 1990 sur une souche de *Streptococcus sanguis* et une souche de *S. aureus* pour lesquelles les CMI étaient déterminées en présence de sérum de lapin (Chambers, 1990). D'après ces données, il apparaît nécessaire dans notre étude d'évaluer les CMI de la teicoplanine en présence de sérum de souris.

Asseray et col. en 2005 ne trouvaient pas de lien entre la CMI des glycopeptides et leur activité dans un modèle d'endocardite de lapin à *S. aureus* (Asseray, 2005). De même, Peetermans et col. avaient déjà établi en 1990 un modèle mathématique complexe afin de relier l'activité in vitro des glycopeptides et leur efficacité dans un modèle expérimental d'infection musculaire à *S. aureus* chez la souris, ce modèle ne permettait pas de prédire l'activité de la teicoplanine aux basses doses (Peetermans, 1990).

IV-2- Etude des facteurs de virulence

Ne parvenant pas à établir un lien entre CMI de la teicoplanine et DE_{50} , nous avons cherché à savoir si les souches de notre étude présentaient un mode particulier de persistance aux antibiotiques : la capacité de former un biofilm, ou si elles possédaient le capital génétique pour le former. Nous savions en effet que la différence de mortalité des souris dans notre modèle n'était pas due à une différence de virulence entre les souches utilisées puisque celles-ci avaient été sélectionnées, entre autres critères, sur leur virulence (médiane de survie : un jour).

La constitution de biofilm est reconnue comme facteur de virulence principal de *S. epidermidis* (Vuong, 2002) et comme cause d'infection persistante (Costerton, 1999). Les glycopeptides sont peu actifs sur des biofilms déjà formés de *S. epidermidis* in vitro comme in vivo comme l'ont montré Schwank et col. sur des biofilms de 16h in vitro et dans un modèle animal, et Monzon et col. sur des biofilms de différents âges (Schwank, 1998, Monzon 2002). Par contre, ces mêmes antibiotiques, et en particulier la teicoplanine peuvent prévenir l'adhésion au support des staphylocoques même si un effet contraire peut également être observé (Carsenti - Etesse, 1993).

Nous avons donc étudié la formation de biofilm et la présence des gènes liés à la formation de biofilm chez les 10 souches de l'étude.

La recherche phénotypique de biofilm montre que 3 souches seulement peuvent former un biofilm. Dans la mesure où nous avons choisi des souches pathogènes, on pouvait penser que plus de souches formeraient un biofilm.

Le gène *atlE*, responsable de l'attachement au support, est retrouvé chez toutes les souches étudiées. Ceci était déjà signalé dans une autre étude sur des souches de *S. epidermidis* (Rohde, 2004). *atlE* codant pour l'autolysine majeure de *S. epidermidis*, ce résultat est cohérent.

A contrario, nos résultats de la recherche du gène *ica* sont inhabituels. En effet, plusieurs travaux portant sur l'étude des facteurs de virulence de *S. epidermidis* montrent qu'on trouve ce gène chez environ 80% des souches invasives. Comme nous l'avons vu dans les rappels bibliographiques, certains auteurs avaient d'ailleurs proposé ce gène comme marqueur de pathogénicité chez les souches invasives en opposition aux souches commensales (Galdbart, 2000). Ce résultat a, depuis, été remis en question. Dans notre étude, nous ne retrouvons ce gène que chez 2 souches. Rappelons que le gène *ica* code pour la synthèse de la molécule PIA permettant l'adhésion intercellulaire à l'intérieur du biofilm.

Une des 2 souches possédant le gène *ica* ne forme pas de biofilm. Ce phénomène a été rapporté et peut être attribué à l'insertion de la séquence IS 256 décrit par Ziebuhr en 1999 (Ziebuhr, 1999). Cette séquence a été retrouvée chez différentes espèces de bactéries à Gram positif, et est utilisée comme marqueur épidémiologique. Chez *S. epidermidis*, elle permet une modulation de l'expression de facteurs de virulence, comme la constitution de biofilm, par son insertion réversible dans le gène *ica*. Elle a été retrouvée dans les parties A et C de l'opéron, empêchant ainsi la synthèse de PIA, et son excision permet à la souche de retrouver la capacité de former un biofilm. Ce mécanisme permettrait l'adaptation des souches à l'environnement (Ziebuhr, 1999). Nous n'avons pas recherché cette séquence chez la souche *ica* positif et biofilm négatif.

