

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2005

N°119

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Qualification en biologie médicale

par

Stéphanie MENDES

née le 24 octobre 1973 à Mont Saint Aignan

---

présentée et soutenue publiquement le 16 septembre 2005

---

**ETUDE DES VARIANTS METABOLIQUES DANS LE GENRE**

**STAPHYLOCOCCUS**

**CARACTERISATION IN VITRO ET ETUDE PROSPECTIVE IN VIVO**

---

Président : Monsieur le Professeur Henri DRUGEON

Directeur de thèse : Docteur Pascale BEMER

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	p 11
<b>RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE</b>	p 13
I- Genre <i>Staphylococcus</i>	p 13
I.1- Groupe génomique dans le genre <i>Staphylococcus</i>	p 13
I.2- Habitat	p 14
I.3- Facteurs de virulence	p 14
I.3.1- Colonisation	p 15
I.3.1.1- Protéines de surface	p 15
I.3.1.2- Capsule	p 16
I.3.1.3- Constitution du biofilm	p 16
I.3.2- Invasion- Diffusion	p 17
I.3.2.1- Sidérophores	p 17
I.3.2.2- Enzymes	p 18
I.3.2.2- Toxines	p 18
I.3.2.4- Production de L-antibiotiques	p 19
I.3.3- Régulation des facteurs de virulence	p 20
I.4- Pouvoir pathogène	p 20
II- Diagnostic bactériologique	p 22
II.1- Identification de genre <i>staphylococcus</i>	p 22
II.1.1- Examen direct	p 22
II.1.2- Caractères cultureux	p 23
II.1.3- Caractère hémolytique	p 23
II.1.4- Diagnostic de genre	p 24
II.1.4.1- La catalase	p 24
II.1.4.2- L'oxydase	p 24
II.1.4.3- Fermentation du glucose- acidification du glycérol	p 24

II.1.4.4- Résistance à la lysostaphine et au lysozyme	p 25
II.1.4.5- Résistance aux nitrofuranes	p 25
II.1.4.6- Résistance au composé vibriostatique O/129	p 25
II.2- Identification d'espèce	p 26
II.2.1- Méthodes phénotypiques	p 26
II.2.1.1- La coagulase	p 28
II.2.1.2- La protéine A	p 28
II.2.1.3- Résistance à la novobiocine	p 29
II.2.1.4- Galeries d'identification	p 29
II.2.1.5- Milieux spécifiques	p 30
II.2.2- Identification moléculaire	p 31
II.2.2.1- Techniques sans amplification	p 31
II.2.2.2- Techniques avec amplification	p 31
III- Mécanismes de résistance aux antibiotiques	p 32
III.1- Résistance aux bêta- lactamines	p 32
III.1.1- Résistance à la pénicilline	p 32
III.1.2- Résistance à la méticilline	p 32
III.2- Résistance aux aminosides	p 33
III.3- Résistance aux macrolides, lincosamides, synergistines	p 33
III.3.1- Modification de cible	p 33
III.3.2- Inactivation enzymatique	p 34
III.3.3- Mécanismes d'efflux	p 34

III.4- Résistance à la rifampicine	p 34
III.6- Résistance aux tétracyclines	p 34
III.7- Résistance aux fluoroquinolones	p 35
III.8- Résistance aux glycopeptides	p 36
IV- Caractéristiques des variants colonies naines dans le genre staphylococcus	p 37
IV.1- Introduction	p 37
IV.2- Pathogénie	p 38
IV.3- Virulence	p 42
IV.3.1- Modèles expérimentaux sur l'animal	p 42
IV.3.2- Modèles sur culture cellulaire	p 44
IV.3.3- Autres facteurs de virulence	p 46
IV.3.3.1- Les adhésines	p 46
IV.3.3.2- Toxines et enzymes	p 47
IV.3.3.3- Protection contre les défenses immunitaires	p 48
IV.4- Métabolisme	p 49
IV.4.1- Facteurs de sélection et de reversion	p 49
IV.4.2- Bases biochimiques	p 50
IV.5- Diagnostic bactériologique	p 53
IV.5.1- Examen direct	p 53
IV.5.2- Cultures	p 55
IV.5.3- Identification	p 56
IV.5.4- Tests d'auxotrophisme	p 57
IV.5.5- Antibiogramme	p 57
IV.6- Mécanismes de résistance	p 58
IV.6.1- Résistance aux aminosides	p 58
IV.6.2- Résistance au triméthoprime- sulfaméthoxazole	p 59
IV.6.3- Résistance aux fluoroquinolones	p 60

IV.7- Approche thérapeutique des variants colonies naines	p62
<b>ETUDE EXPERIMENTALE</b>	p 63
I- Etude in vitro	p63
I.1- Matériel et méthodes	p 63
I.1.1- Choix des souches de <i>S.aureus</i>	p 63
I.1.2- Sélection in vitro	p 66
I.1.3- Caractères cultureux	p 66
I.1.4- méthodes d'identification	p 67
I.1.5- Tests d'auxotrophisme	p 67
I.1.6- Sensibilité aux antibiotiques	p 68
I.1.7- Etude de la clonalité	p 68
I.2- Résultats	p 70
I.2.1- Obtention de variants colonies naines	p 70
I.2.2- Caractères cultureux	p 71
I.2.3- Identification	p 72
I.2.4- Tests d'auxotrophisme	p 73
I.2.5- Sensibilité aux antibiotiques	p 74
I.2.6- Etude de la clonalité	p 81
II- Etude in vivo	p 82
II.1- Matériel et méthodes	p 82
II.1.1- Recueil des prélèvements	p 82
II.1.2- Ensemencements des prélèvements	p 82
II.1.3- Caractérisation des VCN	p 83
II.1.4- Données cliniques des patients sélectionnés pour l'étude in vivo.	P 83

II.1.5- Résultats	p 93
II.1.5.1- Prélèvements	p 93
II.1.5.2- Caractéristiques des variants in vivo	p 97
II.1.5.3- Caractères culturels	p 97
II.1.5.4- Identification	p 101
II.1.5.5- Tests d'auxotrophisme	p 101
II.1.5.6- sensibilité aux antibiotiques	p 101
II.1.5.7- Etude de la clonalité	p 106
<b>DISCUSSION</b>	p108
<b>CONCLUSION</b>	p112

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Groupes génomiques et espèces dans le genre *Staphylococcus*
- Tableau 2 : Principaux tests de différenciation des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus*
- Tableau 3 : Caractères différentiels des principales espèces de staphylocoques isolées chez l'homme
- Tableau 4: Principales galeries commerciales utilisées pour le diagnostic d'espèce
- Tableau 5 : Facteurs de sélection de VCN in vitro
- Tableau 6: Antibiogramme de la souche P1
- Tableau 7 : Antibiogramme de la souche P2
- Tableau 8 : Conditions d'observations des caractères cultureux des VCN
- Tableau 9 : Composés utilisés pour les tests d'auxotrophisme
- Tableau 10 : Antibiotiques testés par la méthode en dilution sur milieu solide
- Tableau 11: Aspect des variants colonies naines sélectionnés in vitro et de la souche témoin
- Tableau 12: Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques : Souche témoin
- Tableau 13 : Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V1
- Tableau 14: Comparaison des CMI par la méthode en dilution sur milieu solide des souches P1 et du variant V1 sélectionné sous gentamicine
- Tableau 15: Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V2
- Tableau 16 : Comparaison des CMI par la méthode en dilution sur milieu solide des souches P2 et du variant V2 sélectionné sous ofloxacine
- Tableau 17 : Indications chirurgicales concernant les 19 patients
- Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires.
- Tableau 19 : Prélèvements recueillis
- Tableau 20 : Résultat des examens directs
- Tableau 21 : Résultats des cultures
- Tableau 22 : Aspect des variants colonies naines isolées de prélèvements cliniques

Tableau 23: Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V4.

Tableau 24 : Comparaison des CMI par la méthode en dilution sur milieu solide des souches P4 et du variant V4

Tableau 25 : Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V19

Tableau 26 : Comparaison des CMI avec la méthode par dilution sur milieu solide des souches P19 et du variant V19

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure et facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*

Figure 2 : Coupes ultrafines en microscopie électronique de kératinocytes HaCaT infectés par une souche clinique de *S.aureus* VCN et de sa souche isogénique

Figure 3 : Adhésion sur des particules recouvertes de fibrinogène et de fibronectine d'un mutant *hemB*, supplémenté ou non en hémine, d'un mutant pCE12 et de la souche parentale

Figure 4 : Voies métaboliques de la synthèse de la ménadione et de l'hémin impliquées dans la production d'ATP

Figure 5 : Voie de la glycolyse chez un mutant *hemB* en aérobiose

Figure 6 : Aspect morphologiques de variants thymidine dépendant et d'une souche de *S. aureus* normale en coloration de Gram et microscopie électronique

Figure 7 : Souche témoin sur gélose TS sang (A), sur gélose Schaedler (B).

Figure 8: Souche témoin supplémentée avec un disque de thymidine à 2 mg/ml

Figure 9 : Profils électrophorétiques des VCN sélectionnées in vitro

Figure 10: Souche V4 sur gélose TS sang en aérobiose

Figure 11: Souche V4 sur gélose Schaedler en anaérobiose

Figure 12: Souche V19 sur gélose TS sang en aérobiose

Figure 13: Souche V19 sur gélose Schaedler en anaérobiose

Figure 14 : Profils électrophorétiques des VCN isolés in vivo et de leurs souches parentales

## INTRODUCTION

Le genre *Staphylococcus* regroupe une quarantaine d'espèces et sous-espèces, dont les plus fréquentes, en pratique médicale courante sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*

L'implication de *Staphylococcus aureus* comme bactérie pyogène a été décrite depuis 1882 par Ogston (Ogston, 1882) et reste le principal agent d'infections communautaires et nosocomiales chez l'homme. *Staphylococcus aureus* provoque deux types de syndromes : les toxémies staphylococciques et les infections suppuratives. Une dizaine d'espèces de staphylocoques coagulase négative, qui font partie de la flore commensale sont également potentiellement pathogènes pour l'homme (Freney, 2000). La principale difficulté diagnostique consiste à distinguer les souches contaminantes des souches à caractère pathogène.

Les infections osseuses sur prothèse articulaire ou sur matériel d'ostéosynthèse, bien que rares, restent redoutées du clinicien. Elles engendrent souvent des difficultés diagnostiques, une importante morbidité et un coût médical élevé. Le pronostic est incertain et la prise en charge thérapeutique souvent lourde et complexe (Bernard, 2003).

Parmi les microorganismes impliqués dans la survenue de ces infections, *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative sont au premier plan et de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de leur pathogénie. Outre l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques, l'existence d'une sous-population particulière de staphylocoques contribue à la persistance et à la chronicité de ces infections.

En effet, certaines souches de *Staphylococcus aureus* mais également de staphylocoques coagulase négative, communément appelées « small variant colony » (variant colonie naine) sont capables de modifier leur métabolisme (Proctor and Peters, 1998 ; Proctor et al, 1994). Ces modifications ont été rapportées à une altération du système de transport d'électrons. Il en résulte une croissance bactérienne plus lente, une absence de pigmentation et d'hémolyse pouvant égarer le diagnostic bactériologique. De plus, ces souches sont caractérisées par une plus grande résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones notamment (Proctor, 1995 ; Pan et al, 2002). Cette résistance est majorée au contact de matériel inerte et ces variants ont un potentiel de survie accrue au sein des cellules hôtes, dans lesquelles elles se nichent sans provoquer de lyse cellulaire. Ainsi se pérennise un foyer latent de bactéries, inaccessible aux défenses immunitaires naturelles, peu sensible aux antibiotiques, responsable de rechutes et d'échecs thérapeutiques.

Leur potentiel de virulence a été démontré in vitro par des modèles expérimentaux, mais également in vivo au cours d'infections diverses, y compris osseuse (Bates et al, 2003). Ces colonies naines représentent donc une alternative de survie pour les staphylocoques et constitue un nouveau modèle de résistance atypique, biochimique et phénotypique.

Les objectifs à partir de ce travail sont de caractériser les variants à colonies naines à partir de modèles sélectionnés in vitro : détection, identification, sensibilité aux antibiotiques.

En deuxième partie, nous proposons d'évaluer la fréquence de ces variants par une étude prospective réalisée sur des prélèvements ostéo-articulaires, provenant de patients porteurs d'un sepsis osseux documenté à *Staphylococcus aureus* ou à staphylocoques coagulase négative

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

### I- Genre *Staphylococcus*

#### I.1- Groupe génomique dans le genre *Staphylococcus*

Les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* apparaissent dans la littérature à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle (Ogston, 1882). Les deux genres sont différenciés par la composition en bases de l'ADN, exprimée par le contenu en guanine et cytosine (GC%). Les staphylocoques ont un GC% de 30% à 39% et les microcoques, un GC% de 68% à 74%. Le genre *Staphylococcus* regroupe 44 espèces et sous-espèces. Les études d'hybridation ADN-ADN et d'analyse des séquences nucléotidiques des gènes d'ARN 16S ont permis de définir différents groupes (Schleifer and Kroppenstedt, 1990).

**Tableau 1 : Groupes génomiques et espèces dans le genre *Staphylococcus***

<b>GROUPE</b>	<b>ESPECES CORRESPONDANTES</b>
<b>Groupe <i>S. epidermidis</i></b>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. saccharolyticus</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. pasteurii</i>
<b>Groupe <i>S. saprophyticus</i></b>	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. kloosii</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. arlettae</i>
<b>Groupe <i>S. simulans</i></b>	<i>S. simulans</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. felis</i> , <i>S. piscifermentans</i>
<b>Groupe <i>S. sciuri</i></b>	<i>S. sciuri</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. vitulinus</i>
<b>Groupe <i>S. hyicus</i></b>	<i>S. hyicus</i> , <i>S. chromogenes</i>
<b>Groupe <i>S. intermedius</i></b>	<i>S. intermedius</i> , <i>S. delphini</i> , <i>S. schleiferi</i>
<b>Espèces non classées</b>	<i>S. aureus</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. lugdunensis</i>
<b>Nouvelles espèces</b>	<i>S. muscae</i> , <i>S. lutrae</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. condimentii</i> , <i>S. fleurettii</i>

## I.2- Habitat

L'habitat préférentiel de *S.aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale, où il est présent chez 10% à 40% des individus en dehors de tout contact hospitalier. Il s'agit d'un portage naturel dont la densité est évaluée de  $10^3$  à  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> (Heczko at al, 1981). On retrouve à la fois des *S. aureus* sensibles et résistants à la méticilline chez les sujets colonisés de façon chronique (Lowy, 1998). Les staphylocoques à coagulase négative sont également des commensaux de la peau et des muqueuses et sont différemment représentés selon le site anatomique. Certains individus hébergent 10 à 24 souches différentes de *S. epidermidis*. Les aisselles, les plis inguinaux et le périnée sont des régions où les staphylocoques atteignent des densités élevées de l'ordre de  $10^4$  à  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>.

## I.3- Facteurs de virulence

*Staphylococcus aureus* présente un arsenal important de facteurs impliqués dans l'adhérence, l'invasion, la prolifération *in situ* et la cytotoxicité.

Les souches de staphylocoques à coagulase négative semblent exprimer moins de facteurs de virulence. La présence d'un corps étranger (cathéter, chambre implantable, prothèse, pace-maker) constitue un élément favorisant le développement d'infections. Certaines espèces de staphylocoques coagulase négative, telles que *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* et *S. lugdunensis* possèdent des facteurs de virulence à la fois similaires à ceux rencontrés chez *S.aureus* mais aussi propres à l'espèce (von Eiff et al, 2002).

### I.3.1- Colonisation

#### I.3.1.1- Protéines de surface

*S. aureus* se fixe aux cellules par l'intermédiaire de protéines de surface, ancrées dans le peptidoglycane et qui appartiennent à la famille des MSCRAMM (« Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules ») (Lowy, 1998 ; Freney, 2000).

-La protéine A (Spa) se lie au facteur Fc des immunoglobulines et inhibe la phagocytose. Elle joue un rôle d'adhésine en permettant l'attachement de *S.aureus* au facteur de von Willebrand.

-La protéine de liaison au collagène (Cna) constitue un facteur important de virulence dans les infections ostéo-articulaires à *S.aureus*. Elle est exprimée chez 38% à 56% des souches de *S.aureus*.

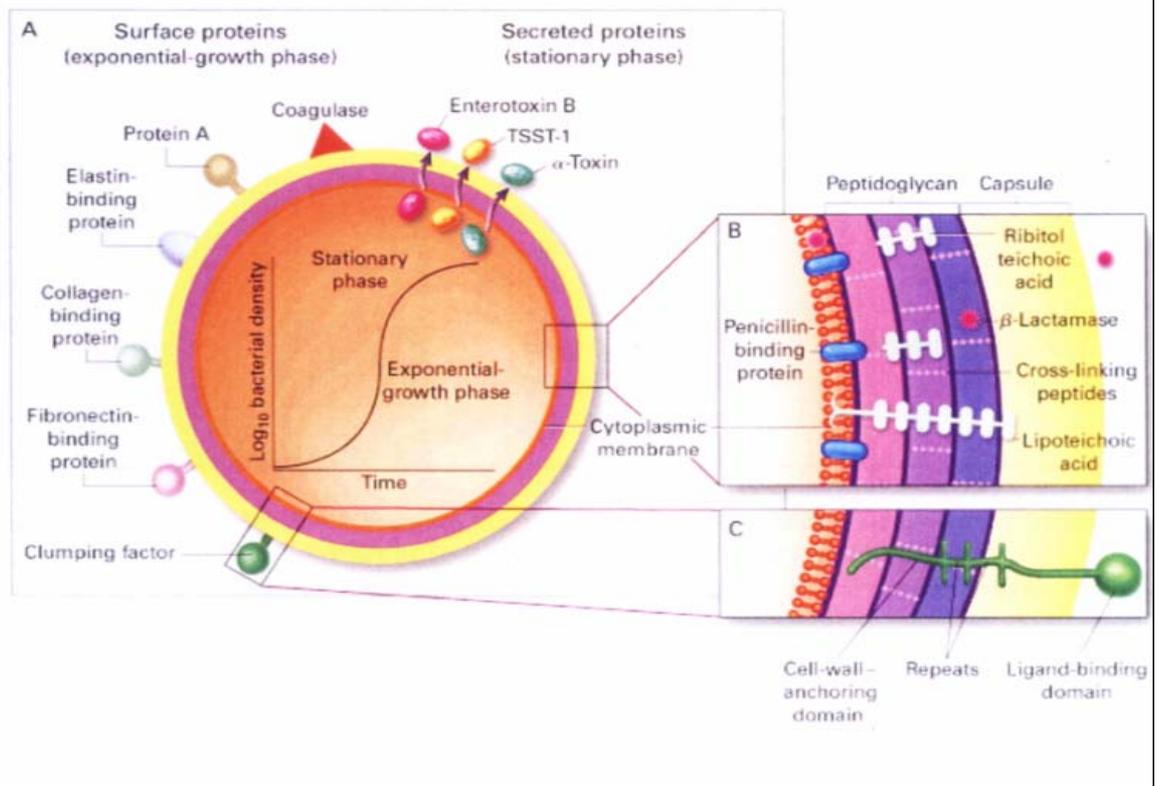
-La protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) joue un rôle dans la pathogénie des infections sur corps étrangers et permet l'adhérence de *S.aureus* aux caillots plasmatiques.

-La protéine de liaison au fibrinogène (Clumping Factor, Clfa)

Ce récepteur pour le fibrinogène provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Cette interaction est favorisée au niveau du thrombus plaquettaire par de faible concentration de calcium. *S. epidermidis* exprime le récepteur Fbe appartenant à la même famille.

D'autres récepteurs ont été décrits comme le récepteur pour la laminine, le plasminogène, la vitronectine, la thromboplastine, les sialoprotéines de l'os. (Vaudaux et al, 2002)

Figure 1 : Structure et facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Lowy, 1998)



### I.3.1.2- Capsule

Des polysaccharides capsulaires sont présents chez 90% des souches cliniques de *S. aureus*. Ils sont classés en 11 sérotypes, les types 5 et 8 représentant près de 75 % des infections survenant chez l'homme (Lowy, 1998). Pour *S. epidermidis*, un polysaccharide capsulaire PS/A (Polysaccharide/ Adhésine) et le PIA (Polysaccharide intercellular adhesin) sont associés à la production de biofilm sur matériel étranger (von Eiff et al, 2002).

### I.3.1.3- Constitution du biofilm

La colonisation de surfaces polymères aboutit à la formation d'un biofilm. Le processus de formation du biofilm relève de deux étapes. Dans un premier temps, la bactérie adhère rapidement sur la surface du polymère non modifié, puis le biomatériau se recouvre de différentes protéines plasmatiques et de la

matrice extra-cellulaire favorisant la fixation et la colonisation de bactérie pathogènes. Enfin, pendant la phase d'accumulation, celles-ci prolifèrent pour former plusieurs agglomérats cellulaires imbriqués dans la matrice extra-cellulaire (von Eiff et al, 2002).

Les interactions initiales mettent en jeu des mécanismes physico-chimiques non spécifiques, tels que des liaisons de von der Waal's, des liaisons hydrophobes et polaires. Dans un second temps, des protéines staphylococciques de surface interviennent dans l'adhérence : deux protéines apparentées SSP1 et SSP2, l'autolysine AltE, la protéine Bhp sont impliquées dans les phénomènes d'attachement sur polystyrène chez *S. epidermidis*. La protéine Bap, chez *S. aureus* contribue également à la formation du biofilm (von Eiff et al, 2002).

L'adhérence aux protéines de la matrice extra-cellulaire, principalement, la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et le facteur de von Willebrand se fait grâce à de des récepteurs spécifiques présents chez *S. aureus* et certains staphylocoques coagulase négative (protéines FnBP, Fbe, ClfA, ClfB, adhésines).

Les acides teïchoïques membranaires de *S. epidermidis* agissent comme un pont avec la fibronectine et accroissent de manière dose-dépendante l'adhérence à cette protéine.

La phase d'accumulation aboutit à la structure terminale du biofilm sous forme d'amas de bactéries agrégées entre elles. Cette étape est régit entre autres, par le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) codé par l'opéron *icaADCB*. L'hémagglutination et la production de PS/A sont médiés par ce cluster de gènes. La protéine extra-cellulaire AAP (accumulation associated protein) semble essentielle à la croissance de certaines souches de *S. epidermidis* sur des surfaces polymérisées.

### I.3.2- Invasion- Diffusion

#### I.3.2.1- Sidérophores

Ces composés de faible masse moléculaire sont capables de capter et de transporter le fer dans la bactérie. Leur sécrétion se rencontre chez *S. aureus* mais aussi chez les staphylocoques à coagulase négative. Des récepteurs pour la transferrine ont été identifiés chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*.

Cette expression serait constitutive chez *S. aureus* et régulée par la concentration en fer pour les staphylocoques à coagulase négative.

#### I.3.2.2- Enzymes

La coagulase est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine et convertit le fibrinogène en fibrine. Il s'agit d'un marqueur classique d'identification de *S. aureus* mais son rôle dans la virulence reste incertain (Lowy, 1998 ; Freney et al, 2000).

La staphylokinase, fibrinolytique, favorise la dissémination hématogène de *S. aureus* à partir de thrombophlébites locales.

FAME (Fatty Acid Modifying Enzyme) est exprimée par 80% des *S. aureus* et modifie les acides gras des lipides antibactériens. Elle est impliquée chez *S. epidermidis* dans les lésions d'abcès.

Des estérases et des lipases sont retrouvées chez *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*.

#### I.3.2.2- Toxines

##### ● Les toxines à activité membranaire

L' $\alpha$ - toxine est un facteur majeur de virulence. Elle se lie à un récepteur membranaire et forme un pore à la surface de la cellule cible. Les plaquettes et les monocytes y sont sensibles et libèrent des cytokines pro-inflammatoires à l'origine de choc septique lors d'infections sévères à *S. aureus*.

La leucocidine de Panton-Valentine est constituée de deux composants synergiques, ayant une action leucotoxique et dermonécrotique. Une faible proportion de *S. aureus* expriment la leucocidine et sont principalement isolées d'infections cutanées nécrosantes sévères ou de foyers secondaires. Les souches de staphylocoques non *aureus* sont non ou faiblement productrices, expliquant leur moindre toxicité.

La  $\gamma$ -toxine est une hémolysine dont la structure moléculaire est identique à la leucocidine de Panton-Valentine ; elle est fortement exprimée chez *S. aureus* et possède une fonction anti-phagocytaire favorisant l'extension des lésions.

#### ● **Entérotoxines, TSST1, exfoliatines**

Présentes essentiellement chez *S. aureus*, ces toxines se comportent comme des super-antigènes et induisent une prolifération polyclonale de lymphocytes T associé à un relargage important de cytokines, en se liant à l'antigène de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Différents sérotypes ont été décrits (A, B, C, D, E, G, G, H, I) et des domaines particuliers sont responsables de toxi-infections alimentaires.

La TSST1, apparentée aux entérotoxines, est impliquée dans le choc toxique staphylococcique. Son gène serait retrouvé dans 20% des souches de *S. aureus* (Marrack P and Kappler J, 1990).

Deux types de toxines épidermolytiques sont décrites : l'exfoliatine A et B. Leur mode d'action reste mal élucidé.

#### I.3.2.4- Production de L-antibiotiques

Ces peptides (épidermine, Pep5, épilancine K7, épicide 280), produits par *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* mais pas par *S. aureus*, ont une activité antibiotique dirigée contre certaines bactéries Gram positives et jouent un rôle substantiel dans la colonisation de la peau.

### I.3.3- Régulation des facteurs de virulence

L'expression coordonnée des exoprotéines appartenant à la famille MSCRAMM et des toxines chez *S. aureus* est régulée génétiquement par le système *agr* (*accessory gene regulator*) qui agit en fonction de la densité bactérienne. En phase précoce de croissance, le système *agr* n'est pas activé, permettant l'expression de facteurs impliqués dans l'adhérence comme la protéine A et la coagulase. L'expression des hémolysines, entérotoxines, leucocidines, exfoliatines est secondairement stimulée en phase post exponentielle afin de favoriser la dissémination de l'infection. Cette phase correspond à l'apparition d'un transcrite sur le système *agr* : RNAIII, qui est corrélé à la répression de *fnb* et de *spa* codant respectivement pour la protéine de liaison à la fibronectine et pour la protéine A.

D'autres systèmes de régulation comme le locus *sar* (*staphylococcal accessory regulator*) active les gènes *fnb* et *clfA* (codant pour la protéine de liaison au fibrinogène) et réprime la transcription de *spa*. Un système *agr*- like et un homologue de *sar* ont été clonés chez *S. epidermidis* (Freney et al, 2000 ; Vaudaux et al, 2002).

### I.4- Pouvoir pathogène

*S. aureus* est un pathogène majeur d'infections suppuratives cutanées, respiratoires, endovasculaires, osseuses. Les maladies associées à la production de toxines sont le syndrome du choc toxique, due à la diffusion de TSST1 et/ ou d'entérotoxines. Le syndrome d'exfoliation généralisée et sa forme mineure, l'impétigo bulleux sont liés à la diffusion d'exfoliatines. Les toxi- infections alimentaires sont secondaires à l'ingestion d'entérotoxines. Ces syndromes sont liés à la diffusion de toxines à partir d'un site de colonisation et/ou d'infection.

Parmi les bactéries responsables d'infections ostéo-articulaires, les staphylocoques occupent la première place. *S. aureus* et certaines espèces de staphylocoques à coagulase négative, tels que *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* (Murdoch et al, 1996; Freney et al, 2000) sont responsables d'infections sur prothèse de hanche et d'ostéomyélites. De même, *S. caprae*, d'abord considéré chez l'homme comme simple contaminant, est désormais incriminé (Blanc et al, 1999).

En France, environ 100 000 prothèses de hanche et 50 000 prothèses de genou sont implantées chaque année. L'incidence des prothèses de hanches infectées est d'environ 1,5%. L'infection est la deuxième cause d'échec d'arthroplastie, après le descellement aseptique, et on estime que 10% des patients porteurs d'une prothèse articulaire devront subir une révision chirurgicale au cours de leur vie (Desplaces N, 2003). L'incidence des infections après pose de matériel d'ostéosynthèse non prothétique est d'environ 1,30% (Cremieux and Saeh-Mghi, 2003). Elles représentent la première cause de non consolidation des fractures ouvertes ; le risque étant proportionnel aux délabrements tissulaires associés à la fracture (Carsenti- Etesse et al, 1999). Pour les fractures ouvertes de grade I, le taux d'infection est inférieur à 10%, il s'élève entre 1% et 12% pour les grades II et peut atteindre 55% dans les grades III. Les infections sur matériel orthopédique constituent un problème émergent de santé publique. Aux Etats- unis en 1990, le coût d'un épisode infectieux était estimé à 3 ou 4 fois le prix d'une prothèse non compliquée (Sculco, 1992).

Les études de O'Donoghue et Coello réalisées en service d'Orthopédie convergeaient et annonçaient respectivement un coût moyen attribuables aux infections, de 2220 £ et 2646 £ (O' Donoghue and Allen, 1992 ; Coello et al, 1993). La latence parfois prolongée entre la contamination, le début de l'infection et le diagnostic rend beaucoup d'infections difficiles à classer. Le délai entre la pose du matériel et de diagnostic de l'infection ne permet pas de déterminer le mécanisme de l'infection. Une infection sur prothèse, comme une

ostéomyélite peut rester longtemps asymptomatique et, à l'inverse une infection secondaire, hémotogène peut survenir en post- opératoire immédiat.

Les staphylocoques sont fréquemment impliqués dans les infections nosocomiales ; les plus fréquentes étant les infections de plaies chirurgicales, les pneumopathies sous ventilation assistée, les septicémies sur cathéter, les infections péritonéales sur dialyse, les infections sur prothèse ou corps étranger et tous types d'infections chez l'immunodéprimé. Au cours de l'enquête de prévalence réalisée en juin 2001, (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales, 2001), les staphylocoques représentaient 24,4% des bactéries isolées d'infections nosocomiales. *S. aureus* représentait 36,2% des microorganismes isolés d'infections du site opératoire les staphylocoques coagulase négative, 9,4%.

Les données américaines issus du National Nosocomial Infections Surveillance System, collectées de janvier 1990 à novembre 1999, révèlent que les staphylocoques à coagulase négative sont les plus communément rapportés (37,3% contre 12,6% de *S. aureus*) (NNIS, 1999)

## II- Diagnostic bactériologique

### II.1- Identification de genre *staphylococcus*

#### II.1.1- Examen direct

Les staphylocoques sont des cocci Gram positif, non mobiles, asporulés.

Ils apparaissent isolés, en diplocoques ou en amas.

### II.1.2- Caractères culturaux

Sur milieu gélosé non sélectif enrichi en sang, sur gélose trypticase- soja, les colonies ont un diamètre de 1 à 3 mm après 24 heures et de 3 à 8 mm après 3 jours d'incubation à 35°C en aérobiose. Quelques espèces peuvent donner des colonies de taille inférieure (*S. auricularis*, *S. capitis subsp. capitis*). Concernant les espèces autres qu'*aureus*, il est recommandé de poursuivre l'incubation au-delà de 24 heures, afin de pouvoir déterminer l'organisme prédominant dans un prélèvement ou d'obtenir une culture pure.

Ces souches de staphylocoques coagulase négative peuvent montrer d'importantes variations de taille ou d'aspect des colonies en culture.

Les variants auxotrophes ont une croissance lente et une morphologie atypique pouvant également conduire à une identification erronée ou absente.

La pigmentation des colonies de staphylocoques s'intensifie après une incubation prolongée à température ambiante. Elle est favorisée par des milieux contenant des acides gras et du lait (Freney et al, 2000). Les souches d'origine animale sont habituellement d'emblée plus pigmentées que les souches d'origine humaine.

### II.1.3- Caractère hémolytique

L'activité hémolytique des staphylocoques peut être mise en évidence sur des milieux gélosés contenant des globules rouges humains ou animaux.

Chez *S. aureus*, l'hémolysine  $\alpha$  est produite par 95% des souches et produit une large zone d'hémolyse complète sur gélose contenant 5% de sang de mouton, de lapin ou de bœuf. Une hémolyse totale mais plus faible apparaît pour l'hémolysine  $\delta$  sur gélose au sang humain, de mouton et de bœuf. L'hémolysine  $\beta$  produit quant à elle une faible zone d'hémolyse incomplète. Ces deux dernières hémolysines ont une activité synergique.

D'autres espèces de staphylocoques à coagulase négative ont une activité hémolytique sur sang humain ou animal. Il s'agit de *S. haemolyticus* (100% de

réactions faibles à modérées surtout sur sang de bovin), *S. epidermidis* et *cohnii* (30% de réactions faibles), *S. capitis* et *S. simulans* (100% de réactions modérées sur sang humain et négatives ou faibles sur sang de bovin ou de mouton). *S. caprae* produit une hémolyse faible sur sang de mouton, alors que celle-ci est totale pour *S. schleiferi*.

#### II.1.4- Diagnostic de genre

La plupart des espèces de staphylocoques sont aéro-anaérobies facultatives et à catalase positive à l'exception de *Staphylococcus saccharolyticus* et *S. aureus* subsp *anaerobius*.

##### II.1.4.1- La catalase

La catalase est une oxydoréductase qui intervient dans le mécanisme de résistance à la bactéricidie par le peroxyde d'hydrogène. Ce test permet de différencier, les staphylocoques des streptocoques parmi les cocci Gram positif. La catalase est normalement un caractère constant chez les staphylocoques mais cette réaction peut manquer en cas de variants à colonies naines.

##### II.1.4.2- L'oxydase

Les cytochromes sont des protéines intervenant dans les mécanismes d'oxydoréduction. Les cytochromes de type c sont détectés par le test de l'oxydase utilisé en pratique. En diagnostic de genre il différencie des bactéries des genres *Micrococcus spp*, *Kocuria spp*, *Macrococcus* et *Arthrobacter*.

La plupart des espèces de staphylocoques sont oxydase négative à l'exception de *S. scuiri*, *S. lentus*, *S. vitulus*.

##### II.1.4.3- Fermentation du glucose- acidification du glycérol

Le test de fermentation du glucose est utilisé pour différencier les staphylocoques pour lequel il s'avère positif, des microcoques (*Micrococcus*,

*Kocuria*). Certaines espèces sont toutefois peu fermentantes (*S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii*, *S. scuri*, *S. lentus*).

Le milieu gélosé contenant 1% de glycérol permet de distinguer les staphylocoques qui se développent en acidifiant le glycérol des microcoques. De rares souches n'acidifient pas le glycérol (*S. simulans*, *S. piscifermentans*, *S. carnosus*).

#### II.1.4.4- Résistance à la lysostaphine et au lysozyme

La lysostaphine est un mélange de trois enzymes lytiques, dont le composant principal est une endopeptidase capable de cliver les ponts pentaglycines du peptidoglycane. Cette activité rend les bactéries sensibles à la lyse osmotique.

La plupart des staphylocoques sont sensible à la lysostaphine et résistantes à de faible concentration de lysozyme, à l'inverse des microcoques. Des disques chargés à 100 µg de lysostaphine et à 50 µg de lysozyme sont utilisés sur gélose de Mueller- Hinton, incubée 24 heures à 35°C.

#### II.1.4.5- Résistance aux nitrofuranes

Les staphylocoques sont plus sensibles aux nitrofuranes que les microcoques. Sur gélose de Mueller- Hinton, un disque chargé de 300 µg de nitrofurantoïne permet de tester la souche. Un diamètre d'inhibition de 15 mm ou plus est observé pour les staphylocoques.

#### II.1.4.6- Résistance au composé vibriostatique O/129

Ce composé est le 2, 4- diamino- 6, 7- diisopropyloptéridine à la concentration de 0,5 mg par disque. En méthode de diffusion sur gélose de Mueller- Hinton, les staphylocoques apparaissent résistants et ne présentent généralement aucune zone d'inhibition de croissance autour du disque, alors que les microcoques sont sensibles (zones d'inhibition de 20 à 36 mm).

**Tableau 2 : Principaux tests de différenciation des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus***

Test	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>
Fermentation du glucose	+ (-)*	- (+)a
Croissance en anaérobiose (thioglycolate)	+ (-)	- (+)
Acidification du glycérol	+ (-)	- (+)
Lysostaphine (disque 100 µg)	S (R)	R (S)
Lysozyme (disque 50 µg)	R	S
Oxydase (cytochrome C)	- (+)b	+
Nitrofurantoïne (disque 300 µg)	S (>15 mm)	R (≤ 15 mm)
Bacitracine (disque 0,02 UI)	R	S (10-25 mm)
Composé O/129 (disque 0,5 mg)	R (6-10mm)	S (20-36 mm)

\*() souches présentant un caractère différent

a : *M. kristinae*, *M. varians*

b : *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. caseolyticus*

## II.2- Identification d'espèce

### II.2.1- Méthodes phénotypiques

Le tableau 3 présente les principaux caractères discriminants des staphylocoques à coagulase négative sensibles à la novobiocine, isolés en pathologie humaine et des staphylocoques résistants à la novobiocine isolés chez l'homme et l'animal.

**Tableau 3 : Caractères différentiels des principales espèces de staphylocoques isolées chez l'homme : Précis de Bactériologie clinique 2000 p808-9.**

	Ø des colonies > 5 mm (1)	Coagulase libre	FAF (2)	Thermococlease	Production d'acétone (VP)	Nitrate-réductase	Phosphatase alcaline	Omnitine-décarboxylase	Uréase	B-galactosidase	B-glucosidase	Pyruvate-carylamylase	Acidification							
													Mannose	Maltose	Lactose	Trehalose	Mannitol	Saccharose	Turanose	Xylose
<b>Sensibles à la Novoblocine</b>																				
<i>S aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	d	-	
<i>S auricularis</i>	-	-	-	-	d	(d)	-	-	-	(d)	-	d	-	(+)	-	(+)	-	d	(d)	
<i>S capitis subsp capitis</i>	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(+)	(+)	-	
<i>S capitis subsp urealyticus</i>	d	-	-	-	d	+	-	-	+	-	-	(d)	+	+	(d)	-	+	+	-	
<i>S caprae</i> (3)	d	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	d	+	d	+	+	d	-	-	
<i>S epidermidis</i>	-	-	-	-	+	d	d	(-)	+	-	(d)	-	(d)	+	d	-	-	+	d	
<i>S haemolyticus</i>	+	-	-	-	+	d	-	-	-	-	d	+	-	+	d	+	d	+	d	
<i>S hominis</i>	-	-	-	-	d	d	d	-	+	-	-	-	d	+	d	d	-	+	+	
<i>S intermedius</i> (3)	+	+	d	+	-	+	+	-	+	+	d	d	+	I(+)	+	+	(d)	+	d	
<i>S lugdunensis</i>	+	-	+	f+	+	+	-	+	d	-	+	+	+	+	d	+	-	+	-	
<i>S schleiferi subsp coagulans</i> (3)	+	+	-	+	+	+	+	-	+	ND	ND	ND	+	-	d	-	d	d	ND	
<i>S schleiferi subsp schleiferi</i>	-	-	+	+	+	d	+	-	-	(d)	-	d	+	-	d	-	-	-	-	
<i>S simulans</i>	+	-	-	-	d	+	fd	-	+	+	-	+	d	+	fd	+	+	+	-	
<i>S wameri</i>	d	-	-	-	+	d	-	-	+	-	+	-	-	(+)	d	+	d	+	(d)	
<i>S. pasteurii</i>	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	(d)	d	+	d	+	(d)	
<i>S. saccharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	d	ND	ND	ND	ND	ND	(+)	-	-	-	-	-	ND	
<b>Résistantes à la Novoblocine</b>																				
<i>S arlettae</i>	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
<i>S cohnii subsp cohnii</i>	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	(d)	(d)	-	+	d	-	-	
<i>S cohnii subsp urealyticum</i>	+	-	-	-	d	-	(+)	-	+	+	d	d	+	d	d	+	+	-	-	
<i>S. equorum</i>	-	-	-	-	-	+	(+)	-	+	d	-	-	+	d	d	+	+	+	d	
<i>S. gallinarum</i>	-	-	-	-	-	+	(+)	-	+	d	-	-	+	+	d	+	+	+	+	
<i>S. kloosii</i>	-	-	-	-	d	-	d	-	d	d	-	-	d	(d)	+	+	+	+/-	(d)	
<i>S. lentus</i> (oxy+)	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	+	d	d	+	+	+	+/-	
<i>S saprophyticus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	d	d	-	+	d	+	d	+	+	
<i>S. sciuri carnaticus</i> (oxy+)	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-	-	-	d	+	d	+	+	+	ND	
<i>S. sciuri rodentium</i> (oxy+)	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-	-	-	+	+/-	-	+	+	+	ND	
<i>S. sciuri sciuri</i> (oxy+)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	d	(d)	d	+	+	+	d	
<i>S. vitulus</i> (oxy+)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	(d)	+	+	(d)	
<i>S. xylosum</i> (3)	+	-	-	-	d	d	d	-	+	+	+	d	+	+	d	+	+	+	d	

(1) diamètre des colonies en 5 jours ; (2) facteur d'affinité pour le fibrinogène ; (3) *S caprae*, *S intermedius*, *S schleiferi subsp coagulans* et *S xylosum* sont des espèces rarement isolées chez l'homme ; + 90 % ou plus de souches positives ; - 90 % ou plus de souches négatives ; d. 11 à 89 % de souches positives ; +/-90% ou plus de souches faiblement positives ( ) tardivement ; ND non déterminé. Oxy : oxydase.

### II.2.1.1- La coagulase

Les termes de coagulase libre et liée désignent deux entités responsables respectivement de la coagulation et de l'agglutination du plasma.

D'autres facteurs ont été décrits chez *S. aureus*, comme facteurs d'agglutination en présence de plasma. Une fraction de la coagulase est liée à la surface des bactéries et réagit avec la prothrombine. Elle peut se lier au fibrinogène quand elle est extracellulaire. La coagulase et le clumping factor (adhésine réceptrice du fibrinogène) sont deux entités distinctes.

Le test consiste à vérifier l'aptitude des bactéries à coaguler la plasma et identifie principalement *S. aureus*. Plusieurs espèces de staphylocoques non aureus (*S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. intermedius*) produisent également une coagulase libre ou une pseudo-coagulase, mais elles sont rarement isolées chez l'homme. Le recherche de la coagulase en tube utilisant des plasmas de lapin avec ou sans EDTA n'exclut pas totalement des réactions faussement positives, l'EDTA n'éliminant pas à lui seul les pseudocoagulases.