Les deux autres souches formant un biofilm ne possèdent pas le gène *ica*. Ceci avait déjà été signalé par plusieurs auteurs (Gelosi, 2001 ; Tormo, 2005). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène : soit le gène *ica* est modifié et est alors indétectable par la PCR utilisée, soit les souches possèdent d'autres gènes leur permettant de former un biofilm. A titre d'exemple, le gène *bap* a été décrit en 2005 (gène codant pour BAP : Biofilm Associated Protein). Ce gène est présent chez des souches de staphylocoques responsables de mastites bovines, souches formant du biofilm et ne possédant pas le gène *ica*. L'équivalent de ce gène a été identifié chez des souches de *S. epidermidis* d'origine humaine (gène *bhp* : BAP homolog protein) (Tormo, 2005).

Ainsi, afin de mieux expliquer les observations faites chez les souches de notre étude, d'autres éléments génétiques pourraient être recherchés.

La formation de biofilm est en partie régulée par le système de quorum sensing *agr*. Le groupe *agr* des souches de *S. epidermidis* a été lié à la pathogénicité. Le lien entre la sensibilité aux antibiotiques et le groupe *agr* n'a pas été démontré chez les souches de *S. epidermidis*. Dans notre étude, nous n'avons pas établi de lien entre le groupe *agr* et la sensibilité des souches à la teicoplanine, in vivo comme in vitro. En outre, nous n'avons pas réussi à typer 3 souches dans le système *agr*. Lina et col. trouvent également des souches non typables avec les mêmes amorces (Lina, 2003). Là encore, on peut avancer l'hypothèse d'une modification du gène, rendu indétectable lors de la PCR. Pour s'assurer que les souches appartenaient bien à l'espèce *S. epidermidis*, nous avons réalisé une identification génotypique des souches par PCR-RFLP du gène *tuf* dont le profil de restriction est spécifique de chaque staphylocoque à coagulase négative.

Existe-t-il d'autres facteurs de virulence susceptibles d'expliquer la différence de pathogénicité des souches? L'interaction avec le système immunitaire peut être en cause. La variabilité d'expression par les souches des « Phenol Soluble Modulins » (PSM) pourrait expliquer la plus forte mortalité due à certaines de ces souches. Les PSM forment un complexe pro-inflammatoire composé de 5 molécules (α , β , γ , δ , ϵ) synthétisé par *S. epidermidis* et capable d'activer le système immunitaire humain. Les PSM sont des molécules chimioattractantes, diminuent l'apoptose des monocytes et des polynucléaires neutrophiles, augmentent la dégranulation des polynucléaires neutrophiles et la libération de cytokines par les monocytes (Liles, 2001). Elles sont donc en grande partie responsables du syndrome inflammatoire lors de l'infection à *S. epidermidis*. De plus, ces molécules sont responsables du détachement des cellules du biofilm et de la dissémination bactérienne dans l'hôte (Yao, 2005). Si le rôle d'immunostimulation est vraisemblablement moindre dans notre modèle puisque les souris sont rendues neutropéniques par le cyclophosphamide, la dissémination et la formation de foyer secondaire d'infection est peut être en cause. La recherche de sécrétion de delta-toxine, une des PSM, ne nous a pas permis de faire de lien avec la DE₅₀ des souches dans notre étude. Nous n'avons pas recherché de différence d'expression de cette toxine entre les souches.

Enfin, la réponse de défense d'un hôte à l'autre, sous traitement, peut être différente. Des peptides tels que tPMP-1 (thrombin-induced Platelet Microbicidal Protein-1) et HNP-1 (Human Neutrophil Peptide -1), synthétisées respectivement par les plaquettes et par les polynucléaires humains, ont une activité antimicrobienne contre *S. aureus* par destruction de la membrane bactérienne. In vitro, cette activité est augmentée par un prétraitement par glycopeptides en particulier l'action de tPMP-1 (Xiong, 1999). L'augmentation de l'action lytique est-elle identique pour l'ensemble des souches? Il a été montré que des souches cliniques de *S. aureus* responsables de bactériémies persistantes sous antibiothérapie adaptée étaient moins sensibles à l'action de t-PMP (Fowler, 2004). A notre connaissance, ces phénomènes n'ont pas été étudiés sur *S. epidermidis* mais existent probablement pour cette espèce bactérienne.