### II.2.1.2- La protéine A

La protéine A de *S. aureus* associée au peptidoglycane, a la propriété de fixer le fragment Fc des immunoglobulines d'homme et de lapin. Cette protéine est détectable chez plus de 90% des souches de *S. aureus*. Sa détection consiste à rechercher l'agglutination sur lame des staphylocoques en présence d'une goutte d'hématies de mouton sensibilisées par du sérum de lapin ou de particules de latex recouvertes d'IgG. Cette propriété est mise à profit dans la fabrication des kits d'identification de *S. aureus* qui s'appuient sur la recherche simultanée de plusieurs constituants (protéine A, facteur de liaison au fibrinogène, antigènes capsulaires de type 5 et 8) [réactif Pastorex ® Staph Plus, (Sanofi Diagnostics Pasteur); réactif Slidex Staph ®- kit, (bioMérieux ); Staphaurex ® Plus, (Murex Diagnostics)]. Des réactions faussement positives sont cependant observées pour

*S.schleiferi* (60% à 79% des souches) *S. lugdunensis* (environ 60% des souches) et *S. intermedius* (Freney et al, 2000).

Il serait par conséquent fortement recommandé, pour identifier *S. aureus* d'utiliser au moins deux tests, la coagulase libre et un test d'agglutination regroupant plusieurs constituants de cette espèce. Toute discordance devant conduire à une caractérisation biochimique et/ou moléculaire.

#### II.2.1.3- Résistance à la novobiocine

Ce test permet d'individualiser 16 espèces et sous- espèces résistantes parmi les staphylocoques coagulase négative. La zone d'inhibition des souches résistantes est inférieure à 16 mm sur milieu gélosé de Mueller- Hinton autour d'un disque de novobiocine chargé de 5 µg.

#### II.2.1.4- Galeries d'identification

Le diagnostic d'espèce peut être fourni par des galeries biochimiques miniaturisées. Le tableau 3 répertorie les principaux systèmes disponibles. Au laboratoire, nous utilisons les cartes Vitek2 ID- GPC ® et les galeries ID 32 Staph ®.

Ces systèmes utilisent des tests enzymatiques, des tests d'acidification ou d'utilisation de sucres ainsi que des tests de résistance aux substances inhibitrices. Ils sont partiellement ou entièrement automatisés et permettent une identification en 2 à 24 heures. Les pourcentages d'identifications correctes obtenus avec ces systèmes sont très variables. Cette disparité s'explique par la différence des systèmes comparés, la différence du nombre de souches testées à l'intérieur de chaque espèce, les plus fréquentes étant sur-représentées (Bascomb and Manafi, 1998).

Afin d'obtenir un résultat fiable, il est fortement recommandé d'appliquer le protocole délivré par chaque fournisseur. Des tests complémentaires peuvent

être réalisés en cas de difficulté diagnostique, tels que le test au déferroxamine, à la bacitracine ou encore la sensibilité à la polymyxine B mais ils sont peu utilisés en pratique courante. Enfin des méthodes d'identification moléculaire peuvent s'avérer nécessaires dans la détermination du diagnostic d'espèce lorsque les limites des techniques phénotypiques sont atteintes.

**Tableau 4: Principales galeries commerciales utilisées pour le diagnostic d'espèce**

Galerie	fournisseur	Nombre de tests	Espèces identifiées
API Staph	bioMérieux	19	20 staphylocoques, <i>Kocuria</i>
ID 32 Staph	bioMérieux	26	24 staphylocoques, microcoques, <i>Kocuria</i>
Vitek 2 ID- GPC	bioMérieux	41	20 staphylocoques, streptocoques, entérocoques, corynébactéries
BD Phoenix	Becton-Dickinson	–	29 staphylocoques

#### II.2.1.5- Milieux spécifiques

Des milieux spécifiques tels que le milieu de Chapman permet d'orienter vers *S. aureus* par acidification du mannitol, mais on observe des souches atypiques de *S. aureus* tréhalose et/ou mannitol négatifs (Honea, 2000). La pigmentation rose des colonies de *S. aureus* sur le milieu chromogène CHROMagar Staph aureus® après 24 heures d'incubation à 37°C permet de détecter *S. aureus* dans les prélèvements plurimicrobiens avec une sensibilité de 98,5% et une spécificité de 97% (Carricajo et al, 2001)

## II.2.2- Identification moléculaire

### II.2.2.1- Techniques sans amplification

Les techniques utilisant des sondes nucléiques sont capables d'identifier le genre et l'espèce. Le kit Accuprobe ® *S. aureus* (Gen- Probe, bioMérieux) utilise une sonde ADN monocaténaire permettant l'identification de l'espèce *S. aureus* par détection en chimioluminescence des ARN ribosomiaux spécifiques de cette espèce. Cette sonde est capable d'identifier de façon fiable les souches atypiques de *S. aureus* dépourvues de coagulase libre ou de facteur agglutinant (Freney et al, 2000). Une sonde spécifique du gène de la thermonucléase (*nuc*) de *S. aureus* en permet l'identification. D'autres sondes spécifiques de *S. haemolyticus* ou de *S. epidermidis* ont été décrites (Freney et al, 2000).

### II.2.2.2- Techniques avec amplification

La PCR- RFLP (PCR- Restriction Fragments Length Polymorphism) a pour but d'amplifier l'ADN cible avec des amorces spécifiques, puis de produire des fragments discriminants dans la distinction de différentes espèces à l'aide d'enzymes de restriction appropriées. La mise au point au laboratoire d'une PCR- RFLP, appliquée au gène *tuf* codant pour un facteur d'élongation impliqué dans la synthèse des protéines est utilisée en deuxième intention, après échec des méthodes phénotypiques. Elle permet le diagnostic d'espèce en associant un profil distinct pour 12 des espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme (TOG).

### III- Mécanismes de résistance aux antibiotiques

#### III.1- Résistance aux bêta- lactamines

##### III.1.1- Résistance à la pénicilline

La résistance à la pénicilline est de type plasmidique, inductible, par production d'une pénicillinase. Moins de 5% des isolats restent sensibles (Lowy, 1998) à la pénicilline. La détection s'effectue en routine sur l'automate Vitek 2 et par le test à la céfinase qui met en évidence la pénicillinase, ou par l'observation d'un diamètre d'inhibition inférieur à 29 mm autour d'un disque de pénicilline G. Les souches résistantes à la pénicilline G sont résistantes aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline), aux carboxypénicillines (ticarcilline), aux uréidopénicillines (pipéracilline).

##### III.1.2- Résistance à la méticilline

La résistance à la méticilline confère une résistance intrinsèque à toutes les bêta-lactamines, y compris l'imipénème. La synthèse d'une protéine de liaison additionnelle aux pénicillines (PLP2a), de faible affinité, est sous la dépendance du gène *mecA*. La régulation de l'expression de ce gène dépend au moins de deux systèmes incluant les gènes *bla* (pour  $\beta$ - lactamase) et les gènes *fem* (factors essential for methicillin resistance) (Lowy, 1998). Cette régulation entraîne une expression phénotypique variable. La résistance peut s'exprimer soit de manière homogène, par l'ensemble de la population bactérienne, soit de manière hétérogène (1 bactérie sur  $10^4$  à  $10^7$ ). Selon les critères définis par le CASFM, cette résistance doit être recherchée à l'aide d'un disque d'oxacilline à 5  $\mu$ g après incubation de 24 heures à 30°C sur milieu non supplémenté en chlorure de sodium, ou à 37° sur milieu hypersalé (2% à 4%) avec un inoculum à  $10^7$  UFC/ml.

### III.2- Résistance aux aminosides

Les staphylocoques sont naturellement sensibles aux aminosides. La modification enzymatique constitue le mécanisme de résistance le plus répandu. Elle est codée par des gènes plasmidiques ou transposables. Ces enzymes sont divisées en trois classes en fonction de la réaction biochimique qu'elles catalysent : acétylation d'un groupement aminé (aminoside acétyltransférase ou AAC) ; phosphorylation (aminoside phosphotransférase ou APH) ou adénylation (aminoside nucléotidyltransférase ou ANT) d'un groupement hydroxylé.

L'APH (3') confère une résistance de haut niveau à la kanamycine et à la néomycine. L'ANT (4') confère une résistance de haut niveau à la kanamycine et à la tobramycine (phénotype KT). L'APH (2'')- AAC (6') fait perdre l'activité bactéricide des trois aminosides, kanamycine, tobramycine et gentamicine (phénotype KTG).

### III.3- Résistance aux macrolides, lincosamides, synergistines

#### III.3.1- Modification de cible

Trois gènes *erm A*, *erm B*, *erm C* provoquent la résistance par altération de la cible ribosomale (sous-unité 50S). Les souches résistantes acquièrent une méthylase qui entraîne un changement conformationnel de l'ARN et une diminution de l'affinité pour la cible. Le phénotype MLS<sub>B</sub> inducible se caractérise par une résistance aux macrolides en C14 et C15 et reste sensible aux macrolides en C16, aux lincosamides et au composé B des streptogramines.

La résistance est étendue aux macrolides en C16, aux lincosamides et aux streptogramines B lorsqu'elle est constitutive.

### III.3.2- Inactivation enzymatique

- Lincosamides : l'acquisition d'une nucléotidyl- transférase codée par le gène *LnvA* confère un haut niveau de résistance à la lincomycine et un bas niveau à la clindamycine.
- Streptogramines : la résistance au composé A est liée à la synthèse d'une acétyl- transférase codée par le gène *Vat* et l'inactivation du composé B est provoquée par une hydrolase codée par le gène *Vgb*.

### III.3.3- Mécanismes d'efflux

Une résistance au composé A des streptogramines par un efflux actif est liée au gène *Vga*. Le gène *mrsA* entraîne une résistance inductible aux macrolides en C14 et C15 et la résistance aux streptogramines B en présence d'érythromycine.

### III.4- Résistance à la rifampicine

La rifampicine bloque l'initiation de la transcription de l'ADN bactérien en se fixant sur la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase.

La sélection de mutants résistants par mutations ponctuelles sur le gène

### III.5- Résistance à la fosfomycine

On décrit une mutation au niveau du système de transport de l'antibiotique sous la dépendance des gènes *glpT* et *uhp*, et une inactivation enzymatique codée par le gène *fosB*.

### III.6- Résistance aux tétracyclines

Un système d'efflux (gène plasmidique *tet*) est à l'origine de la résistance à la tétracycline mais ne touche pas la minocycline. La modification d'affinité pour

la cible ribosomale liée à un gène transposable entraîne une résistance croisée à la tétracycline et à la minocycline.

### III.7- Résistance aux fluoroquinolones

*S. aureus* est naturellement résistant aux fluoroquinolones de première génération (acide nalidixique et acide pipémidique). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise.

La topoisomérase IV a également une structure téramérique et est codée par les gènes *parC* et *parE*, habituellement dénommés *grlA* et *grlB* chez *S. aureus* (Pan et al, 2002)

La résistance survient à la suite de mutations dans des régions spécifiques QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) des gènes de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV. De nombreuses quinolones comme la ciprofloxacine, la lévofloxacine, la norfloxacine, l'ofloxacine, la péfloxacine sélectionnent des mutations dans *grlA*, puis dans *gyrA* ; faisant penser que la topoisomérase est la première cible et la gyrase, la seconde chez *S. aureus*. Cette enzyme est un tétramère constitué de deux sous-unités A et B codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB* (Mitsuyama et al, 1997 ; Tankovic et al, 1994)

Les mutations de *gyrA* aboutissent à une résistance de haut niveau. Ferrero et al (Ferrero et al, 1994) ont rapportés l'absence de mutations dans les domaines QRDR de *gyrA* au sein de souches à faible niveau de résistance (CMI à la ciprofloxacine inférieure à 16 mg/L), alors qu'une mutation de la sérine 80 dans la région QRDR de *grlA* était présente.

Les souches à haut niveau de résistance contenaient une mutation sur la sérine 80, associée à des mutations de *gyrA*.

Un efflux actif conférant une résistance à la norfloxacine chez *S. aureus* est sous la dépendance du gène *norA*, codant pour un polypeptide agissant comme une pompe à efflux. Le gène *flqB*, localisé sur le chromosome de *S. aureus* est

associé à une élévation d'expression de *norA*. Un troisième locus, dénommé *flqA*, distinct de *norA*, confère avec celui-ci une résistance de faible niveau, principalement pour les fluoroquinolones à caractère hydrophile (ciprofloxacine, ofloxacine) (Tankovic, 1994).

La prévalence des staphylocoques résistants à la méticilline et aux fluoroquinolones atteignait 52% à 62% en 1986, contre moins de 6% en 1987 (Mitsuyama, 1997). Hoiby et al (Hoiby et al, 1997) ont mis en évidence un processus de sélection par la ciprofloxacine sur les staphylocoques coagulase négative colonisant le nez et la peau qui deviennent résistants à la ciprofloxacine et à la méticilline.

### III.8- Résistance aux glycopeptides

L'apparition d'une résistance à la vancomycine chez les entérocoques, transférable in vitro à *S. aureus*, puis la diffusion de souches de *S. haemolyticus* (Lowy, 2003) et de *S. epidermidis* ayant une sensibilité diminuée aux glycopeptides ont fait redouter l'émergence de souches de *S. aureus* résistantes à ces antibiotiques (Lowy, 1998).

Les premier cas ont été rapportés en 1997, suivis d'autres observations

Ces souches dites VISA (vancomycin intermediate-resistant *S. aureus* ; CMI à la vancomycine comprise entre 8 et 16 µg/ml), isolées au Japon et aux Etats-Unis, étaient toutes méticilline résistantes, non clonales et issues de patients ayant bénéficié d'un traitement par vancomycine. Des altérations dans la synthèse du peptidoglycane correspondant à l'addition de résidus D-Ala-D-Ala, piégeant la vancomycine sont à l'origine de cette diminution de sensibilité (Lowy, 2003).

Deux cas d'infections incriminant des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (VRSA), datant de 2002, ont depuis été rapportés. La résistance est cette fois liée au transfert de l'opéron *vanA* d'*enterococcus faecalis*. La

synthèse d'un résidu D-Ala-D-Lac au lieu du peptide D-Ala-D-Ala est favorisée par l'exposition à de faibles concentrations de vancomycine. Un haut niveau de résistance (CMI supérieure à 128 µg/ml) est alors observé.

#### IV- Caractéristiques des variants colonies naines dans le genre staphylococcus

##### IV.1- Introduction

La connaissance des variants colonies naines (VCN) ou « small variant colony » (VCN) est très ancienne. Leur observation dans l'espèce *S. aureus* remonte à 1913, puis Hoffstadt et Youmans en 1932, Swingle en 1935, et Chinn en 1936 (Youmans and Delves, 1941) précisent leur aspect morphologique et le caractère instable de certaines d'entre elles en culture. La signification biologique est imputée à un ralentissement métabolique temporaire.

L'implication des VCN en pathologie humaine est évoquée en 1951. Hale (Hale, 1951) fut le premier à établir une relation de pathogénicité en isolant une souche VCN de *S. aureus* en culture pure d'un abcès. L'hypothèse d'une sélection par une antibiothérapie préalable est soulevée dès 1943, lors des travaux de Schnitzer et al qui isolent une souche de *S. albus* résistante à la pénicilline, après exposition à cet antibiotique. Cette notion de pression de sélection fut appuyée par Sherris en 1952 qui détecte des colonies naines de *S. aureus* issues d'abcès chez des patients également traités par une cure courte de pénicilline (Sherris, 1952). Wise et Spink en 1954 retrouvent, sur une série de six patients présentant des infections de localisations diverses, une antibiothérapie préexistante.

La connaissance du mécanisme aboutissant à ce phénotype est précisée par Yegain en 1959 et al qui montrent que l'addition d'hémoglobine ou d'hydrochloride d'hémine dans les milieux de culture restitue l'aspect de larges colonies. D'autres facteurs, notamment vitaminiques, sont ensuite définis, tels que la thiamine (Yegian et al, 1958), la cystéine, la ménadione (Sasarman et al, 1971).

D'autres espèces bactériennes sont concernées par ces variations phénotypiques. Elles sont observées en 1931 chez *Shigella dysenteriae* (Youmans and Delves, 1941). On les retrouve également chez les streptocoques (Cayeux et al, 1971), les staphylocoques coagulase négative (Proctor , Kahl B et al, 1998), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella spp*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Serratia marcescens*, *Neisseria gonorrhoeae*. Elles ont des points communs avec les variants de *S. aureus* à savoir, le défaut de pigmentation, la diminution de fermentation des sucres, l'auxotrophisme pour l'hémine, la thiamine, la ménadione et une résistance accrue aux aminosides (Proctor et al, 1994).

#### IV.2- Pathogénie

La découverte et la caractérisation des VCN de *S. aureus*, en particulier, ont permis d'envisager une nouvelle approche dans la compréhension de la physiopathologie des infections staphylococciques (Kipp et al, 2004). L'implication de ces variants en tant que microorganismes responsables et émergents d'infections chroniques persistantes ou récurrentes a été rapportée par plusieurs auteurs. Un large spectre d'infections a pu être décrit, pulmonaires, osseuses, cutanées (Bates et al, 2003 ; Abele-Horn et al, 2000, Proctor, 1994), cérébrales, septicémiques.

Deux points communs se dégagent cependant de la plupart de ces observations. En premier lieu, la capacité de ces variants à persister au sein des cellules explique qu'ils participent à la chronicisation de l'infection et favorisent les rechutes survenant parfois plusieurs années après le premier épisode septique.

La plus longue période de latence fut observée chez un patient qui à l'âge de 16 ans avait développé une ostéomyélite chronique du fémur gauche, suite à une blessure par éclats d'obus lors de la seconde guerre mondiale. Initialement traité par pénicilline G, ce foyer ne se réactiva que 54 ans plus tard, à la faveur d'un

hématome de cheville post- traumatique (Proctor, Kahl et al, 1998) ; sans qu'aucun facteur d'immunodéficience ne lui soit attribué. La souche de *S. aureus* variante isolée s'avérait d'ailleurs toujours sensible à la pénicilline G (0,01 µg/ml). Un autre cas de récurrence tardive a été récemment décrit par Kipp et al (Kipp et al). Il s'agit d'un abcès cérébral à VCN de *S. aureus* chez un patient de 45 ans, développé 10 ans après une intervention neurochirurgicale pour rupture d'anévrisme de l'artère communicante antérieure. Il fut traité par deux semaines de céfmandole en raison d'un pic fébrile au décours immédiat de cette opération.

L'évolution chronique de certaines pathologies pouvant être exacerbées par des épisodes de surinfections est un facteur prépondérant dans l'émergence de variants colonies naines. La maladie de Darier est une dermatose à transmission autosomique dominante, liée à une anomalie de la kératinisation qui répond à ces critères. Sur un suivi de 28 mois, von Eiff et al (von Eiff et al, 2001) ont étudiés 53 prélèvements provenant d'un patient atteint, recouvrant différents sites d'infections cutanées, ainsi qu'un portage nasalaire. Les cultures retrouvaient à la fois des souches de *S. aureus* phénotypiquement normales et des VCN, auxotrophe pour l'hémine, résistante à la méticilline, avec une CMI à la gentamicine 32 fois plus élevée que la souche isogénique. Sur cette étude prospective, 4 génotypes différents de VCN ont été individualisés et l'un des clones a persisté 18 mois. En dehors de ces observations ponctuelles, les VCN surviennent chez des groupes particuliers de patients qui ont comme dénominateur commun d'être exposés au long cours à des antibiotiques, notamment les aminosides et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. On distingue ainsi trois situations susceptibles de favoriser le développement de VCN.

Le plus étudié correspond aux patients souffrant de mucoviscidose. L'étude de Kahl (Kahl et al, 1998) montre que des souches de VCN de *S. aureus* sont isolées chez 25% des patients. Des études expérimentales ont étayé cette hypothèse de persistance accrue au sein des cellules épithéliales bronchiques

expliquant la pérennisation de ces souches (Sadowska et al, 2002) et une étude prospective menée sur six ans a pu montrer que 24 patients sur 72 étudiés étaient porteurs de VCN de *S. aureus* associées ou non à la souche parentale. La médiane de persistance de l'ensemble des phénotypes de *S. aureus* était de 37 mois ; la différence entre le phénotype VCN (49,5 mois) et le phénotype parental (25 mois) n'était cependant pas significative. Sur une autre cohorte de 78 patients, 26 (soit 49% des cas) étaient colonisés avec des VCN de *S. aureus* sur une période allant de 2 à 31 mois pour 19 d'entre eux (Kahl et al, 1998).

Les variants observés dans la mucoviscidose sont le plus souvent thymidine dépendant ou doublement auxotrophes pour la thymidine associée à la ménadione ou à l'hémine (Proctor and Peters, 1998).

Comme pour la mucoviscidose, les patients HIV positifs forment un second groupe de sujets exposés au long cours au triméthoprime-sulfaméthoxazole. Un cas de décès survenu chez un patient sidéen, lié à une septicémie à VCN de *S. aureus*, résistant à la méticilline, secondaire à un abcès de hanche, concluait à la nécessité d'évaluer par des études prospectives l'impact du traitement prophylactique antipneumocystosique sur l'apparition de ces souches déficientes (von Eiff et al, 2004).