Si le modèle de sepsis sur péritonite de souris est pertinent dans l'étude de la relation CMI-DE₅₀, il n'est pas représentatif de la physiopathologie des infections à *S. epidermidis* puisque ce germe est le plus souvent responsable d'infection sur matériel étranger. Il apparaît donc qu'il serait plus approprié d'étudier l'activité des glycopeptides dans un modèle animal expérimental d'infection sur matériel étranger, modèle plus complexe à manipuler que celui que nous avons choisi.

Nous pensons également que l'analyse des facteurs de virulence sur des souches après culture sur gélose est probablement peu représentative des mécanismes physiopathologiques mis en jeu

in vivo. Une étude de l'expression des facteurs de pathogénicité à partir de prélèvements directement issus du sujet infecté semblerait donc plus approprié. Ces analyses, extrêmement complexes à effectuer, commencent à être possibles.

De plus, les bactéries possèdent de nombreux mécanismes de régulation leur permettant de s'adapter à leur environnement et le système immunitaire de l'hôte est susceptible d'interagir différemment avec les microorganismes d'une infection à l'autre. Il est donc tout à fait possible que la même bactérie active différents gènes de virulence au cours de différentes infections et que l'étude des facteurs de pathogénicité ne permettent pas de prédire le caractère commensal ou agressif d'une souche bactérienne.

IV-3- Tolérance, analyse de population

Comme évoqué dans les rappels bibliographiques, la tolérance bactérienne aux glycopeptides a été rapportée comme mécanisme possible lors d'échecs de traitements d'infections à staphylocoques. Dans notre travail, nous n'avons pas établi de lien entre CMB et DE_{50} de la teicoplanine.

Chez les souches de staphylocoques dorés, la résistance aux glycopeptides est précédée par un stade d'hétéro-résistance aux glycopeptides détectable par analyse de population. La signification clinique de ces souches est peu aisée à établir car l'hétéro-résistance est difficile à déterminer mais a été incriminée dans des échecs de traitements par glycopeptides. Il existe également chez les staphylocoques à coagulase négative des sous-populations pouvant croître en présence de concentrations importantes de glycopeptides (Sieradski, 1998). Dans notre étude, la recherche de sous-populations résistantes à la teicoplanine a été réalisée pour 2 souches de CMI identiques et de DE_{50} différentes. Les profils d'analyses de populations sont identiques pour les 2 souches et nous ne pouvons donc pas mettre en cause la sélection de sous-populations résistantes in vivo pour expliquer la différence de DE_{50} entre ces 2 souches. Il serait bien sûr nécessaire d'établir un profil d'analyse de population pour toutes les souches de l'étude afin de pouvoir conclure.

IV-4- Autolyse

Nous avons été amenés à étudier l'autolyse des souches suite à 2 constats : la protéine AtlE, autolysine majeure de *S. epidermidis*, responsable de l'attachement cellulaire lors de la phase initiale d'invasion de la bactérie est également responsable de la lyse du peptidoglycane lors de la division cellulaire. Des études révèlent une diminution de l'autolyse chez les souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) liée à une diminution d'expression du gène *atl*. La diminution de l'autolyse précéderait l'augmentation de la CMI des glycopeptides chez les souches GISA. Nos expériences étaient donc destinées à chercher une différence d'autolyse entre les souches de *S. epidermidis* dont les DE₅₀ sont très différentes. Nous retrouvons une différence importante de l'autolyse chez les souches étudiées, cette différence n'est en revanche pas liée à la différence de CMI entre les souches : les souches de CMI élevée n'ont pas une autolyse réduite. D'autre part, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre l'autolyse et la tolérance de certaines souches.

Nous avons donc été surpris de constater qu'une autolyse forte est associée à une DE₅₀ élevée puisque nous attendions en effet la réaction inverse. A notre connaissance, le lien entre autolyse et traitement n'a été étudié qu'une fois dans un travail analysant les caractéristiques de souches de SARM responsables de bactériémies persistantes sous traitement par glycopeptides. Dans cette étude, l'autolyse sous Triton des souches responsables de bactériémies persistantes n'était pas modifiée (Fowler, 2004).

A la suite de ce résultat, nous pouvions émettre plusieurs hypothèses sur les causes et les conséquences d'une augmentation de l'autolyse. Une des causes possibles de l'augmentation de l'autolyse induite in vitro est l'augmentation de l'expression du gène *atlE*, mais l'expression d'autres autolysines est tout à fait envisageable. Nous avons donc cherché à analyser l'expression de ce gène par RT-PCR. Cette technique n'était pas développée au laboratoire. La mise au point de la technique a nécessité de nombreux protocoles avant d'obtenir des résultats satisfaisants. Les dernières PCR donne des résultats tout à fait lisibles mais encore peu reproductibles pour certaines souches. Cette technique reste encore à améliorer pour pouvoir conclure.

En ce qui concerne les conséquences de l'augmentation de l'autolyse in vivo, sachant que les enzymes autolytiques bactériennes interviennent à la fois dans les mécanismes de division et de lyse bactérienne, il nous semblait possible que l'activité des autolysines soit liée, in vivo, à une multiplication bactérienne rapide qui conduirait alors à l'augmentation croissante de la bactériémie et à la mort de l'animal. La mesure de la bactériémie pour certaines des souches

montre qu'elle est comparable d'un animal à l'autre et il est peu probable que cette hypothèse se révèle juste. Toutefois, il faudrait effectuer cette mesure pour toutes les souches pour conclure. L'augmentation de l'autolyse peut au contraire entraîner in vivo la libération importante de molécules pro-inflammatoires comme l'acide teichoïque ou comme les PSM, responsables de manifestations systémiques et de la mort de l'animal malgré des doses importantes d'antibiotiques. Des investigations complémentaires comme le dosage des PSM pourraient être envisageables.

IV-5- Application pratique en thérapeutique

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de relation entre activités in vivo et in vitro de la teicoplanine vis à vis de *S. epidermidis* et nous ne pouvons donc pas affirmer que l'augmentation de la CMI de la teicoplanine se soldera par un échec lors d'un traitement par cet antibiotique. En pratique, peu d'échecs thérapeutiques sont rapportés sous teicoplanine. Ces échecs ont eu lieu il y a quelques années à des posologies faibles (Gilbert, 1991 ; O'Connell, 1993). Il est primordial d'utiliser l'antibiotique aux doses adaptées et d'effectuer des dosages sanguins si nécessaire afin de s'assurer d'être dans les conditions optimales d'efficacité théorique du traitement. L'utilisation de la teicoplanine dans les infections dues à des souches de CMI élevées considérées comme sensibles (4 mg/L) ne pourra être remise en cause que lorsqu'un nombre conséquent d'échecs thérapeutiques en première ligne seront décrits.

En pratique, la vancomycine et, depuis moins longtemps, le linézolide, sont des traitements efficaces dans les infections à staphylocoques résistants à la méticilline en parallèle des traitements par teicoplanine. D'autres molécules anti-staphylococciques (ceftaroline, ceftobiprole) sont en cours d'étude et constitueront bientôt un éventail supplémentaire de traitements alternatifs aux infections à staphylocoques résistants à la méticilline.

.

CONCLUSION

Les premiers résultats de nos travaux nous incitent à poursuivre nos investigations. Il est nécessaire d'étudier l'expression d'autres facteurs de virulence, en particulier en présence d'antibiotique. Il faut également expliquer les mécanismes responsables de l'augmentation de l'autolyse de certaines souches de *S. epidermidis*.

Les techniques d'études des bactéries cultivées sur milieux enrichis ne permet probablement de n'étudier qu'une partie des facteurs potentiellement exprimés par la bactérie in vivo. Par l'étude in vitro, nous ne faisons qu'entr'apercevoir les véritables relations qui existent entre l'hôte, la bactérie et l'antibiotique au cours d'une infection traitée. Il est probable que le comportement des bactéries est modifié in vivo par les conditions environnementales en présence entre autres des cellules du système immunitaire, d'autres éventuels agents infectieux, et dans la problématique qui nous concerne, de l'antibiotique. Pour mieux comprendre l'influence de l'antibiotique in vivo en dehors de son activité lytique, nous devons faire appel à des techniques utilisant du matériel bactérien directement issu de l'hôte, pour une analyse directe des gènes exprimés, sans l'intermédiaire de la culture.