La dernière population cible est constituée des patients ayant reçu des billes de ciment imprégnées de gentamicine dans le cadre de la reconstruction osseuse d'ostéomyélites. Dans une étude cas- témoin, von Eiff (von Eiff, Bettin et al, 1997), comparent deux populations de patients atteints d'ostéomyélite à *S. aureus*. Les patients porteurs de billes à la gentamicine étaient sujets à des rechutes infectieuses au cours desquelles des VCN étaient isolés, alors que les dix autres patients n'ayant pas reçu ce type d'implant étaient indemnes de toute rechute et ne présentaient pas de VCN sur les prélèvements osseux. Le même auteur rapporte un cas similaire en 1998, émettant l'hypothèse d'un relargage local d'aminoside, favorable à l'émergence de VCN, tel qu'il est utilisé in vitro. Les VCN, à croissance lente partagent des caractéristiques communes avec les

bactéries se développant dans les biofilm sur matériel inerte (Proctor, Kahl et al, 1998 ; Proctor, 1994). En 1976, Borderon relate 3 cas d'infections sur matériel d'ostéosynthèse, à VCN auxotrophes pour la ménadione [1 cas de *S. epidermidis* et 1 cas de *S. aureus* coexistant avec des souches non mutantes et une souche de *S. epidermidis* isolée seule, auxotrophe pour l'hémimine] (Borderon and Hordniceanu, 1976).

Une autre observation d'infection sur prothèse totale de hanche, survenu 5 ans après la pose, interpelle par la difficulté à établir le diagnostic et à isoler les souches déficientes. C'est devant un syndrome fébrile, au décours d'une prostatectomie radicale, imputé initialement à une bactériémie à *S. aureus* résistant à la méticilline et ne s'amendant pas sous vancomycine que le diagnostic fut établi en découvrant au 38<sup>eme</sup> jour post-opératoire, des VCN de *S.aureus* sur 10 hémocultures. Le bilan étiologique est négatif et une ponction de hanche reste stérile. Bien qu'ayant bénéficié de 8 semaines de traitement par vancomycine, associé à 3 semaines de rifampicine, le patient reste subfébrile. Six mois plus tard, devant un tableau de hanche douloureuse, l'ablation de la prothèse est réalisée et montre une infection plurimicrobienne à staphylocoque coagulase négative, entérocoque, *Clostridium perfringens* et *S. aureus* résistant à la méticilline dont le phénotype VCN ou non n'est cependant pas précisé (Proctor, 1995). L'étude en champs pulsé met en évidence un profil identique pour tous les VCN issus des hémocultures de ce patient.

La présence de ciment ou de billes aux antibiotiques n'est cependant pas obligatoire à la formation de VCN et des cas d'ostéomyélites survenues dans l'enfance, sans matériel se réactivant plusieurs années plus tard ont été relatées (Proctor, 1995). En 1996, Spearman et al rapporte un cas particulier d'arthrite sterno- claviculaire, non traumatique chez un enfant de 11 ans sans antécédents médicochirurgicaux, et n'ayant pris aucun traitement antibiotique préalable. La présence de VCN fut suspectée devant l'absence d'amélioration clinique alors

qu'une hémoculture confortait le diagnostic d'arthrite classique à *S. aureus* méticilline sensible.

Il semble donc que les variants isolés dans les infections ostéoarticulaires avec ou sans matériel sont des souches majoritairement de *S. aureus*, qu'ils partagent les mêmes caractéristiques que dans les autres pathologies (à l'exception de la mucoviscidose pour le type d'auxotrophisme) à savoir : une croissance lente, des aspects culturels atypiques avec non pigmentation, absence d'hémolyse, une résistance accrue aux aminosides et qu'ils sont principalement ménadione et/ou hémine dépendants. Ils génèrent des infections sur un os natif ou sur un os pathologique (ostéomyélite chronique), en présence ou non de matériel.

Comme nous l'avons vu dans les infections osseuses, les staphylocoques coagulase négative engendrent des variants à colonies naines responsables d'infections graves. Des endocardites sur prothèse valvulaires avec des variants de *S. epidermidis* ont été rapportées ainsi que des septicémies après implantation de pace-maker à *S. epidermidis* et *S. capitis* (von Eiff et al, 1999). Bien qu'étant souvent décrites comme moins virulents, les VCN sont responsables de décès qui surviennent pour la plupart sur des terrains fragilisés. Des cas ont été notés au Brésil dans une unité de soins intensifs et une septicémie sur cathéter à *S. epidermidis* VCN a été décrit chez un patient neutropénique atteint d'une leucémie myéloïde aigue. Cette souche, multirésistante (méticilline, aminosides, fluoroquinolones) avait de surcroît une CMI à la teicoplanine à 24 mg/L. Ce mutant semblait instable et l'auxotrophisme n'a pas pu être déterminé (Adler, 2003).

### IV.3- Virulence

#### IV.3.1- Modèles expérimentaux sur l'animal

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour étudier la virulence des VCN en particulier de *S. aureus* (Baddour and Chritensen, 1987). Dès 1932, Hoffstadt et

Youmans, puis Swingle (Swingle, 1935) ont comparé le taux de mortalité par injection intraveineuse au lapin entre des souches de VCN de *S. aureus* et les souches parentales. Les bactériémies observées avec les souches variantes étaient plus prolongées mais le taux de mortalité était moindre. Wise et Spink en 1954 ont précisé, à partir d'un modèle d'infection sur souris, qu'une souche de VCN de *S. aureus* persistait dans les tissus sans induire de réponse inflammatoire. D'autres études ont montré que la virulence des souches de variants était moins importante (Pelletier et al, 1979 ; Baddour et al, 1988). Cependant, sur un modèle d'arthrite septique de souris utilisant un mutant *hemB*, les arthrites étaient plus sévères alors que la charge bactérienne détectée dans les articulations et les reins était plus faible que celles de la souche parentale. Cette virulence tient à une production de protéases retrouvées 20 fois supérieure pour les souches *hemB* que pour la souche sauvage (Jonsson et al, 2003). Plus récemment, une étude utilisant un modèle d'endocardite de lapin a fourni plusieurs éléments pertinents (Bates et al, 2003). Deux types de mutants stables ont été générés à partir d'une souche de *S. aureus* via des mutations dans le gène *hemB* et *menD*, donnant respectivement des mutants auxotrophes pour l'hémine et la ménadione. Contrairement aux études précédentes, les deux types de mutants ont la même capacité à induire l'endocardite que la souche parentale. Après un traitement par oxacilline (50 mg/kg, 3 fois par jour pendant 3 jours), la densité bactérienne dans différents organes cibles (végétations cardiaques, reins, rate) est comparée pour chacun des mutants à celles de la souche parentale. Deux profils se distinguent après traitement par l'oxacilline :

Les densités bactériennes dans l'ensemble des organes cibles pour le mutant *hemB*, la souche parentale et le mutant *hemB* complémenté en hémine, sont significativement ( $p < 0.05$ ) diminuées par rapport au groupe témoin non traité.

S'agissant du mutant *menD*, la densité bactérienne est diminuée dans les végétations cardiaques mais pas de façon significative dans la rate ( $p = 0.39$ ) ou les reins ( $p = 0.17$ ). Lorsqu'il est complémenté, les densités bactériennes

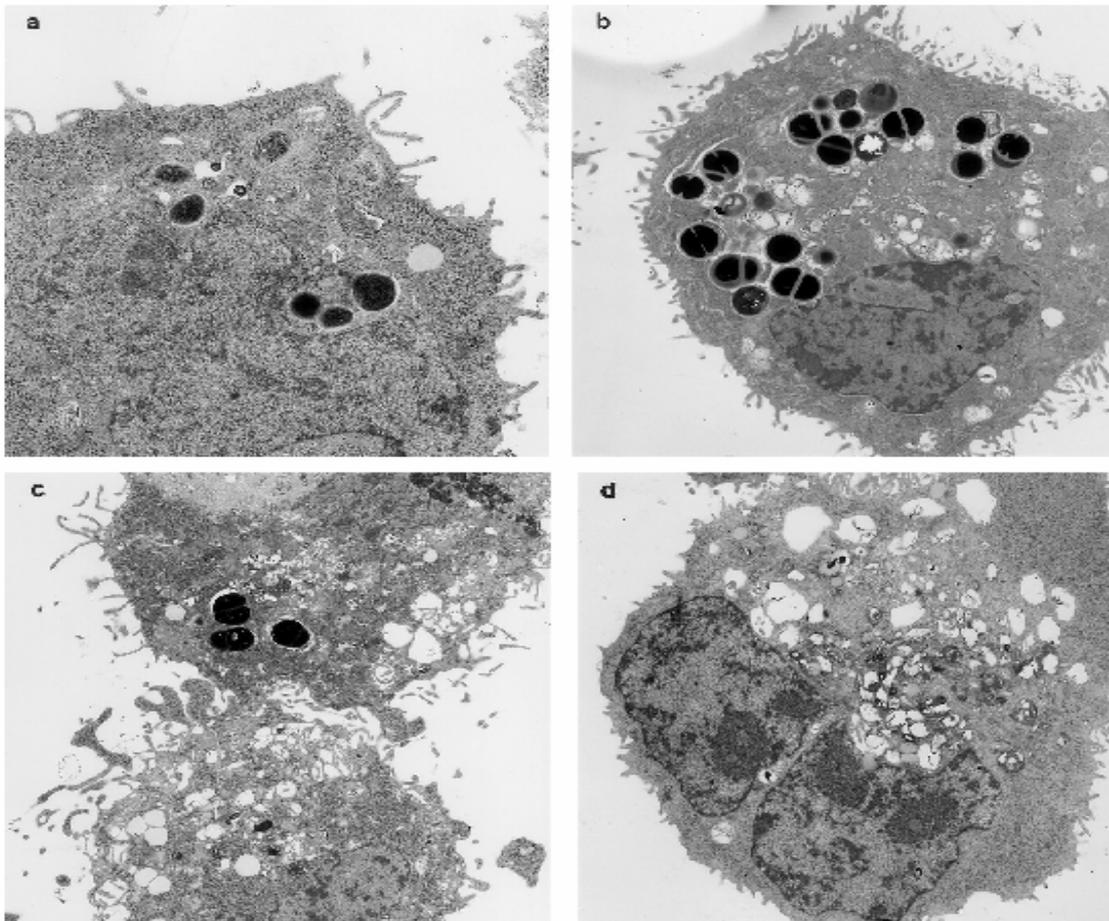
retrouvent des niveaux similaires dans chaque organe cible à celles observées avec la souche parentale. Cette disparité entre les deux types de mutants serait liée, selon les auteurs à l'apport d'hémine par les micro-infarctus emboliques qui surviennent au cours d'une endocardite, vers les organes tels que le rein ou la rate et expliquerait la meilleure action de l'oxacilline. Concernant le défaut de clearance des foyers rénaux et spléniques avec le mutant *menD*, l'hypothèse serait qu'au sein des végétations, les bactéries VCN sont imbriquées dans la matrice extra-cellulaire de fibrine et de plaquettes, alors que dans les emboles métastatiques, la présence de cellules endothéliales fournirait au mutant *menD*, un site d'invasion propice. Le niveau intracellulaire de ménadione est 100 fois plus faible que celui requis pour assurer la réversion vers un phénotype normal de *S. aureus*. Les auteurs avancent également l'hypothèse que les VCN auxotrophes pour l'hémine sont plus fréquemment isolés de sites peu vascularisés comme le tissu osseux ou les prélèvements de crachats, alors que les mutants ménadione dépendants seraient plus ubiquitaires.

Un modèle de mastite bovine (Brouillette et al, 2004) utilisant une souche de *S. aureus* et son mutant *hemB* isogénique, montre que le mutant présente une moins bonne capacité à coloniser les cellules épithéliales de glandes mammaires mais qu'il est capable de persister 100 fois plus longtemps dans ces cellules y compris avec un traitement par céphapirine.

#### IV.3.2- Modèles sur culture cellulaire

Le potentiel de survie des variants colonies naines, au sein des cellules de l'hôte a été expérimenté sur différentes lignées cellulaires

Une étude sur kératinocytes humains a montrée une persistance intracellulaire 100 fois plus élevée pour deux VCN de *S. aureus* provenant d'un patient atteint de la maladie de Darier et souffrant de multiples récurrences cutanées (von Eiff et al, 2001).



**Figure 2 : Coupes ultrafines en microscopie électronique de kératinocytes HaCaT infectés par une souche clinique de *S.aureus* VCN et de sa souche isogénique. *a, b*, persistance intracellulaire de la souche VCN dans les cellules HaCaT viables après (*a*) 30 minutes ou (*b*) 48 heures d'incubation. Les cellules ne montrent pas de signes de dégénérescence. *c, d*, *S. aureus* de phénotype normal est incorporé au bout de 30 minutes dans les cellules HaCaT viables (*c*) ; après 48 heures d'incubation, la majorité des cellules présentent des signes de dégénérescence (*d*). ( von Eiff C, 2001).**

Etudiant la phagocytose de VCN de *S. aureus* issus de patients atteints de mucoviscidose, Sadowska (Sadowska et al, 2002) a mis en évidence que l'ingestion par les granulocytes était moins important pour des VCN que pour les souches de *S. aureus* non mutantes. La cytotoxicité et la mort des bactéries étaient cependant équivalentes pour les deux phénotypes. D'autres part, l'adhésion sur des cellules épithéliales bronchiques de mutants *hemB* et de

certaines souches VCN déficientes en hémine ou en ménadione, provenant des patients mucoviscidosiques était significativement plus élevée.

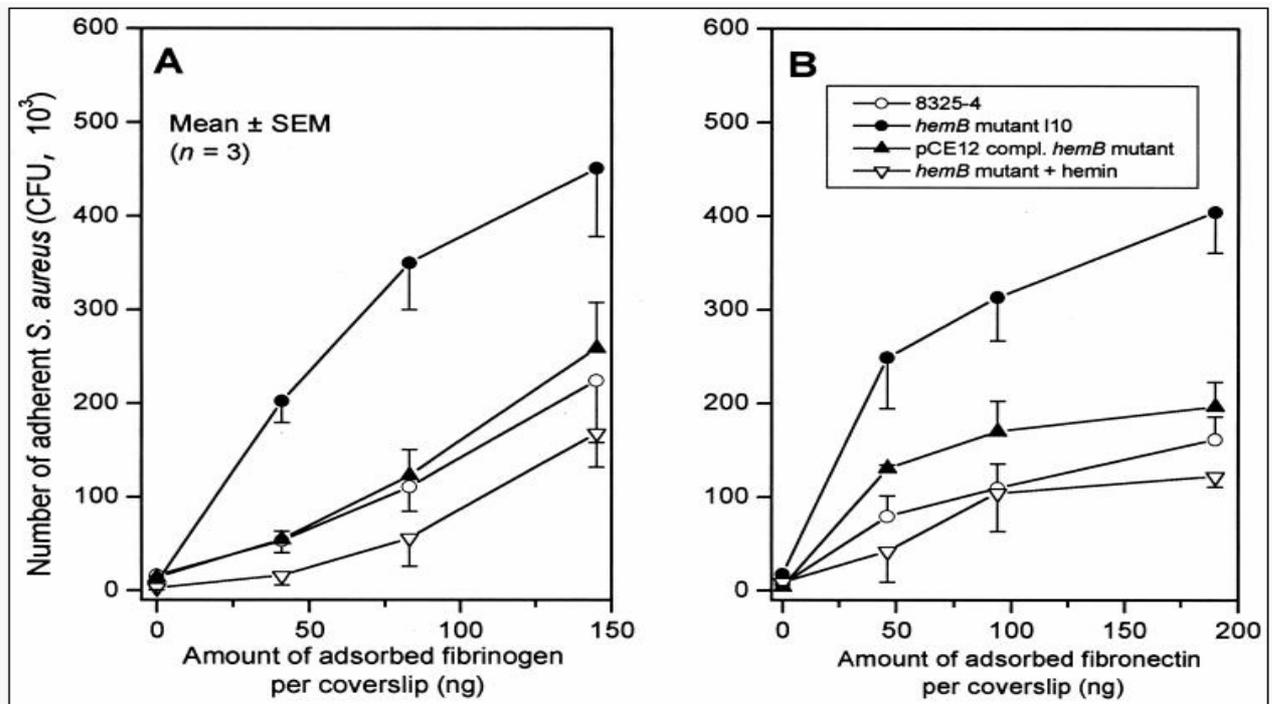
Les mêmes résultats sont retrouvés sur une lignée de cellules endothéliales bovines avec des mutants hémine et ménadione sélectionnés sous gentamicine et dérivés de la souche 6850 isolée de prélèvements d'ostéomyélite (Balwitt et al, 1994). Cette souche de *S. aureus* a la particularité de donner spontanément environ 1% de VCN stables sur gélose tryptine-soja, en l'absence d'antibiotiques et d'induire la formation de VCN à hauteur de 3% et jusqu'à 12% après 48 heures d'incubation lorsqu'elle est cultivée avec des cellules endothéliales.

#### IV.3.3- Autres facteurs de virulence

##### IV.3.3.1- Les adhésines

Un mutant *hemB* de *S. aureus* présente un nombre plus élevé de sites antigéniques de liaison au fibrinogène (Clfa) et à la fibronectine (FnBP), comparée à la souche isogénique dont il est issu. Ces données quantitatives fournies par cytométrie en flux, montrent une capacité moyenne d'adhésion 3 fois plus élevée pour le mutant *hemB* par rapport à une souche exprimant le plasmide pCE12 contenant le gène *hemB* ainsi qu'à la souche *hemB* supplémentée en culture par de l'hémine. La réalisation d'une PCR en temps réel, démontre l'augmentation d'expression des gènes *clfA* et *fnb* chez le mutant *hemB*. Ce phénomène n'est pas régulé par l'opéron *agr*. L'expression des gènes *clfA*, *fnbA* et *fnbB* n'est pas corrélée avec le nombre de transcrits *sarA* (Vaudaux et al, 2002).

**Figure 3 : Adhésion sur des particules recouvertes de fibrinogène et de fibronectine d'un mutant *hemB*,supplémenté ou non en hémine, d'un mutant pCE12 et de la souche parentale (Vaudaux P, 2002).**



**FIG. 1.**

Adhesion to fibrinogen-coated (A) or fibronectin-coated (B) coverslips of the parental strain (8325-4), its *hemB* mutant (strain I10) with (1  $\mu$ g/ml) or without supplementation with hemin, and the pCE12-complemented mutant (strain A2) with 0.5% xylose in MHB.

#### IV.3.3.2- Toxines et enzymes

Une étude des protéines intracytoplasmiques retrouvées dans un mutant *hemB* et son homologue parentale montre que la persistance intracellulaire de VCN est associée à une diminution de la production de la toxine  $\alpha$  (Bates et al, 2003 ; Kahl et al, 1998 ; Kohler et al, 2003). D'autres sérines protéases (SplB, SplE, SplF) ne sont pas produites et le RNAlII n'est pas détecté, que les cellules soient en phase de croissance exponentielle ou en phase stationnaire. Il semblerait que la densité bactérienne dans une population de VCN soit trop faible pour activer le système *agr* ou que le peptide du quorum-sensing ne soit pas synthétisé.

#### IV.3.3.3- Protection contre les défenses immunitaires

Certains peptides cationiques à activité antimicrobienne (protamine, dermaseptine, peptide neutrophile humain HNP-1) ont été testés sur des VCN provenant de patients atteints de mucoviscidose et d'un mutant *hemB* sélectionné in vitro, ainsi qu'à leurs souches parentales respectives (Sadowska et al, 2002). Les résultats indiquent une faible sensibilité à certains peptides cationiques comme la protamine et des réponses identiques entre souches parentales et mutantes pour les autres peptides. Toutefois, en reproduisant un milieu hypersalé (à 200 mM de NaCl) proches des conditions physiopathologiques de la mucoviscidose, l'action de la protamine est significativement inhibée vis-à-vis des souches *hemB* déficientes.

Une autre étude démontre également la résistance de ces mêmes mutants *hemB* contre le peptide cationique plaquettaire staphylococcique (tPMP-1), normalement sécrété par les cellules endothéliales et induit par la toxine  $\alpha$ , dont la production est de surcroît réduite par les VCN (Bates et al, 2003).

## IV.4- Métabolisme

### IV.4.1- Facteurs de sélection et de reversion

Ces facteurs sont résumés tableau 5.

**Tableau 5 : Facteurs de sélection de VCN in vitro (Baddour, 1987).**

<b>Facteurs</b>	<b>Références</b>
Incubation prolongée	Hale, 1947
Gentamicine (bouillon)	Musher et al, 1977
Streptomycine (bouillon ou gélose)	Barbour, 1950 Browning et al, 1950
Pénicilline (bouillon ou gélose)	Youmans et al, 1945 Eriksen, 1946
Méticilline (gélose)	Bulger, 1967
Kanamycine (gélose)	Yégian et al, 1959
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	Kahl BC, 2003
Chlorure de lithium (bouillon)	Hoffstadt et al, 1932
Chlorure de magnésium, sodium (gélose)	Youmans et al, 1942
Sels de barium (gélose)	Youmans et al, 1942

D'autres facteurs ont été décrits comme la protamine (Sadowska et al, 2002), les L-antibiotiques (Proctor et al, 1994), ainsi que la sélection spontanée in vitro, de variants colonies naines, sur des cultures de cellules endothéliales (Balwitt, 1994).

Les principaux facteurs de réversion décrits dans la littérature sont l'hémine, la ménadione, la thiamine, la thymidine mais aussi le dioxyde de carbone.

#### IV.4.2- Bases biochimiques

Plusieurs études ont montré que les souches de VCN de *S. aureus* isolées en clinique ou induites in vitro étaient auxotrophes principalement pour la ménadione, l'hémine et la thiamine, en dehors du cas particulier des VCN auxotrophes pour la thymidine rencontrés dans le cadre de la mucoviscidose.