Enfin, le manque de corrélation entre CMI et activité in vivo de la teicoplanine est-elle particulière au couple *S. epidermidis* - teicoplanine, ou existe-t-il pour d'autres bactéries et d'autres antibiotiques qui pourraient expliquer certains échecs thérapeutiques ?

ANNEXES

Annexe 1

**Correlation between Triton X-100 induced autolysis
and in vivo activity of teicoplanin against *S.*
epidermidis in the mouse sepsis peritonitis model**

ICAAC 2006

Annexe 2

**Etude de la relation entre activités in vitro et in vivo
de la teicoplanine vis à vis de *S. epidermidis***

Congrès SFM 2007

Annexe 3

Protocole d'extraction d'ARN

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Obeid S.** Evaluation de l'activité in vitro de la teicoplanine. Ed 2M2. 1991 p 10.
- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L.** In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. J Biomed Mater Res. 2002; 59(3):557-62.
- Asseray N, Jacqueline C, Le Mabecque V, Batard E, Bugnon D, Potel G, Caillon J.** Activity of glycopeptides against *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit endocarditis model: MICs do not predict in vivo efficacy. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(2):857-9.
- Batard E, Juvin ME, Jacqueline C, Potel G, Drugeon H.** There is no correlation between the Minimal Inhibitory Concentration of teicoplanin against *Staphylococcus epidermidis* and efficacy in the mouse sepsis/peritonitis model. 2005 Abstr. 15th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis., abstr.1768.
- Biavasco F, Vignaroli C, Varaldo PE.** Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19(6):403-17.
- Bourgeois I, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Pons JL, Caron F.** Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(2):740-3.
- Boyle-Vavra S, Challapalli M, Daum RS.** Resistance to autolysis in vancomycin-selected *Staphylococcus aureus* isolates precedes vancomycin-intermediate resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(6):2036-9.
- Brooun A, Liu S, Lewis K.** A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(3):640-6.
- Brown DF, Courvalin P.** Quality assessment of glycopeptide susceptibility tests: a European collaborative study. European Glycopeptide Resistance Group. Int J Antimicrob Agents. 1997; 9(3):153-63.
- Brun Y, Bes M.** *Staphylococcus*. in Précis de Bactériologie Clinique. Paris : Ed. ESKA. 2000 P 783-830.
- Carmody AB, Otto M.** Specificity grouping of the accessory gene regulator quorum-sensing system of *Staphylococcus epidermidis* is linked to infection. Arch Microbiol. 2004; 181(3):250-3.
- Carsenti-Etesse H, Durant J, Entenza J, Mondain V, Pradier C, Bernard E, Dellamonica P.** Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin and teicoplanin on adherence of staphylococci to tissue culture plates. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(4):921-3.

Cavenaghi LA, Biganzoli E, Danese A, Parenti F. Diffusion of teicoplanin and vancomycin in agar. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1992; 15(3):253-8.

Chambers HF, Kennedy S. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34(4):510-4.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6):996-1006.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418):1318-22.

Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim MN, Ploy MC, El-Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1):5-14.

Da Costa A, Kirkorian G, Isaaz K, Touboul P. Secondary infections after pacemaker implantation *Rev Med Interne.* 2000; 21(3):256-65.

de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M, Montelli AC, Fioravante AM, Neves Batalha JE, Teixeira Caramori JC, Barretti P. Predictive factors of outcome following staphylococcal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol.* 2005; 64(5):378-82.

de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):382-8.

Domenech A, Ribes S, Cabellos C, Dominguez MA, Linare J, Ariza J, Gudiol F. A mouse peritonitis model for the study of glycopeptide efficacy in GISA infections. *Microb Drug Resist.* 2004; 10: 346-353.

Donvito B, Etienne J, Greenland T, Mouren C, Delorme V, Vandenesch F. Distribution of the synergistic haemolysin genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in human staphylococci. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; 151(2):139-44.

Fan-Havard P, Nahata MC. Treatment and prevention of infections of cerebrospinal fluid shunts. *Clin Pharm.* 1987; 6(11):866-80.

Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis.* 1990; 161(1):37-40.

Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Milatovic D. Daptomycin in vitro susceptibility in European Gram-positive clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24: 59-66.

Fowler VG Jr, Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, Stryjewski ME, Eliopoulos GM, Reller LB, Corey GR, Jones T, Lucindo N, Yeaman MR, Bayer AS. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. J Infect Dis. 2004; 190(6):1140-9.

Frank KL, Hanssen AD, Patel R. *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2004; 42(10):4846-9.

Frebourg N, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J Clin Microbiol. 2000; 38(2): 877-80.

Frimodt-Møller N, Bentzon MW, Thomsen VF. Experimental infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice: correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters with in vivo effect for 14 cephalosporins. J Infect Dis. 1986; 154(3):511-7.

Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria : acyl-homo serine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(9): 685-95.

Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Ryden C, El Sohl N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. J Infect Dis. 2000; 182: 351-355.

Gelosia A, Baldassarri L, Deighton M, van Nguyen T. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. Clin Microbiol Infect. 2001; 7: 193-199.

Gilbert DN, Wood CA, Kimbrough RC. Failure of treatment with teicoplanin at 6 milligrams/kilogram/day in patients with *Staphylococcus aureus* intravascular infection. The Infectious Diseases Consortium of Oregon. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(1):79-87.

Goldstein BP, Candiani G, Arain TM, Romano G, Ciciliato I, Berti M, Abbondi M, Scotti R, Mainini M, Ripamonti F, Resconi A, Denaro M. Antimicrobial activity of MDL 63,246, a new semisynthetic glycopeptide antibiotic. Antimicrob Agents Chemotherapy. 1995; 1580-1588.

Handwerger S, Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Rev Infect Dis. 1985; 7(3):368-86.

Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol Microbiol. 1997; 24(5):1013-24.

Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekötter A, Peters G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology. 2003; 149(Pt 10):2769-78.

Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci. Drug Resist Updat. 1998;1(2):135-50.

Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(3):147-55.

Hope PG, Kristinsson KG, Norman P, Elson RA. Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci. *J Bone Joint Surg Br.* 1989; 71(5):851-5.

Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Gérard L, Vandenesch F, Etienne J, Muir TW, Novick RP. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000; 182(22):6517-22.

Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002; 70(2):631-41.

Kennedy HF, Seal DV. Influence of inoculum, medium and serum on the in-vitro susceptibility of coagulase-negative staphylococci to teicoplanin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 37(6):1103-9.

Kenny MT, Dulworth JK, Brackman MA. Comparison of the agar dilution, tube dilution, and broth microdilution susceptibility tests for determination of teicoplanin MICs. *Clin Microbiol.* 1989; 27(6):1409-10.

Knudsen JD, Fuursted K, Espersen F, Frimodt-Møller N. Activities of vancomycin and teicoplanin against penicillin-resistant *Pneumococci* in vitro and in vivo and correlation to pharmacokinetic parameters in the mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(9):1910-5.

Koch AL. Autolysis control hypotheses for tolerance to wall antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(10):2671-5.

Kodjikian L, Roques C, Campanac C, Doleans A, Baillif S, Pellon G, Renaud FN, Hartmann D, Freney J, Burillon C. *Staphylococcus epidermidis* biofilms on intraocular lens surface: review of the literature. *J Fr Ophtalmol.* 2005; 28(2):224-30.

Koehl JL, Muthaiyan A, Jayaswal RK, Ehlert K, Labischinski H, Wilkinson BJ. Cell wall composition and decreased autolytic activity and lysostaphin susceptibility of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(10):3749-57.

Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol.* 2006; 296(2-3):133-9.

Leclercq R, Soussy CJ, Drugeon HB, Auzou M, Moniot-Ville, N. Influence majeure des lots de Muller-Hinton sur les CMI de la teicoplanine vis-à-vis des staphylocoques à coagulase négative (SCN). 21^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Résumé 200/C17. 2001

Léone M, Ayem ML, Martin C. Glycopeptides *Ann Fr Anesth Reanim.* 2000; 19(3):177-87.