La base biochimique de développement de ces différents variants est commune et résulte d'un défaut de transport d'électrons (Proctor et al, 1994).

La ménadione subit une réaction d'isoprénylation pour former la ménaquinone qui est le premier accepteur d'électrons chez *S. aureus*. Les cytochromes qui reçoivent les électrons de la ménaquinone ont besoin d'un groupement prosthétique héminique pour former un potentiel d'oxydo-réduction (Vaudaux P et al, 2002).

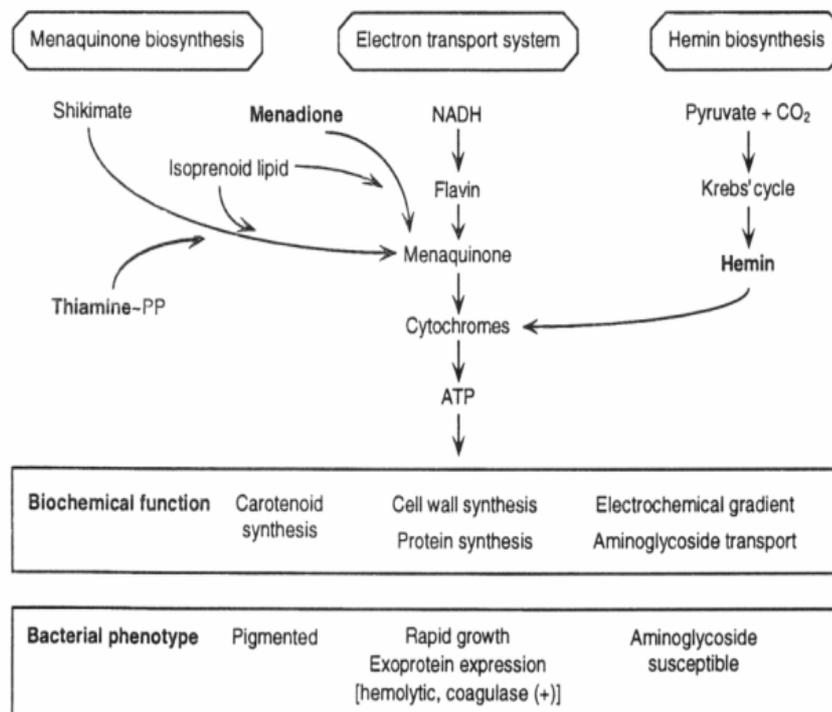
Une réduction transitoire du transport d'électrons survient lorsque *S. aureus* est incubé en anaérobiose (Balwitt et al, 1994) ; ce qui interrompt la biosynthèse de ménaquinone. La thiamine est requise dans la biosynthèse de la ménaquinone.

L'hémine est nécessaire à la synthèse des cytochromes. Le gène *hemB* fait partie des gènes codant pour les enzymes intervenant dans la voie de synthèse des porphyrines. Il code pour une enzyme assurant la conversion de l'acide delta-aminolévulinique en porphobilinogène (von Eiff, Heilmann et al, 1997)

En l'absence de cette enzyme, le mutant *hemB* ne peut synthétiser l'hème aboutissant à une altération du système de transport d'électrons. Il est capable de pousser sur un milieu contenant du glucose mais ne peut pas utiliser le mannitol comme source de carbone. Le temps de doublement a été évalué à 22,6 +/- 3 minutes pour la souche sauvage et à 53,3 +/- 4 minutes pour le mutant *hemB* (Brouillette, 2004). La concentration intracellulaire d'ATP chez les mutants est diminuée et la supplémentation en hémine ou ménadione restaure le phénotype sauvage (Proctor et al, 1994). Cette baisse du gradient d'électrons et de production d'ATP a des effets pléiotropiques :

- L'incapacité pour la bactérie à utiliser d'autres sucres que le glucose et le fructose.
- La diminution de sensibilité aux aminosides dont l'action dépend du gradient électro-chimique.
- Le défaut de pigmentation des souches VCN, liée à la synthèse en caroténoïde.
- La diminution de production de la toxine  $\alpha$  et de la coagulase dont la synthèse est ATP- dépendante (biosynthèse des acides aminés) mais aussi dont la transcription des ARNm serait spécifiquement réduit. De plus, le facteur de stress sigma, activé par la baisse d'ATP, interagit sur les systèmes régulateurs *sar* et *arg* (Proctors and Peters, 1998).

**Figure 4 : Voies métaboliques de la synthèse de la ménadione et de l'hémin impliquées dans la production d'ATP (Proctor, 1995).**

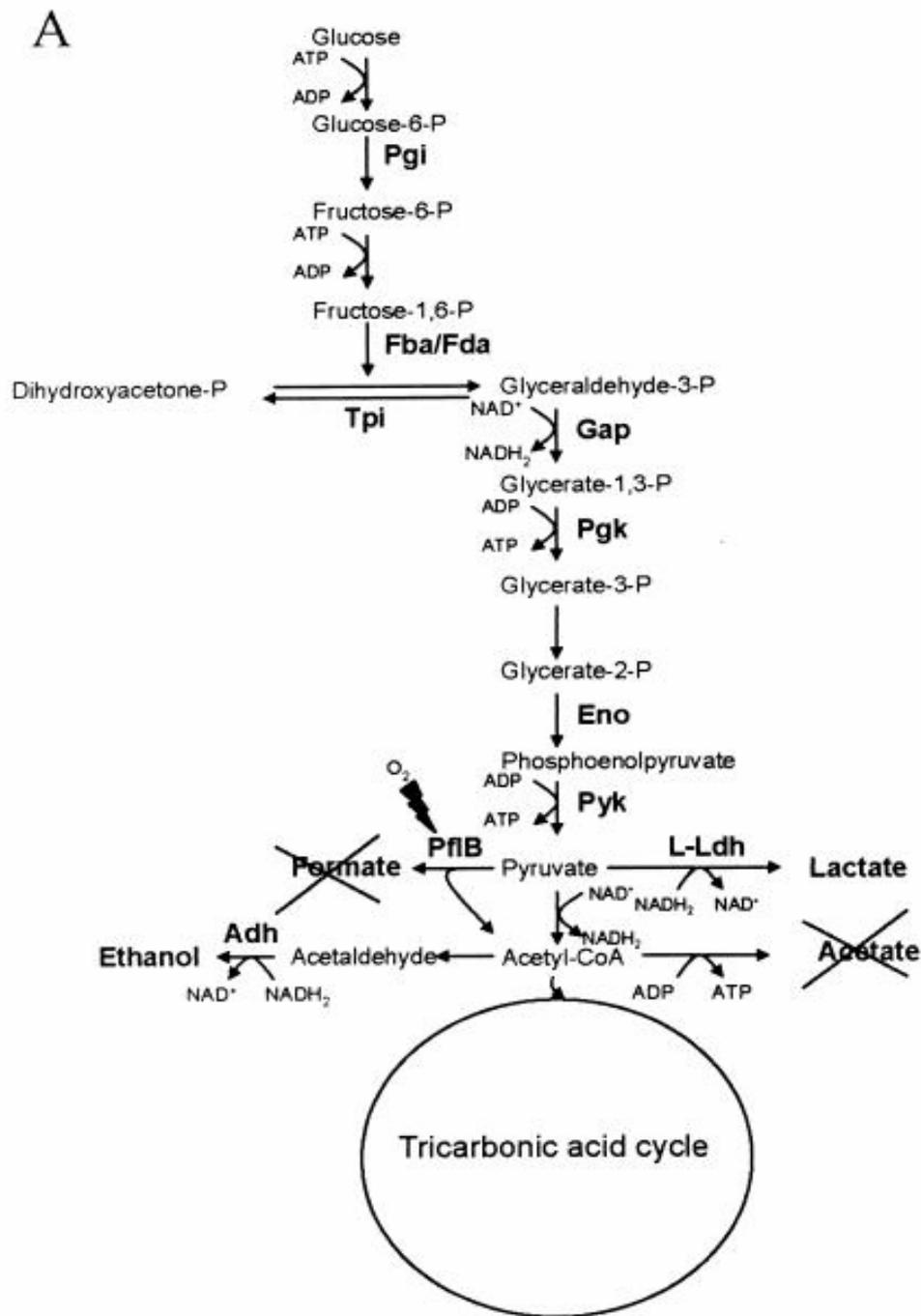


**Figure 2.** Proposed model relating hemin and menaquinone biosynthesis, the generation of cellular energy as ATP (adenosine triphosphate) by the electron transport system, and the phenotypic characteristics of *S. aureus*. In this model, impaired synthesis of the precursors results in decreased activity of the electron transport system (NADH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide), with subsequent phenotypic alterations typical of SCVs. Such isolates are auxotrophic for the depleted intermediate, and in the presence of nutritional supplements (indicated in bold), they revert to the normal phenotype. Note: ~PP = diphosphate.

Une étude des protéines intracytoplasmiques produites par un mutant *hemB*, précise les réactions métaboliques impliquées dans la voie de la glycolyse et de la fermentation. Celles-ci sont activées par l'interruption de la chaîne de transport d'électrons (Kohler et al, 2003). En aérobiose, les protons sont transférés depuis le NADH aux transporteurs de la chaîne d'électrons fournissant des molécules d'H<sub>2</sub>O et d'ATP. Si l'oxygène ou les accepteurs d'électrons sont absents, le NADH est recyclé par fermentation.

Des composants de la voie de fermentation (lactate deshydrogénase, alcool déshydrogénase, pyruvate formase lyase) sont effectivement retrouvés chez le mutant *hemB* en phase exponentielle de croissance, en aérobiose. Parallèlement des taux significatifs de lactate sont retrouvés dans le milieu de culture, indiquant que le NADH est oxydé par la transformation du pyruvate en lactate. Le lactate ne peut cependant pas être utilisé comme source de carbone par le mutant en cas d'épuisement des réserves de glucose. Le mutant *hemB* n'est pas capable d'utiliser la voie de synthèse des citrates, la voie de l'arginine déaminase est stimulée pour compenser et assurer la production suffisant d'ATP. Cette voie est utilisée par d'autres bactéries en condition d'anaérobiose lorsque le glucose est épuisé.

Figure 5 : Voie de la glycolyse chez un mutant *hemB* en aérobiose.



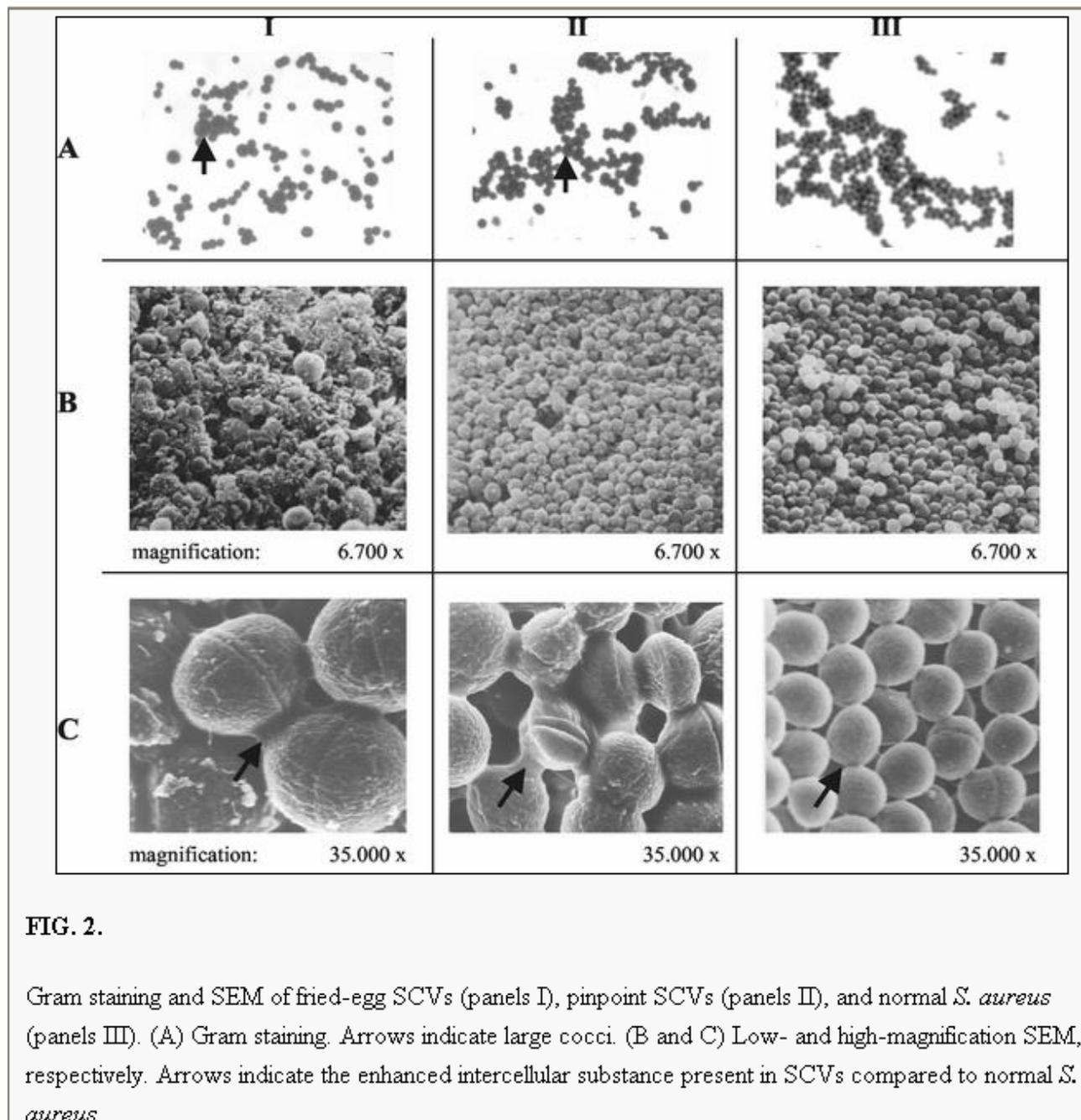
#### IV.5- Diagnostic bactériologique

##### IV.5.1- Examen direct

L'examen direct par coloration de Gram, de VCN est variable. La morphologie des cocci peut être similaire à celle d'une souche de *S. aureus* normale (Acar et al, 1978 ; Proctor et al, 1994) ; tandis que des VCN thymidine-dépendant,

revêtent un aspect pléiomorphique. Certaines de ces colonies ont été décrites avec un aspect granité et de taille hétérogène.

**Figure 6 : Aspect morphologiques de variants thymidine dépendant et d'une souche de *S. aureus* normale en coloration de Gram et microscopie électronique (Kahl, 2003).**



#### IV.5.2- Cultures

##### → **Isolement à partir de prélèvements cliniques**

Des procédures définissant les milieux à utiliser pour détecter des VCN, ont été décrites par plusieurs auteurs (Kahl et al, 1998 ; Kipp et al, 2004 ; von Eiff et al, 2004) qui préconisent d'ensemencer les prélèvements sur trois milieux de culture :

-Une gélose Columbia incubée à 35°C pendant 48 heures en aérobiose.

-Une gélose Schaedler et gélose Cœur- Cerveille avec 5% de chlorure de sodium, incubées en anaérobiose à 35°C pendant 48 heures.

Toutes les colonies ayant poussé sont secondairement repiquées sur une gélose Columbia incubée en aérobiose à 35°C jusqu'à 72 heures et une gélose Schaedler incubée sous CO<sub>2</sub> afin d'observer une différence de croissance (Kahl et al, 1998).

Les VCN sont suspectées sur la présence de petites colonies (environ 1mm), non pigmentées, blanches ou grises, non hémolytiques sur Columbia qui reprennent un aspect phénotypique normal sur Schaedler ou après supplémentation en ménadione, hémine, thiamine, ou thymidine.

Certains auteurs déconseillent ces milieux en raison de leur trop grande concentration en ménadione et/ou hémine (McNamara PJ, 2000).

Des isollements de VCN sur sang de mouton sont également possibles (Spearman et al. 1996)

Une étude récente (Kipp F et al, 2005), a évalué la fiabilité de milieux chromogènes dans la détection de VCN à partir de prélèvements cliniques. Le milieu *S. aureus* ID agar (SAID, bioMérieux) est retenu car il assure la croissance de 49 souches de VCN sur 53 testées. Bien que ne modifiant pas la coloration du milieu, les souches VCN poussent en 24 heures avec soit un phénotype normal soit un phénotype de VCN. Les auteurs précisent qu'il est nécessaire d'attendre 72 heures d'incubation pour que certaines souches de VCN

puissent être détectées. L'ensemencement d'une gélose Columbia associée au milieu SAID reste toutefois recommandée.

→ **Isolement à partir de souches de *S.aureus***

Il s'agit de déterminer les procédures permettant de sélectionner in vitro des souches déficientes et de maintenir ce phénotype stable.

Des bouillons pauvres de type Mueller-Hinton ou trypticase-soja (TS) additionnés d'antibiotiques sont ensemencés avec un inoculum fort ( $10^7$  cfu) de la souche parentale. L'incubation se fait à 35°C pendant 24 à 72 heures dans un bain-marie agitant. Un premier réisolement est effectué sur gélose TS en aérobiose à 35°C. La stabilité des mutants est testée par plusieurs réensemencements sur géloses TS ou sur géloses au sang pour vérifier que le caractère non hémolytique persiste après au moins 6 à 8 réisolements (Pelletier et al, 1979 ; Balwitt et al, 1994).

#### IV.5.3- Identification

→ *Staphylococcus aureus*

La catalase est faible et la coagulase en tube est positive mais souvent retardée nécessitant d'attendre au moins 24 heures. Le test Pastorex Staph Plus (Sanofi Pasteur) est également positif. La galerie biochimique (Api 32 Staph plus®, bioMérieux) est utilisée, avec des performances variable, les souches VCN ne fermentant pas le mannitol (Pelletier et al, 1979 ; Proctor et al, 1994 ; Proctor, Kahl et al, 1998)

Le diagnostic d'espèce est confirmé par PCR recherchant le gène *nuc* de la thermonucléase. Une étude relatant un cas d'abcès cérébral avec une souche VCN de *S. aureus*, auxotrophe pour l'hémine, a utilisé avec succès, une technique d'hybridation in situ détectant l'ARN 16S, directement sur un prélèvement per-opératoire de tissu (Kipp et al, 2003).

→Staphylocoques à coagulase négative

Il existe moins de cas d'infections rapportées avec des souches de VCN (Baddour et al, 1988 ; Adler et al, 2003 Sadowska et al, 2004).

L'identification par galeries biochimiques (API Staph Kit bioMérieux ; API Staph-Ident® system Analytab Products, plainview, NY) parvient à rendre le diagnostic d'espèce. Celui-ci est confirmé par étude de ARN 16s.

#### IV.5.4- Tests d'auxotrophisme

Ils sont réalisés dans la majorité des études à l'aide de disques imprégnés avec 15µl de ménadione à 10µg/ml, de thymidine à 100µg/ml, 1µg/ml d'hémine à 1µg/ml et de thiamine à 5µg/ml, déposés sur gélose CDM (« chemically defined medium ») (van de Rijn I, 1980) ou sur gélose MH (Acar et al, 1978) ou trypcase- soja (Proctor et al, 1995) et incubées pendant 18 heures.

#### IV.5.5- Antibiogramme

La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode en diffusion utilisant des disques ou par E-test sur gélose de Mueller- Hinton (MH) (Kahl et al, 1998). Il est recommandé d'utiliser une gélose Columbia ou une gélose MH au sang lorsque la souche VCN pousse difficilement. (von Eiff et al, 2004 ). En raison de la croissance lente des VCN, Proctor et al ne recommandent pas cette méthode, ni celle des automates, et préconisent la détermination des CMI par dilution en milieu liquide ou solide (Proctor and Peters, 1998). La difficulté à déterminer correctement les CMI a déjà été soulevée il y a plusieurs années. Les travaux de Acar JF en 1978 montre des disparités de CMI lorsque les souches de VCN sont testées sur milieu supplémenté ou non. Utilisant la méthode par dilution sur gélose MH, il observe que sur milieu non supplémenté les VCN thiamine ou ménadione déficients sont plus sensibles à l'oxacilline et plus résistants à la kanamycine et à la gentamicine que les souches révertantes. Lorsque les milieux sont supplémentés les CMI à l'oxacilline sont similaires. Les CMI aux

aminosides bien que plus basses, n'atteignent pas la valeur observée pour les révertants. En conclusion, l'auteur recommande de tester les VCN comparativement sur milieu supplémenté et non supplémenté, bien que l'interprétation in vivo de ces valeurs soit délicate.

Concernant la détection de la résistance à la méticilline, Kipp F et al en 2004 ont comparé plusieurs techniques dont la méthode en diffusion par disque d'oxacilline à 5 µg/ml, le test d'agglutination MRSA- Screen latex (Denka Seiken CO. Ltd, Japan), l'automate Vitek 2 (bioMérieux) et enfin la présence du gène *mecA* par PCR. Le test au latex et la détection du gène *mecA* par PCR sont les deux méthodes retenues pour mettre rapidement en évidence, de façon fiable les VCN méticilline- résistantes. Dans cette étude, 0,5% à 2% des *S. aureus* méticilline- résistant avaient un phénotype de VCN. Aucune corrélation entre le type d'auxotrophisme et la présence d'une résistance à la méticilline n'a été observée.