Li M, Guan M, Jiang XF, Yuan FY, Xu M, Zhang WZ, Lu Y. Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity. J Med Microbiol. 2004; 53(Pt 6):545-9.

Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, De Fatima M, Zuliani J, Fontana R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. J Clin Microbiol. 2002; 40(5):1681-6.

Liles WC, Thomsen AR, O'Mahony DS, Klebanoff SJ. Stimulation of human neutrophils and monocytes by staphylococcal phenol-soluble modulin. J Leukoc Biol. 2001; 70: 96-102.

Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization : role of staphylococcal *agr* alleles. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 18-23.

Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse effect of staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. Jpn J Infect Dis. 2005; 58(6):353-7.

Martin E, Nouvellon M, Pestel M, Pons JL, Lemeland JF. Evaluation of the Epsilometer test (E test) for testing the susceptibility of coagulase-negative staphylococci to teicoplanin. J Antimicrob Chemother. 1995; 36(1):83-91.

Maugein J, Pellegrin JL, Brossard G, Fourche J, Leng B, Reiffers J. In vitro activities of vancomycin and teicoplanin against coagulase-negative staphylococci isolated from neutropenic patients. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34(5):901-3.

May J, Shannon K, King A, French G. Glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 1998; 42(2):189-97.

Meylan PR, Francioli P, Glauser MP. Discrepancies between MBC and actual killing of viridans group streptococci by cell-wall-active antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1986; 29(3):418-23.

Miele PS, Kogulan PK, Levy CS, Goldstein S, Marcus KA, Smith MA, Rosenthal J, Croxton M, Gill VJ, Lucey DR. Seven cases of surgical native valve endocarditis caused by coagulase-negative staphylococci: an underappreciated disease. Am Heart J. 2001; 142(4):571-6.

Mohanty SS, Kay PR. Infection in total joint replacements. Why we screen MRSA when MRSE is the problem? J Bone Joint Surg Br. 2004; 86(2):266-8.

Moise-Broder PA, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Schentag JJ, Forrest A, Moellering RC Jr. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. Clin Infect Dis. 2004; 38(12):1700-5.

Monzón M, Oteiza C, Leiva J, Lamata M, Amorena B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 44(4):319-24.

Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32(4):518-23.

Ninin E, Caroff N, Espaze E, Marailac J, Lepelletier D, Milpied N, Richet H. Assessment of ica operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(5):446-52.

Nunes AP, Teixeira LM, Iorio NL, Bastos CC, de Sousa Fonseca L, Souto-Padrón T, dos Santos KR. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 27(4):307-15.

O'Connell B, Browne PV, Cafferkey MT, McCann SR. Coagulase-negative staphylococcal bacteraemia treated with teicoplanin. *J Antimicrob Chemother.* 1993; 31(3):438-9.

Peetermans WE, Hoogeterp JJ, Hazekamp-van Dokkum AM, van den Broek P, Mattie H. Antistaphylococcal activities of teicoplanin and vancomycin in vitro and in an experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34(10):1869-74.

Perry JD, Jones AL, Gould FK. Glycopeptide tolerance in bacteria causing endocarditis. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 44(1):121-4.

Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, Zander AR, Mack D. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(12):5614-9.

Rotbart HA, Johnson ZT, Reller LB. Analysis of enteric coagulase-negative staphylococci from neonates with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 1989; 8(3):140-2.

Rupp ME, Fey PD, Heilmann C, Götz F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis.* 2001; 183(7):1038-42.

Safdar A, Rolston KV. Vancomycin tolerance, a potential mechanism for refractory gram-positive bacteremia observational study in patients with cancer. *Cancer.* 2006; 106(8):1815-20.

Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, Gold HS. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5):1492-502.

Scheifele DW, Bjornson GL, Dyer RA, Dimmick JE. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect Immun.* 1987; 55(9):2268-73.

Schlegel L, Saliba F, Mangeney N, Mathieu D. Pulsed field gel electrophoresis typing of coagulase-negative staphylococci with decreased susceptibility to teicoplanin isolated from an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2001; 49(1):62-8.