#### IV.6- Mécanismes de résistance

Trois mécanismes de résistance particuliers aux variants colonies naines sont répertoriés dans la littérature, la résistance aux aminosides, au triméthoprime-sulfaméthoxazole et aux fluoroquinolones.

##### IV.6.1- Résistance aux aminosides

L'exposition aux aminosides est un facteur de sélection à la fois in vitro et in vivo de VCN. La prophylaxie des patients mucoviscidosiques et la pose de matériel ostéo-articulaire imprégnés d'aminosides constituent les deux principales situations où s'exerce cette pression de sélection.

Le ribosome constitue la cible des aminosides qui doivent traverser les enveloppes bactériennes pour exercer leur action bactéricide. De part leur

caractère très hydrophile, le passage à travers la membrane cytoplasmique ne peut se faire par diffusion passive, mais par un processus requérant de l'énergie. Deux phases énergie-dépendantes sont individualisées et sont conditionnées par la force électrique proton-motrice. Celle-ci dépend du fonctionnement de la chaîne respiratoire et de l'ATPase translocatrice de protons. La première phase consiste en une accumulation lente de l'antibiotique et aboutit à un effet bactériostatique. Des erreurs de lecture au cours de la traduction de l'ARN messenger conduiraient à la synthèse de protéines membranaires anormales aboutissant à une accumulation rapide de l'aminoside provoquant un effet bactéricide (Davis BD, 1987). Un autre modèle impliquerait un canal assurant le rôle de transporteur et dont le pourcentage d'ouverture dépendrait de la composante électrique de la force proton-motrice. Les aminosides seraient susceptibles de modifier cette composante pour entraîner leur propre accumulation (Leviton IM et al, 1995). Ainsi, l'altération du potentiel transmembranaire chez les VCN et la baisse d'ATP expliquent une résistance accrue aux aminosides (Proctor, Kahl et al, 1998).

Le lien entre l'apparition du phénotype VCN et le mécanisme par lequel l'aminoside aboutit à ce changement de croissance et de morphologie n'est pas clairement établi. Les travaux de Massey en 2001 montrent qu'un changement rapide entre le phénotype VCN et le phénotype révertant est inductible par l'aminoside, reproductible, et entraîne une résistance réversible. Ce switch ne serait pas lié à une réplique de VCN préexistants dans l'inoculum de départ en raison du temps de doublement des bactéries. Le substratum génétique n'est cependant pas définit.

#### IV.6.2- Résistance au triméthoprim- sulfaméthoxazole

Les folates, en particulier l'acide tétrahydrofolique sont utilisés dans de nombreuses réactions biochimiques comme porteurs de substrats monocarbonés. Ils sont à ce titre nécessaires à la synthèse des acides nucléiques. Or la plupart

des bactéries ne peut utiliser les folates exogènes et doit les synthétiser. Le sulfaméthoxazole et le triméthoprimé sont des analogues structuraux des précurseurs de l'acide tétrahydrofolique et constituent donc des inhibiteurs compétitifs entraînant une diminution des nucléotides engagés dans la synthèse des acides nucléiques et un arrêt de la croissance bactérienne.

Plusieurs études menées chez des patients atteints de mucoviscidose, infectés ou colonisés, relèvent que les souches de VCN de *S. aureus*, thymidine-dépendantes, sont résistantes au triméthoprimé-sulfaméthoxazole (TMP-SMZ) (CMI supérieure à 32 mg/L) alors que leurs souches isogéniques sont sensibles (CMI inférieure à 0,125 mg/L). Quarante et une pourcents des patients ont reçu du TMP- SMZ pendant plus de 18 mois en cure continue. L'exposition au TMP- SMZ est un facteur de risque significatif chez ces patients. L'isolement de VCN après un intervalle libre sans TMP-SMZ (3-31 mois) est parfois observé. Le remplacement exclusif d'isolats de *S. aureus* normaux, par des VCN plusieurs années après le début de l'infection, attestent de l'adaptation de ces souches sélectionnées sous pression antibiotique. De plus, la résistance au TMP-SMZ est fréquemment associée à une résistance aux aminosides chez ces patients également soumis à des traitements intermittents avec cette classe d'antibiotiques (Kahl et al, 1998 et 2003).

L'impact de la prophylaxie par TMP- SMZ chez les patients séropositifs a été étudié en déterminant la prévalence de VCN de *S. aureus* par un dépistage nasal. Aucune association n'a pu être mise en évidence en raison du faible nombre de patients porteurs de VCN (3 patients sur 125) (von Eiff et al, 2004).

#### IV.6.3- Résistance aux fluoroquinolones

L'acquisition de la résistance chromosomique à la ciprofloxacine chez des souches de VCN sélectionnées *in vitro* a été démontrée. Les mutations retrouvées dans les gènes explorés (*gyrA* et *grlA*) et les CMI de SVC et de leurs souches parentales exposées à la ciprofloxacine sont similaires (Schmitz FJ et al,

2001). Le phénotype VCN n'intervient donc pas dans l'acquisition du mécanisme de résistance. Des résultats identiques sont décrits dans cette étude concernant la rifampicine et la muropicine.

Une relation entre la structure chimique des fluoroquinolones et l'émergence de VCN a été établit in vitro (Mitsuyama J et al, 1997). L'exposition d'une souche de *S. aureus* à la pazufloxacin donne des VCN 2 fois moins sensibles que la souche sauvage. Cependant, il n'y a pas d'augmentation des CMI après un deuxième niveau de sélection que ce soit avec la pazufloxacin ou la ciprofloxacine. La diminution de sensibilité de ces VCN n'est pas reliée à des mutations des gènes de l'ADN gyrase ni de la topoisomérase IV. Un mécanisme d'efflux est également exclu car aucune modification des CMI pour la réserpine n'est observée. Lorsque la souche sauvage est soumise à la ciprofloxacine, aucune souche de VCN n'est détectée mais les colonies induites acquièrent une mutation du gène *grlA*, puis une mutation additionnelle dans le gène *gyrA* au décours du deuxième niveau de sélection. D'après l'auteur, ces résultats suggèrent d'une part que l'apparition de VCN est liée à la structure chimique de la fluoroquinolone utilisée et d'autre part que les variants sélectionnés sous pazufloxacin ne sont pas des résistants de haut niveau, et seraient donc susceptibles d'être éliminés in vivo, alors que des fluoroquinolones comme la ciprofloxacine, bien que ne donnant pas de VCN sélectionnerait des souches hautement résistantes. Selon cette étude, la lévofloxacine se comporterait de façon équivalente à la pazufloxacin.

Une troisième étude (Pan et al, 2002) montre que contrairement à ce qui est décrit pour une souche de *S. aureus* sauvage, la première cible d'action sous sparfloxacine serait la mutation de l'ADN gyrase après deux niveaux de sélection, et non la topoisomérase IV.

L'acquisition in vivo de plusieurs mécanismes de résistance aux fluoroquinolones a été retrouvée sur une souche de VCN de *S. aureus* provenant d'un patient traité par péfloxacine (durée non précisée) pour une pseudarthrose

septique du tibia. Cette souche, méticilline sensible, avec une CMI à la ciprofloxacine à 32 mg/L présente une mutation dans le gène *gyrA* (aboutissant à une substitution sérine→leucine sur le codon 84) ainsi qu'un efflux NorA révélé par une diminution de l'accumulation de norfloxacine. La localisation au sein des cellules hôtes les exposerait à des concentrations subinhibitrices d'antibiotique (Sadowska et al, 2002).

#### IV.7- Approche thérapeutique des variants colonies naines

La persistance intracellulaire des souches variantes et leur résistance à certains antibiotiques rendent aléatoire l'assurance d'un succès thérapeutique.

L'antibiothérapie en cas d'infections à VCN n'est pas codifiée et se heurte aux difficultés de détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques.

L'association de triméthoprime- sulfaméthoxazole et de rifampicine semblait être la combinaison la plus efficace sur un modèle in vitro de culture de cellules endothéliales. Des cas rapportés de VCN résistants à la méticilline font appel à la vancomycine associée à la rifampicine (Kipp et al, 2003)

La restauration de la sensibilité des variants colonies naines par supplémentation, a ouvert la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique.

L'addition de vitamine K (forme isoprénylée de la ménadione) à une antibiothérapie standard s'est avérée efficace au cours d'une arthrite septique à VCN de *S.aureus* (Spearman et al, 1996) et une bactériémie à *S. aureus* VCN en échec thérapeutique pendant 16 semaines. Elle pourrait réduire l'incidence des VCN et prévenir leur pénétration cellulaire, responsable de la chronicité de l'infection (Proctor et al, 1995). Elle trouverait son intérêt dans les infections endovasculaires ou osseuses qui requièrent une antibiothérapie prolongée (Proctor, Kahl et al, 1998)

## **ETUDE EXPERIMENTALE**

### I- Etude in vitro

#### I.1- Matériel et méthodes

##### I.1.1- Choix des souches de *S.aureus*

Deux souches de *S.aureus* issues de la collection du laboratoire de Bactériologie du CHU de Nantes de *S.aureus* ont été sélectionnées pour permettre l'étude in vitro des variants colonies naines après exposition à la gentamicine et à l'ofloxacine. Elles ont été choisies pour leur sensibilité aux antibiotiques et leurs caractères cultureux de pigmentation et d'hémolyse.

La souche P1 est une souche de *S. aureus* identifiée en 2003 d'un liquide articulaire prélevé pour un sepsis sur prothèse de genou.

La souche P2 correspond à une souche de *S.aureus* identifiée en 2002 dans un prélèvement de tissu per- opératoire d'un sepsis de prothèse de genou.

L'identification des souches P1 et P2 a été vérifiée après obtention d'une culture pure sur gélose au sang de cheval (bioMérieux) par les tests suivants : catalase, Pastorex Staph Plus (Sanofi Diagnostics Pasteur), coagulase libre, ID-GPC Vitek2 (bioMérieux). L'antibiogramme a été vérifié sur l'automate Vitek2.

Une souche témoin présentant un phénotype de variant, issue d'un prélèvement de crachat d'un patient mucoviscidosique a été retenue en parallèle.

La sensibilité de ces souches aux antibiotiques est la suivante:

**Tableau 6: Antibiogramme de la souche P1.**

<b>ANTIBIOTIQUES</b>	<b>INTERPRETATION</b>	<b>CMI</b>
<b>Pénicillines</b>		
Benzylpénicilline	résistant	0,25 mg/L
Oxacilline	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Glycopeptides</b>		
Vancomycine	sensible	< 1 mg/L
Teicoplanine	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Quinolones</b>		
Ofloxacine	sensible	< 0,5 mg/L
Norfloxacine	sensible	0,5 mg/L
<b>Aminosides</b>		
Kanamycine	sensible	< 8 mg/L
Tobramycine	sensible	< 4 mg/L
Gentamicine	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Macrolides Lincosamides Synergistines</b>		
Erythromycine	sensible	< 0,25 mg/L
Lincomycine	sensible	< 2 mg/L
Clindamycine	sensible	< 0,25 mg/L
Pristinamycine	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Autres antibiotiques</b>		
Tétracycline	sensible	< 1 mg/L
Minocycline	sensible	< 4 mg/L
Fosfomycine	sensible	< 8 mg/L
Acide fusidique	sensible	< 0,5 mg/L
Rifampicine	sensible	< 0,5 mg/L
Nitrofuranes	sensible	32 mg/L
Cotrimoxazole	sensible	< 10 mg/L

**Tableau 7 : Antibiogramme de la souche P2.**

<b>ANTIBIOTIQUES</b>	<b>INTERPRETATION</b>	<b>CMI</b>
<b>Pénicillines</b>		
Benzylpénicilline	résistant	0,25 mg/L
Oxacilline	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Glycopeptides</b>		
Vancomycine	sensible	< 1 mg/L
Teicoplanine	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Quinolones</b>		
Ofloxacine	sensible	< 0,5 mg/L
Norfloxacine	sensible	1 mg/L
<b>Aminosides</b>		
Kanamycine	sensible	< 8 mg/L
Tobramycine	sensible	< 4 mg/L
Gentamicine	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Macrolides Lincosamides Synergistines</b>		
Erythromycine	sensible	< 0,25 mg/L
Lincomycine	sensible	< 2 mg/L
Clindamycine	sensible	< 0,25 mg/L
Pristinamycine	sensible	< 0,5 mg/L
<b>Autres antibiotiques</b>		
Tétracycline	sensible	< 1 mg/L
Minocycline	sensible	< 4 mg/L
Fosfomycine	sensible	16 mg/L
Acide fusidique	sensible	< 0,5 mg/L
Rifampicine	sensible	< 0,5 mg/L
Nitrofuranes	sensible	< 16 mg/L
Cotrimoxazole	sensible	< 10 mg/L

### I.1.2- Sélection in vitro

Les souches ont été ensemencées avec un inoculum à  $10^8$  CFU/ml dans un bouillon cœur- cervelle (BCC), additionné respectivement de gentamicine, pour la souche P1 et d'ofloxacin pour la souche P2, à la concentration de  $1\mu\text{g/ml}$  (Annexe 1). Les bouillons ont été incubés 24 heures à  $37^\circ\text{C}$  en aérobiose.

Dans un second temps, 1 ml de BCC a été repris et repiqué sur des géloses Mueller-Hinton (MH) et Trypsine-soja (TS) et incubées à  $37^\circ\text{C}$  en aérobiose.

Les réisolements successifs de VCN obtenus, V1 (VCN sélectionné sous gentamicine) et V2 (VCN sélectionné sous ofloxacin) ont été effectués sur le même milieu que celui ayant permis la sélection initiale, jusqu'à l'obtention de mutants stables.

### I.1.3- Caractères cultureux

Les variants à colonies naines V1, V2 et la souche témoin ont été ensemencés sur 6 milieux et incubés sous 3 atmosphères différentes à  $37^\circ\text{C}$ .

**Tableau 8 : Conditions d'observations des caractères cultureux des VCN.**

<b>TYPE DE GELOSE</b>	<b>ATMOSPHERE D'INCUBATION</b>
Trypsine- soja (bioMérieux)	Aérobiose
Mueller- Hinton (bioMérieux)	Aérobiose
Chapman (Biorad)	Aérobiose
Trypsine- soja à 5% de sang de cheval (bioMérieux)	Aérobiose Sous 5% de CO <sub>2</sub> Anaérobiose
Schaedler (bioMérieux)	Aérobiose Sous 5% de CO <sub>2</sub> Anaérobiose
Chocolat (Polyvitex Oxoid)	Aérobiose Sous 5% de CO <sub>2</sub> Anaérobiose

#### I.1.4- méthodes d'identification

Les VCN ont été identifiées en utilisant les tests de la catalase, de la coagulase libre (plasma de lapin STAHL- ASE, bioMérieux), l'ID-GPC Vitek2 et la galerie ID-32Staph.

#### I.1.5- Tests d'auxotrophisme

Ce test a été pratiqué sur gélose Mueller-Hinton à partir d'un inoculum à 10<sup>4</sup> CFU/mlensemencé par inondation. La durée de l'incubation (aérobiose à 37°C) était de 48 heures. Les disques de complémententation ont été imprégnés par 15 µl des solutions suivantes :

**Tableau 9 : Composés utilisés pour les tests d'auxotrophisme**

COMPOSES	REFERENCE	CONCENTRATIONS
Adénine hydrochloride	Sigma réf A8751	10µg/ml- 20µg/ml- 30µg/ml
L-cystéine hydrochloride	Acros Organics lot A014131601	10µg/ml- 20µg/ml- 30µg/ml
Hémin	Sigma réf H5533	1µg/ml-2µg/ml-5µg/ml- 50µg/ml-100µg/ml- 200µg/ml
Thiamine hydrochloride	Sigma réf T4625	10µg/ml- 20µg/ml- 30µg/ml 50µg/ml-100µg/ml- 200µg/ml-500µg/ml- 1mg/ml
Thymidine	Sigma réf T9250	100µg/ml-500µg/ml- 1mg/ml-2mg/ml
Ménadione sodium bisulfite	Sigma réf M5750	2µg/ml-5µg/ml- 10µg/ml-50µg/ml- 100µg/ml-200µg/ml- 500µg/ml-1mg/ml

#### I.1.6- Sensibilité aux antibiotiques

Elle a été déterminée par 3 méthodes, un antibiogramme automatisé sur Vitek2, la méthode en diffusion par disques imprégnés d'antibiotiques suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie et enfin la méthode par dilution sur milieu solide de Mueller-Hinton (Annexe 1). L'ensemencement est réalisé avec l'appareil de Steers, avec une suspension finale à  $10^5$  CFU/ml

La souche de *S.aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme témoin.

Concernant cette dernière technique le choix des antibiotiques testés a été défini en fonction des résistances décrites avec les VCN, des indications potentielles dans le traitement des infections ostéo- articulaires et en fonction des disponibilités des produits.

**Tableau 10 : Antibiotiques testés par la méthode en dilution sur milieu solide.**

<b>ANTIBIOTIQUE</b>	<b>GAMME DE CONCENTRATIONS FINALES</b>
Kanamycine	[0,125-16 mg/L]
Tobramycine	[0,125-16 mg/L]
Gentamicine	[0,125-16 mg/L]
Ofloxacine	[0,25-16 mg/L]
Péfloxacine	[0,25-16 mg/L]
Norfloxacine	[0,25-16 mg/L]
Ciprofloxacine	[0,25-16 mg/L]
Rifampicine	[0,015-16 mg/L]
Pristinamycine	[0,06 -16 mg/L]
Vancomycine	[0,125-16 mg/L]
Teicoplanine	[0,125-16 mg/L]

#### I.1.7- Etude de la clonalité

Les ADN des isolats de souches parentales et variantes ont été extraits et comparés par électrophorèse en champs pulsé (PFGE) après macrorestriction par l'enzyme *smaI*. A partir des profils obtenus, un dendrogramme a été construit à l'aide du logiciel Gel Compar (Applied Maths, Belgique) en utilisant les indices de Dice et la technique de clustérisation UPGMA (Unweighted Pair Group

Method with Arithmetic Average). L'application des critères de Tenover (Tenover FC et al, 1995) a permis l'interprétation des profils obtenus.

## I.2- Résultats

### I.2.1- Obtention de variants colonies naines

#### → Souche P1

Les réisolements sur géloses MH et TS à partir du bouillon cœur-cerveille contenant de l'ofloxacin à 1 mg/L n'ont pas permis d'obtenir des variants colonies naines. Le réisolement du BCC contenant de la gentamicine sur gélose TS n'a pas mis en évidence de VCN. Seul le repiquage du BCC avec gentamicine sur gélose MH a permis d'obtenir des colonies naines, stables après 2 subcultures. Cette souche a été dénommée V1.

#### → Souche P2

Les réisolements du bouillon contenant de la gentamicine ont été des échecs à la fois sur gélose MH et TS. Le bouillon à l'ofloxacin réisolé sur MH a conduit à l'apparition de deux types de colonies, l'une de phénotype normal pour un *S. aureus*, l'autre évoquant une VCN. Cependant, l'obtention d'une culture pure de petites colonies sur gélose MH a nécessité 14 repiquages, indiquant le caractère instable de ce mutant. Aucun VCN n'a pu être obtenu sur gélose TS.

Au total, la souche P1 sous l'action de la gentamicine a donné un variant V1 stable sur gélose MH. La souche P2 a permis d'obtenir un variant V2 sous ofloxacin, poussant sur MH, mais restant instable en subculture, rendant difficile l'obtention de culture pure, nécessaire à sa caractérisation.