Schwank S, Rajacic Z, Zimmerli W, Blaser J. Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(4):895-8.

Sénéchal M, LePrince P, Tezenas du Montcel S, Bonnet N, Dubois M, El-Serafi M, Ghossoub JJ, Pavie A, Gandjbakhch I, Dorent R. Bacterial mediastinitis after heart transplantation: clinical presentation, risk factors and treatment. *J Heart Lung Transplant.* 2004; 23(2):165-70.

Shlaes DM, Shlaes JH, Vincent S, Etter L, Fey PD, Goering RV. Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin-binding protein 2 complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(11):2432-7.

Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(1):100-7.

Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med.* 1999; 340: 517-23.

Sloos JH, van de Klundert JA, Dijkshoorn L, van Boven CP. Changing susceptibilities of coagulase-negative staphylococci to teicoplanin in a teaching hospital. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(6):787-91.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001; 358(9276):135-8.

Thiolet JM, Lacavé L, Jarno P, Metzger MH, Tronel H, Gautier C, L'Hériveau, Coignard B. Prévalence des infections nosocomiales, France, 2006. *Bull Epidemiol Hebd.* 2007 ; 51 :429-32.

Tomasz A, Westphal M. Abnormal autolytic enzyme in a *Pneumococcus* with altered teichoic acid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971; 68(11):2627-30.

Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penades JR. Bap-dependant biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* 2005; 151: 2465-2475.

Trueba F, Garrabe E, Hadeif R, Fabre R, Cavallo JD, Tsvetkova K, Chesneau O. High prevalence of teicoplanin resistance among *Staphylococcus epidermidis* strains in a 5-year retrospective study. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(5):1922-3.

Venkatesh MP, Placencia F, Weisman LE. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006; 17(3):120-7.

Verdier I, Reverdy ME, Etienne J, Lina G, Bes M, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides belong to accessory gene regulator group I or II. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3):1024-7.

Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 2002; 4(4):481-9.

Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 2003; 188(5):706-18.

Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA, MacGowan AP, Diekema D. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(7):2439-44.

Wootton M, Bennett PM, MacGowan AP, Walsh TR. Reduced expression of the *atl* autolysin gene and susceptibility to autolysis in clinical heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (hGISA) and GISA strains. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(5):944-7.

Xiong YQ, Yeaman MR, Bayer AS In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(5):1111-7.

Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, Otto M, Gao Q. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 2006; 74(1):488-96.

Yang XM, Li N, Chen JM, Ou YZ, Jin H, Lu HJ, Zhu YL, Qin ZQ, Qu D, Yang PY. Comparative proteomic analysis between the invasive and commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 261(1):32-40.

Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis.* 2005; 191(2):289-98.

Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lössner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element *IS* 256. *Mol Microbiol* 1999; 32: 345-356.

Adresse Internet

Recommandations du CASFM: <http://www.sfm.asso.fr>

NOM : **BARRE-AMIRAUT**

PRENOM : **ELODIE**

ETUDE DES FACTEURS PREDICTIFS DE L'ACTIVITE IN VIVO DE LA TEICOPLANINE VIS A VIS DES SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Résumé

Les glycopeptides sont actuellement le traitement antibiotique de choix dans les infections à staphylocoques résistants à la méticilline. On assiste à une augmentation de la CMI de la teicoplanine parmi les souches de *Staphylococcus epidermidis* qui sont les staphylocoques à coagulase négative les plus couramment isolés en milieu hospitalier. Le but de notre étude était de déterminer quel était l'impact in vivo de la diminution de la sensibilité de souches cliniques dans un modèle de sepsis sur péritonite de souris. Devant l'absence de corrélation entre CMI et efficacité in vivo de la teicoplanine dans notre modèle, nous avons cherché à définir des facteurs qui, chez *Staphylococcus epidermidis*, étaient susceptibles de modifier l'activité de la teicoplanine in vivo (population hétérogène, tolérance, autolyse, formation de biofilm). Notre étude nous a permis de mettre en évidence un lien entre une forte activité autolytique des souches in vitro et une diminution de leur sensibilité à la teicoplanine in vivo.

Mots clés

Staphylococcus epidermidis, teicoplanine, sepsis/péritonite de souris, facteurs de virulence, autolyse