## I.2.2- Caractères cultureux

**Tableau 11: Aspect des variants colonies naines sélectionnés in vitro et de la souche témoin.**

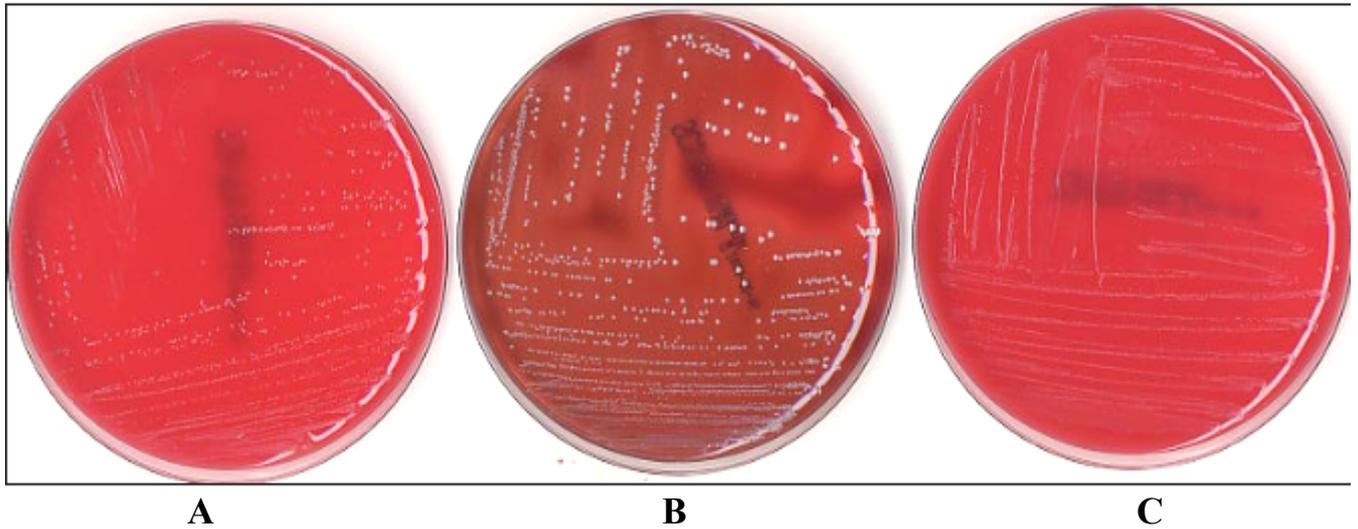
MILIEUX ET ATMOSPHERE D'INCUBATION		SOUCHE TEMOIN	SOUCHE V1 (variant gentamicine)	SOUCHE V2 (variant ofloxacine)
TS	Aérobiose	VCN	VCN	VCN
MH	Aérobiose	Absence de subculture	VCN	VCN
Chapman	Aérobiose	Absence de subculture	VCN mannitol négatif	Absence de subculture
TS sang	Aérobiose	VCN	VCN	VCN instable
	CO <sub>2</sub>	VCN	VCN	VCN instable
	Anaérobiose	VCN	VCN	VCN instable
Schaedler	Aérobiose	Grosse colonie*	Grosse colonie	Grosse colonie
	CO <sub>2</sub>	Grosse colonie	Grosse colonie	Grosse colonie
	Anaérobiose	Grosse colonie	Grosse colonie	Grosse colonie
Chocolat	Aérobiose	VCN	Grosse colonie	Grosse colonie
	CO <sub>2</sub>	VCN	Grosse colonie	Grosse colonie
	Anaérobiose	VCN	Grosse colonie	Grosse colonie

\* : Aspect morphomogique de souche parentale

Les trois souches conservent l'aspect de VCN non pigmentées, non hémolytiques sur gélose au sang de cheval et retrouvent toutes le phénotype de *S. aureus* habituel sur gélose Schaedler. La gélose Chocolat supplémente également les variants sélectionnés sous gentamicine et ofloxacine. L'atmosphère d'incubation n'influence pas la réversion des VCN. Le milieu Chapman n'est pas contributif à l'orientation diagnostique des VCN puisqu'il ne permet pas la croissance des colonies ou ne montre pas de fermentation du mannitol. Les VCN poussent sur gélose MH à l'exception de la souche témoin, ce qui ne permettra pas de tester la sensibilité aux antibiotiques selon les conditions usuelles.

**Figure 7 : Souche témoin sur gélose TS sang (A), sur gélose Schaedler (B).**

**Les colonies revertantes obtenues sur gélose Schaedler reprennent le phénotype de VCN lorsqu'elles sont repiquées sur gélose TS sang (C).**



### I.2.3- Identification

→ La souche témoin

La catalase est positive ainsi que la coagulase libre. L'ID- GPC Vitek2 donne une identification de *S. aureus*. La galerie Api 32Staph en revanche ne parvient pas à identifier la souche et donne un profil douteux avec en premier choix *S. chromogenes* et *S. aureus* en seconde proposition.

→ La souche V1

La catalase et la coagulase libre sont positives sans ambiguïté.

L'ID-GPC Vitek2 rend une discrimination basse avec deux choix, *S. hyicus* et *S. aureus*. La galerie Api 32Staph donne deux choix possibles *S. chromogenes* et *S. capitis*.

→ La souche V2

La catalase est positive et la coagulase libre l'est en 24 heures.

Vitek2 parvient à identifier l'espèce *S.aureus*.

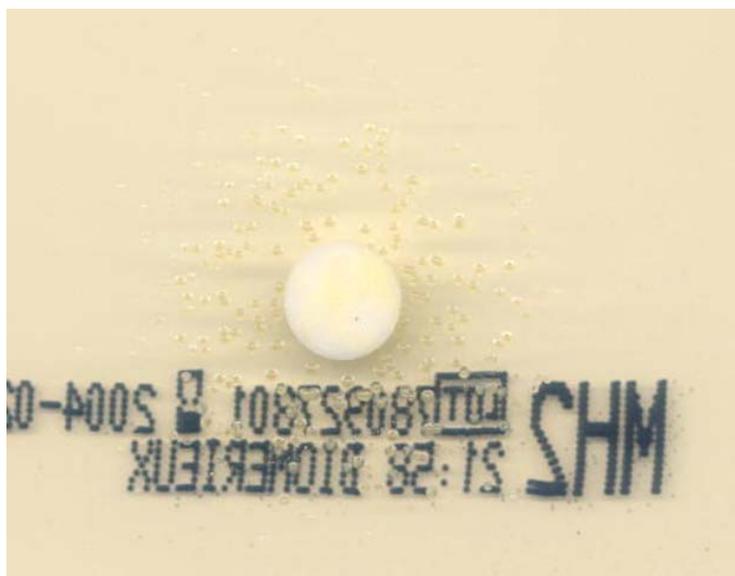
La galerie Api 32Staph ne parvient pas à rendre d'identification (galerie ininterprétable).

#### I.2.4- Tests d'auxotrophisme

→ La souche témoin

La souche témoin qui provenait d'un patient atteint de mucoviscidose s'est avérée auxotrophe pour la thymidine. Bien que ne poussant pas sur gélose Mueller-Hinton, l'apport de thymidine a permis la croissance de colonies. La concentration minimale permettant la supplémentation était de 500 µg/ml. Les colonies ainsi obtenues étaient cependant à la limite de la visibilité. Des concentrations supérieures à 1 mg/ml et 2 mg/ml ont optimisées le test.

**Figure 8: Souche témoin supplémentée avec un disque de thymidine à 2 mg/ml**



→ La souche V1

Elle est supplémentée par un disque de thiamine concentrée à 200 µg/ml.

Cette souche, contrairement au témoin, pousse sur gélose MH avec un phénotype de VCN. La détection des colonies révertantes se fait alors au contact du disque.

→ La souche V2

Elle est également auxotrophe pour la thiamine et les colonies de phénotype normal apparaissent pour une concentration de 100 µg/ml.

Ce variant étant particulièrement instable, certaines colonies reversent spontanément rendant la zone de délimitation autour du disque beaucoup moins nette.

#### I.2.5- Sensibilité aux antibiotiques

→ La souche témoin

**Tableau 12: Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques : Souche témoin.**

ANTIBIOTIQUE	VITEK2 (CMI en mg/L)	DILUTION (CMI en mg/L)	DIFFUSION (diamètre critique en mm)	INTERPRETATION
<b>PENICILLINES</b>				
Benzylpénicilline	> 0,5	*	07	Résistant
Oxacilline	**	*	28	Sensible
<b>GLYCOPEPTIDES</b>				
Vancomycine	< 1	*	23	Sensible
Teicoplanine	< 0,5	*	22	Sensible
<b>QUINOLONES</b>				
Ofloxacine	1	*	*	Sensible
Péfloxacin	*	*	22	Sensible
Lévofloxacine	*	*	24	Sensible
Moxifloxacine	*	*	25	Sensible
<b>AMINOSIDES</b>				
Kanamycine	<b>8</b>	*	<b>10</b>	<b>Résistant</b>
Tobramycine	<b>1</b>	*	<b>12</b>	<b>Résistant</b>
Gentamicine	<b>1</b>	*	<b>12</b>	<b>Résistant</b>
<b>MACROLIDES LINCOSAMIDES SYNERGISTINES</b>				
Erythromycine	< 0,25	*	28	Sensible
Lincomycine	< 1	*	32	Sensible
Pristinamycine	< 0,5	*	31	Sensible
<b>AUTRES ANTIBIOTIQUES</b>				
Tétracycline	*	*	30	Sensible
Fosfomycine	< 8	*	32	Sensible
Minocycline	**	*	*	*
Acide fusidique	< 0.5	*	24	Sensible
Rifampicine	< 0,5	*	33	Sensible
Nitrofuranes	< 16	*	21	Sensible
Cotrimoxazole	< <b>10</b>	*	<b>06</b>	<b>Résistant</b>

\* : Non déterminée par cette technique.

\*\* : Absence de résultat par défaut de croissance

L'antibiogramme automatisé sur vitek2 n'est pas complet en raison d'une croissance insuffisante dans plusieurs puits (oxacilline, minocycline).

De plus en comparant le profil rendu par le laboratoire, des résistances aux aminosides et au trimethoprime-sulfaméthoxazole ne sont pas détectées. Les CMI rendues par le Vitek2 sont de 8 mg/L (catégorie résistant) pour la kanamycine, de 1 mg/L pour la gentamicine et la tobramycine (catégorie sensible), alors que les diamètres critiques montrent un phénotype de résistance aux aminosides de type KTG. De même, la CMI du trimethoprime-sulfaméthoxazole est rendue inférieure à 10 mg/L alors que la souche est résistante contact sur l'antibiogramme manuel. La souche ne poussant pas sur Mueller- Hinton l'antibiogramme par diffusion de disques imprégnés d'antibiotiques a été réalisée sur gélose TS sang incubée en aérobiose à 37°C et sur gélose Schaedler incubée sous CO<sub>2</sub>. Les résultats sont comparables entre les deux milieux. En raison de l'absence de croissance sur gélose MH, les CMI par dilution en milieu solide n'ont pu être effectuées.

→ La souche V1

**Tableau 23 : Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V1**

ANTIBIOTIQUE	VITEK2 (CMI en mg/L)	DILUTION (CMI en mg/L)	DIFFUSION (diamètre critique en mm)	INTERPRETATION
<b>PENICILLINES</b>				
Benzylpénicilline	> 0,5	*	08	Résistant
Oxacilline	**	*	26	Sensible
<b>GLYCOPEPTIDES</b>				
Vancomycine	< 1	1	25	Sensible
Teicoplanine	< 0,5	0,5	23	Sensible
<b>QUINOLONES</b>				
Ofloxacin	< 0,5	0,25	*	Sensible
Péfloxacin	*	0,5	31	Sensible
Norfloxacin	*	< 0,25	*	Sensible
Ciprofloxacine	*	< 0,25	*	Sensible
Lévofloxacine	*	*	34	Sensible
Moxifloxacine	*	*	35	Sensible
<b>AMINOSIDES</b>				
Kanamycine	< 4	1	20	Sensible
Tobramycine	< 1	2	18	Sensible
Gentamicine	1	0,25	19	Sensible
<b>MACROLIDES LINCOSAMIDES SYNERGISTINES</b>				
Erythromycine	< 0,25	*	32	Sensible
Lincomycine	< 1	*	30	Sensible
Pristinamycine	< 0,5	0,25	31	Sensible
<b>AUTRES ANTIBIOTIQUES</b>				
Tétracycline	*	*	30	Sensible
Fosfomycine	< 8	*	31	Sensible
Minocycline	**	*	*	
Acide fusidique	< 0,5	*	23	Sensible
Rifampicine	< 0,5	< 0,015	31	Sensible
Nitrofuranes	32	*	27	Sensible
Cotrimoxazole	< 10	*	26	Sensible

\* : Non déterminée par cette technique.

\*\* : Absence de résultat par défaut de croissance.

Comme pour la souche témoin, l'antibiogramme automatisé sur vitek2 n'est pas complet en raison d'une croissance insuffisante dans le puit testant l'oxacilline et la minocycline. L'antibiogramme sur Vitek2 est identique à celui de la souche parentale P1 (voir tableau 3). La méthode en diffusion sur gélose MH donne le même résultat. La CMI à la gentamicine en dilution est multipliée par 2, mais reste sensible.

**Tableau 14: Comparaison des CMI par la méthode en dilution sur milieu solide des souches P1 et du variant V1 sélectionné sous gentamicine**

<b>ANTIBIOTIQUE</b>	<b>SOUCHE P1 (CMI en mg/L)</b>	<b>SOUCHE V1 (CMI en mg/L)</b>
Kanamycine	1	1
Tobramycine	2	2
<b>Gentamicine</b>	<b>&lt; 0,125</b>	<b>0,25</b>
Ofloxacine	0,25	0,25
Pefloxacine	0,5	0,5
Norfloxacine	0,5	0,5
Ciprofloxacine	< 0,25	< 0, 25
Rifampicine	< 0,015	< 0,015
Pristinamycine	0,25	0,25
Vancomycine	1	1
Teicoplanine	0,5	0,5

→ La souche V2

**Tableau 15: Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V2.**

ANTIBIOTIQUE	VITEK2 (CMI en mg/L)	DILUTION (CMI en mg/L)	DIFFUSION (diamètre critique en mm)	INTERPRETATION
<b>PENICILLINES</b>				
Benzylpénicilline	> 0,5	*	07	Résistant
Oxacilline	< 0,5	*	24	Sensible
<b>GLYCOPEPTIDES</b>				
Vancomycine	< 1	0,25	27	Sensible
Teicoplanine	< 0,5	0,125	28	Sensible
<b>QUINOLONES</b>				
<b>Ofloxacin</b>	<b>&lt; 0,5</b>	<b>0.25</b>	*	Sensible
Péfloxacin	*	< 0,25	32	Sensible
Norfloxacin	*	< 0,25	*	Sensible
Ciprofloxacine	*	< 0,25	*	Sensible
Lévofloxacine	*	*	33	Sensible
Moxifloxacine	*	*	32	Sensible
<b>AMINOSIDES</b>				
Kanamycine	< 4	< 0,125	21	Sensible
Tobramycine	< 1	1	23	Sensible
Gentamicine	< 0,5	< 0,125	22	Sensible
<b>MACROLIDES LINCOSAMIDES SYNERGISTINES</b>				
Erythromycine	< 0,25	*	33	Sensible
Lincomycine	< 1	*	32	Sensible
Pristinamycine	< 0,5	0,125	31	Sensible
<b>AUTRES ANTIBIOTIQUES</b>				
Tétracycline	*	*	30	Sensible
Fosfomycine	16	*	30	Sensible
Minocycline	< 0,5	*	*	Sensible
Acide fusidique	< 0.5	*	29	Sensible
Rifampicine	< 0,5	< 0,015	29	Sensible
Nitrofuranes	<16	*	28	Sensible
Cotrimoxazole	< 10	*	31	Sensible

\* : Non déterminée par cette technique.

Les trois techniques montrent des résultats similaires. Aucune anomalie de croissance dans les puits de screening du Vitek2 n'a été détectée. Le variant V2 ne présente pas de modification de CMI à l'ofloxacine.

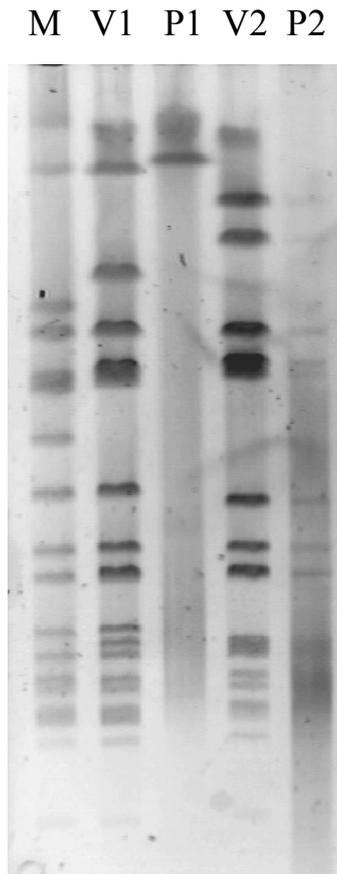
**Tableau 16 : Comparaison des CMI par la méthode en dilution sur milieu solide des souches P2 et du variant V2 sélectionné sous ofloxacine.**

<b>ANTIBIOTIQUE</b>	<b>SOUCHE P2 (CMI en mg/L)</b>	<b>SOUCHE V2 (CMI en mg/L)</b>
Kanamycine	< 0,125	< 0,125
Tobramycine	2	1
Gentamicine	< 0,125	< 0,125
<b>Ofloxacine</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>
Pefloxacine	1	0,5
Norfloxacine	1	0,5
Ciprofloxacine	0,25	< 0,25
Rifampicine	< 0,015	< 0,015
Pristinamycine	0,5	0,125
Vancomycine	1	1
Teicoplanine	1	0,5

### I.2.6- Etude de la clonalité

Les souches V1 et V2 et leurs souches parentales P1 et P2 ont été comparées en électrophorèse par champs pulsé afin de vérifier le caractère isogénique.

**Figure 9 : Profils électrophorétiques des VCN sélectionnées in vitro**



(M : marqueur de taille)

Un problème dans l'extraction de la souche P1 ne permet pas de conclure.  
Le profil des souches P2 et V2, bien qu'altéré pour P2, est identique.

## II- Etude in vivo

### II.1- Matériel et méthodes

#### II.1.1- Recueil des prélèvements

Des prélèvements de tissus per-opératoires provenant des services de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique du CHU de Nantes ont été congelés après avoir été techniques au laboratoire de Bactériologie. Les prélèvements donnant lieu à une culture positive à *S. aureus* ou à staphylocoques coagulase négative et correspondant à un sepsis ostéo- articulaire avéré cliniquement ont été retenus pour l'étude. Un cas de VCN diagnostiqué au laboratoire chez un patient hospitalisé en neurochirurgie, à l'hôpital Laennec de Nantes a été inclus.

#### II.1.2- Ensemencements des prélèvements

La méthode définie pour ce travail s'est inspirée des pratiques utilisées dans les laboratoires de bactériologie du CHU de Nice (Dr Carles D ; Dr Sicard D) et er du groupe hospitalier Diaconesses- Croix- Saint- Simon (Dr Desplaces N).

Les prélèvements de tissus osseux sont préalablement broyés par action mécanique (1 à 2 minutes ; vitesse [18000 et 22000 rpm]).

Chaque prélèvement bénéficie d'un examen direct par coloration de Gram.

Deux examens directs sont réalisés pour les tissus osseux, avant broyage par apposition sur lame flambée stérile et après broyage. Les prélèvements sont ensemencés sur gélose TS sang en aérobiose et sous CO<sub>2</sub>, sur gélose Chocolat mise sous CO<sub>2</sub> et sur Schaedler en anaérobie. Ils sont également ensemencés en milieux liquides dans un bouillon cœur-cerveille (BCC) incubé à 37°C et un bouillon Schaedler (BANA) en anaérobiose à 37°C. Ces bouillons sont repiqués systématiquement à J5, J10, J15 et J21. Le BCC est repiqué sur deux géloses TS au sang, l'une en aérobiose l'autre sous CO<sub>2</sub>. Le BANA est repiqué sur une

gélose Schaedler incubée en anaérobiose et une gélose chocolat sous CO<sub>2</sub>. Tous les milieux solides sont conservée 10 jours et observées toutes les 48 heures.

### II.1.3- Caractérisation des VCN

Les colonies suspectes de correspondre à un VCN seront réisolées en parallèle sur gélose TS sang en aérobiose à 37°C, sur Schaedler en anaérobiose et sous 5% de CO<sub>2</sub>. La démarche consistant à déterminer les caractères cultureux, l'identification, l'auxotrophisme, la sensibilité aux antibiotiques et le typage en champs pulsé sera identique à celle utilisée dans l'étude in vitro.

### II.1.4- Données cliniques des patients sélectionnés pour l'étude in vivo.

Dix neuf patients ont été inclus dans l'étude entre octobre 2003 et juillet 2004.

Les données cliniques sont résumées dans les tableaux 20 et 21.

**Tableau 17 : Indications chirurgicales concernant les 19 patients.**

CAS	AGE	SEXE	INDICATION	INTERVENTION CHIRURGICALE
N°1	96	F	Fracture cervicale fémorale droite	Arthroplastie de type Moore <sup>(1)</sup>
N°2	24	M	Fracture fémorale droite <sup>(2)</sup>	Enclouage centro-médullaire
N°3	71	F	Changement de cotyle sur prothèse totale de hanche (PTH) gauche	Fémorotomie avec changement de prothèse
N°4	42	M	Arthrose fémoro- tibiale interne du genou droit <sup>(3)</sup>	Ostéotomie tibiale de valgisation
N°5	69	M	Fracture cervicale fémorale gauche	Arthroplastie de type intermédiaire
N°6	57	M	Fracture fermée épiphysio- métaphysaire du tibia gauche	Ostéosynthèse par fixateur externe
N°7	55	F	Fracture ouverte Cauchoix III de la jambe gauche	Ostéosynthèse par fixateur externe Lambeau de jumeau interne et de grand droit

<sup>(1)</sup>: Patiente secondairement multi- opérée : fracture du fémur droit sous la prothèse de Moore à 3 mois, cerclage et mise en place d'une prothèse intermédiaire scellée. Seconde fracture fémorale droite sur la prothèse intermédiaire à 4 mois, ostéosynthèse par plaque de fémur droit.

<sup>(2)</sup> : Antécédent d'ostéotomie d'allongement sur ce fémur.

<sup>(3)</sup> : Antécédent de ligamentoplastie du genou droit en octobre 1995.

**Tableau 17 : Indications chirurgicales concernant les 19 patients (suite)**

N°8	30	M	Fracture ouverte Cauchoix I de l'olécrâne gauche	Ostéosynthèse par haubannage
N°9	79	M	Fracture de rotule droite	Ostéosynthèse par haubannage et cerclage
N°10	42	M	Fracture ouverte Cauchoix III de la jambe droite	Ostéosynthèse par fixateur externe
N°11	82	M	Fracture trochantéro- diaphysaire du fémur droit	Ostéosynthèse par un clou centro-médullaire statique
N°12	84	F	Fracture fémorale gauche	Ostéosynthèse par un clou Gamma
N°13	54	F	Rupture d'une plaque d'OTV de genou droit	Changement de plaque et auto-greffe cortico-spongieuse
N°14	55	M	Fracture comminutive étagée de la jambe gauche	Ostéosynthèse par fixateur externe
N°15	71	M	Polyarthrite rhumatoïde	Prothèse totale de genou droit
N°16	72	M	Abcès tibial inférieur droit <sup>(4)</sup>	Curetage
N°17	75	F	Fracture du col fémoral droit	Arthroplastie totale de hanche droite
N°18	73	M	Fracture du col fémoral droit	Arthroplastie totale de hanche droite
N°19	54	M	Maladie de Parkinson	Electrodes de stimulation

<sup>(4)</sup> : Antécédent de fracture bi-malléolaire de cheville droite dans l'adolescence

**Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires. Le délai post- opératoire correspond à l'intervalle de temps entre la pose du matériel et l'obtention des prélèvements positifs inclus dans l'étude.**

CAS	INTERVENTION	Date d'implantation	DELAI	CLINIQUE	REPRISE	ANTIBIOTHERAPIE	EVOLUTION
N°1	Arthroplastie type Moore	Mars 2003	7 mois (1)	Douleur, impotence fonctionnelle Luxation de prothèse	Ablation de prothèse, résection tête et col	pristinamycine 6 semaines	Favorable
N°2	Enclouage centro-médullaire	Mars 2003	8 mois	Tuméfaction de la cicatrice, fistule	Ablation du clou	lévofloxacine et rifampicine 2 mois	Favorable
N°3	Changement de cotyle sur PTH	Octobre 2001	36 mois	Tuméfaction de la cicatrice, fistule	Changement de prothèse	lévofloxacine et rifampicine 3 mois	Favorable

(1) : Fistule depuis septembre 2003, prélèvements stériles ; ponction de hanche en novembre 2003, stérile

**Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires. Le délai post- opératoire correspond à l'intervalle de temps entre la pose du matériel et l'obtention des prélèvements positifs inclus dans l'étude (suite).**

N°4	Ostéotomie tibiale de valgisation	Novembre 2002	11 mois <sup>(2a)</sup>	Fistule	Ablation de la plaque d'OTV ciment à la gentamicine Persistance de 2 vis cassées	lévofloxacine et rifampicine 2 mois	Récidive en juillet 2004 <sup>(2b)</sup>
N°5	Arthroplastie intermédiaire	Octobre 2003	2 semaines	Désunion cutanée	Nettoyage Totalisation de la prothèse ciment à la gentalline	lévofloxacine et rifampicine 3 mois	Favorable

<sup>(2a)</sup> : Juin 2003 : premier épisode septique, placard inflammatoire et fistule avec prélèvement de liquide profond positif à *S.aureus* traité par nettoyage associé à une bithérapie par pristinamycine et acide fusidique pendant 3 mois.

<sup>(2b)</sup> : Nettoyage et ablation du ciment associé à une antibiothérapie par lévofloxacine et rifampicine. Ablation des 2 vis restantes en septembre 2004.

**Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires. Le délai post- opératoire correspond à l'intervalle de temps entre la pose du matériel et l'obtention des prélèvements positifs inclus dans l'étude (suite).**

N°6	Ostéosynthèse par fixateur externe	Octobre 2003	1 mois	Pseudarthrose septique et exposition cutanée antérieure	Changement de fixateur Lambeau de jumeau interne Comblement du defect métaphysaire par ciment à la gentamicine	ofloxacine et acide fusidique 6 mois	Favorable
N°7	Ostéosynthèse par fixateur externe Lambeau de jumeau interne et de grand droit	Mai 2003	6 mois <sup>(3)</sup>	Pseudarthrose septique fistulisée	Amputation	norfloxacine + gentamicine + oxacilline 3 mois	Amendement de l'infection

<sup>(3)</sup> : Octobre 2003 : Ablation de fixateur externe et mise en place d'une atelle postérieure de jambe. Ecoulement de plaie positif dès août 2003 à *S.aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la ticarcilline.

**Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires. Le délai post- opératoire correspond à l'intervalle de temps entre la pose du matériel et l'obtention des prélèvements positifs inclus dans l'étude (suite).**

N°8	Ostéosynthèse par haubannage	Juillet 2003	1 semaine	Ecoulement de cicatrice	Nettoyage conservation du montage	lévofloxacine et clindamycine 3 mois	Favorable
N°9	Ostéosynthèse par haubannage	2000	4 ans	Arthrite septique	Ablation de matériel	teicoplanine rifampicine 2 semaines	Décès <sup>(4)</sup>
N°10	Ostéosynthèse par fixateur	Mai 2003	8 mois <sup>(5)</sup>	Ecoulement de cicatrice	Ablation du fixateur externe	pristinamycine 2 mois	Récidive en mai 2004 <sup>(6)</sup>
N°11	Ostéosynthèse par clou Gamma	Décembre 2003	2 mois	Tuméfaction de la cicatrice, fièvre	Changement de clou	teicoplanine et rifampicine 3 mois	Favorable

<sup>(4)</sup> : Poussée de rectocolite hémorragique deux mois avant le sepsis. Altération de l'état général.

<sup>(5)</sup> : Infection à *Enterobacter cloacae* sur le lambeau de grand dentelé en juin 2003, traitée par ceftriaxone associé à l'ofloxacine pendant 3 mois.

<sup>(6)</sup> : Pseudarthrose septique traitée par greffon tricortical avec ostéosynthèse par plaque de la malléole externe. Antibiothérapie : vancomycine et rifampicine pendant 1 mois, relayée par linézolide et rifampicine 2 mois supplémentaires.

**Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires. Le délai post- opératoire correspond à l'intervalle de temps entre la pose du matériel et l'obtention des prélèvements positifs inclus dans l'étude (suite).**

N°12	Ostéosynthèse par un clou Gamma	Décembre 2003	6 mois	Désunion cutanée <sup>(7)</sup>	Ablation de vis de verrouillage	oxacilline et acide fusidique 3 mois	Favorable
N°13	Changement de plaque <sup>(8)</sup>	Juin 2003	1 semaine	Sepsis aigu	Ablation de matériel fixateur externe	lévofloxacine et rifampicine 3 mois	Favorable
N°14	Ostéosynthèse par fixateur	Mai 2003	13 mois <sup>(9)</sup>	Pseudarthrose Placard inflammatoire	Lavage Ostéosynthèse par clou de Zimmer	lévofloxacine et rifampicine 3 mois	Favorable

<sup>(7)</sup> : En mars 2004 ; Abstention pendant 3 mois.

<sup>(8)</sup> : Ostéotomie tibiale de valgisation en 2001 pour gonarthrose fémoro-tibiale interne du genou droit.

<sup>(9)</sup> : Cal vicieux de la diaphyse tibiale gauche et foyer de pseudarthrose de l'épiphyse tibiale proximale traitée par enclouage fémoro-tibial.

**Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires. Le délai post- opératoire correspond à l'intervalle de temps entre la pose du matériel et l'obtention des prélèvements positifs inclus dans l'étude (suite).**

N°15	PTG droite	?	–	Arthrite septique	Ablation de prothèse Fixateur externe	lévofloxacine et rifampicine 3 mois	Sépticémie à SASM* Récidive en octobre 2004 (10)
N°16	Abcès tibial droit	Juin 2004	?	Douleurs chroniques	Curetage Biopsies	ofloxacine et rifampicine 45 jours	Favorable

<sup>(10)</sup> : Septicémie concomitante de l'arthrite septique traitée par vancomycine et gentamicine.

Octobre 2004 : Désunion cutanée et collection purulente au niveau du genou droit faisant pratiquer un nettoyage avec remise en place du fixateur externe. Mise en évidence d'un *S. aureus* résistant à la méticilline. Antibiothérapie par teicoplanine et acide fusidique.

**Tableau 18 : Caractéristiques des sepsis ostéo- articulaires. Le délai post- opératoire correspond à l'intervalle de temps entre la pose du matériel et l'obtention des prélèvements positifs inclus dans l'étude (suite)**

N°17	Arthroplastie totale de hanche droite	Juin 2004	1 mois	Hématome Ecoulement de cicatrice	Nettoyage	teicoplanine et rifampicine 3 mois	Favorable
N°18	Arthroplastie totale de hanche droite	Juillet 2004	3 semaines	Désunion cutanée Ecoulement	Nettoyage	ofloxacine et acide fusidique 3 mois	Favorable
N°19	Electrode de stimulation sous-thalamique droite	Avril 2004	8 mois	Ecoulement	Ablation	oxacilline 15 jours	Récidive en mai 2005 <sup>(11)</sup>

<sup>(11)</sup>: Mai 2005 : Ablation de l'électrode gauche et prélèvements bactériologiques positifs avec 2 souches de *S.aureus* sensibles à la méticilline dont l'une présente l'aspect de VCN.

## II.1.5- Résultats

### II.1.5.1- Prélèvements

**Tableau 19 : PRELEVEMENTS RECUEILLIS**

<b>NATURE DU PRELEVEMENT</b>	<b>NOMBRE</b>
Tissu osseux et au contact du matériel	32
Prélèvement sous- aponévrotique	9
Capsule	1
Synoviale	2
Liquide articulaire	6
Liquide de collection profonde	8
Prélèvement sous- cutané	7
Liquide d'écoulement superficiel	3
<b>TOTAL</b>	<b>68</b>

**Tableau 20 : RESULTATS DES EXAMENS DIRECTS**

<b>Nature du prélèvement</b>	<b>Examen direct positif</b>	<b>Examen direct négatif</b>	<b>Total</b>
Tissus	8	24	32
	Apposition : 3		
	Broyage : 5		
Sous- aponévrotique	0	9	9
Capsule	0	1	1
Synoviale	0	2	2
Liquide articulaire	3	2	5*
Liquide de collection profonde	3	5	8
Sous- cutané	4	3	7
Liquide d'écoulement superficiel	2	1	3

\*Quantité insuffisante pour l'un des 6 liquides.

Concernant les tissus, les examens directs ont été effectués par apposition puis sur le recueil du broyage. Sur les 8 examens positifs, 3 faits par apposition l'étaient également. Il s'agissait de 3 tissus prélevés au contact du matériel.

**Tableau 21 : RESULTATS DES CULTURES**

Cas	Prélèvements positifs	Examen direct	Espèce	Résistances	Présence de VCN
N°1	6/6	1 LA (-) 5 tissus (-)	<i>S. epidermidis</i>	Méticilline FQ <sup>(1)</sup> / KTG <sup>(2)</sup>	Non
N°2	4/5	4 tissus (-) 1 sous-apo (-)	<i>S. capitis</i>	Méticilline Fosfomycine	Non
N°3	4/5	3 tissus (-) 1 capsule (-) 1 sous-cut (-)	<i>S. epidermidis</i>	Méticilline MLSBi <sup>(3)</sup>	Non
N°4	4/4 <sup>(*)</sup>	2 tissus (-) 1 tissu (+) 1 LCP (+)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM <sup>(4)</sup>	<b>Oui</b>
N°5	3/3	1 sous-cut (-)	<i>S. aureus</i>	SASM	Non
		1 sous-apo (-) 1 synoviale (-)	<i>S. capitis</i>	Méticilline/ KT Fosfomycine	
N°6	3/3	2 sous-cut (+) 1 LCS (+)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	Non
N°7	3/3	3 tissus (+)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	Non
N°8	3/3	2 LCS (-) 1 LCP (-)	<i>S. aureus</i>	SASM MLSBi	Non
N°9	3/3	2 LCP (+) 1 tissu (+)	<i>S. aureus</i>	SARM <sup>(5)</sup> FQ/ KT/ LSA <sup>(6)</sup>	Non
N°10	3/3	3 LCP (-)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	Non
N°11	4/4	2 tissus (-) 1 sous-cut (-) 1 sous-apo (-)	<i>S. aureus</i>	SARM/ FQ/ KT MLSBc <sup>(7)</sup> Pristinamycine	Non
N°12	2/2	2 tissus (-)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	Non
N°13	4/4	3 tissus (+) 1 tissu (-)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM MLSBi	Non

**Tableau 21 : RESULTATS DES CULTURES (suite).**

N°14	6/6	1 LA (-) 1 sous-cut (-) 3 sous-apo (-) 1 tissu (-)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	Non
N°15	4/4	3 LA (+) 1 synoviale (-)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM MLSBi	Non
N°16	2/2	1 LCP (+) 1 tissu (-)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	Non
N°17	4/4	1 sous-cut (-) 1 sous-apo (-) 2 tissus (-)	<i>S. aureus</i>	SARM/ FQ/ KT	Non
N°18	4/4	1 LA (-) 2 sous-apo (-) 1 tissu (-)	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	Non
N°19	1	Non réalisé	<i>S. aureus</i>	Penicilline G SASM	<b>Oui</b>

<sup>(1)</sup> : Fluoroquinolones

<sup>(2)</sup> : Kanamycine, Tobramycine, Gentamicine

<sup>(3)</sup> : Phénotype de résistance touchant l'érythromycine.

<sup>(4)</sup> : *S. aureus* sensible à la méticilline

<sup>(5)</sup> : *S. aureus* résistant à la méticilline

<sup>(6)</sup> : Phénotype de résistance touchant la lincomycine, la clindamycine, la pristinamycine

<sup>(7)</sup> : Phénotype de résistance touchant l'érythromycine, la lincomycine, la clindamycine, la quinupristine.

<sup>(\*)</sup> : sur les 4 prélèvements, 2 ont été prélevés en octobre 2003 et les 2 autres en juillet 2004.

-LA : liquide articulaire.

-LCS : liquide de collection superficielle.

-LCP : liquide de collection profonde.

-Sous-cut : prélèvement sous-cutané.

-Sous-apo : prélèvement sous-aponévrotique.

### II.1.5.2- Caractéristiques des variants in vivo

Considérant strictement les prélèvements de chirurgie orthopédique et traumatologique, 68 prélèvements ont étéensemencés.

Des variants colonies naines ont été détectées chez deux patients :

→ Pour le cas n° 4, la souche dénommée V4 a été isolée sur l'un des prélèvements d'octobre 2003 sur la gélose Schaedler ensemencée à J0 (« gélose de départ »). Secondairement elle a été retrouvée à partir des bouillons anaérobies repiqués à J15 et J21 sur gélose Schaedler et Chocolat.

Elle a été suspectée sur la gélose Schaedler de départ après 4 jours d'incubation sous anaérobie. Sur les géloses Schaedler et Chocolat issues des bouillons, elle a poussée en 5 jours respectivement sous anaérobie et sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Il n'a pas été détecté de VCN sur les prélèvements effectués en juillet 2004.

→ Pour le cas n° 19 correspondant à l'infection sur électrodes sous-thalamiques, la souche dénommée V19, a été isolée initialement au laboratoire à partir de la gélose TS au sang de mouton incubée sous CO<sub>2</sub>.

### II.1.5.3- Caractères culturels

Les souches V4 et V19 poussaient en culture mixte avec des souches dont l'aspect évoquait un *S. aureus* de phénotype normal. Ces colonies pigmentées et hémolytiques ont été réisolées en parallèle des mutants sur une gélose TS sang et ont été soumises à la même procédure de caractérisation que les variants, afin de vérifier l'hypothèse qu'il s'agit des souches isogéniques.

**Tableau 22 : Aspect des variants colonies naines isolées de prélèvements cliniques.**

MILIEUX ET ATMOSPHERE D'INCUBATION		SOUCHE V4	SOUCHE V19
TS	Aérobiose	VCN	VCN
MH	Aérobiose	Grosse colonie	VCN
Chapman	Aérobiose	VCN mannitol positif	VCN mannitol négatif
TS sang	Aérobiose	VCN	VCN
	CO <sub>2</sub>	VCN	VCN
	Anaérobiose	VCN	VCN
Schaedler	Aérobiose	Grosse colonie	Grosse colonie
	CO <sub>2</sub>	Grosse colonie	Grosse colonie
	Anaérobiose	Grosse colonie	Grosse colonie
Chocolat	Aérobiose	Grosse colonie	Grosse colonie
	CO <sub>2</sub>	Grosse colonie	Grosse colonie
	Anaérobiose	Grosse colonie	Grosse colonie

Outre le caractère non hémolytique et non pigmenté commun aux 2 variants, les souches V4 et V19 présentent deux morphologies différentes en culture. La souche V4 est de petite taille, inférieure à 1 mm, blanche transparente tandis que la souche V19 est plate, de taille supérieure, grise opaque.

**Figure 10: Souche V4 sur gélose TS sang en aérobie.**



**Figure 11: Souche V4 sur gélose Schaedler en anaérobie.**

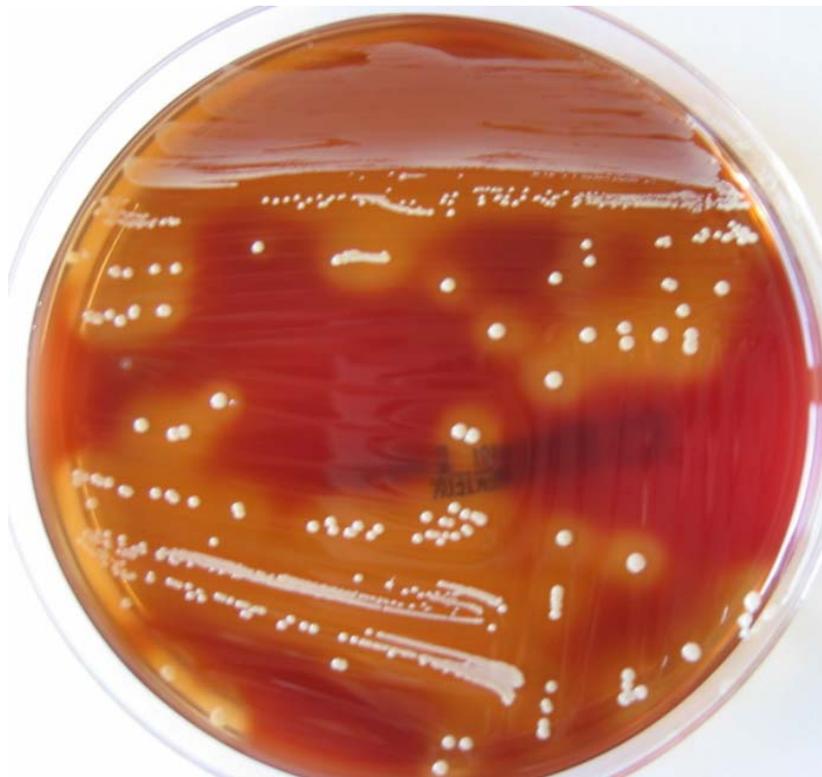


Figure 12: Souche V19 sur gélose TS sang en aérobie.



Figure 13: Souche V19 sur gélose Schaedler en anaérobie



#### II.1.5.4- Identification

##### → Souche V4

La catalase, la coagulase libre et liée sont positives.

L'identification rendue par l'ID-GPC du Vitek2 est *S. hyicus* ou *S. chromogenes*. La galerie ID 32 Staph identifie *S. aureus*.

##### → Souche V19

La catalase, le Pastorex Staph Plus sont positifs et la coagulase libre l'est en 24 heures. L'ID-GPC du Vitek2 n'est pas fiable et rend *S. epidermidis* ou *S. aureus* avec une discrimination basse. La galerie ID 32 Staph ne permet de trancher et donne *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*.

#### II.1.5.5- Tests d'auxotrophisme

##### → Souche V4

Cette souche a été supplémentée par un disque de ménadione à 10 µg/ml.

##### → Souche V19

Aucun auxotrophisme n'a pu être démontré pour cette souche.

La présence de colonies parentales réparties de façon homogène sur la gélose de supplémentation ne permettait pas de définir le type d'auxotrophisme.

#### II.1.5.6- sensibilité aux antibiotiques

→ Souche V4

**Tableau 23: Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V4.**

ANTIBIOTIQUE	VITEK2 (CMI en mg/L)	DILUTION (CMI en mg/L)	DIFFUSION (diamètre critique en mm)	INTERPRETATION
<b>PENICILLINES</b>				
Benzylpénicilline	> 0,5	*	07	Résistant
Oxacilline	< 0,5	*	29	Sensible
<b>GLYCOPEPTIDES</b>				
Vancomycine	< 1	1	27	Sensible
Teicoplanine	< 0,5	0,5	28	Sensible
<b>QUINOLONES</b>				
Ofloxacin	< 0,5	0,5	*	Sensible
Péfloxacin	*	2	26	Sensible
Norfloxacin	*	2	*	Sensible
Ciprofloxacine	*	0,5	*	Sensible
Lévofloxacine	*	*	34	Sensible
Moxifloxacine	*	*	30	Sensible
<b>AMINOSIDES</b>				
Kanamycine	< 4	2	23	Sensible
Tobramycine	< 1	4	25	Sensible
Gentamicine	< 0,5	0.25	22	Sensible
<b>MACROLIDES LINCOSAMIDES SYNERGISTINES</b>				
Erythromycine	<0,25	*	31	Sensible
Lincomycine	< 1	*	32	Sensible
Pristinamycine	< 0,5	0,5	33	Sensible
<b>AUTRES ANTIBIOTIQUES</b>				
Tétracycline	*	*	28	Sensible
Fosfomycine	<8	*	32	Sensible
Minocycline	< 0,5	*	*	Sensible
Acide fusidique	< 0,5	*	29	Sensible
Rifampicine	< 0,5	< 0,015	34	Sensible
Nitrofuranes	<16	*	28	Sensible
Cotrimoxazole	< 10	*	33	Sensible

\* : Non déterminée par cette technique.

Les CMI aux aminosides sont 2 à 4 fois plus élevées avec la méthode par dilution par rapport au Vitek2.

**Tableau 24 : Comparaison des CMI par la méthode en dilution sur milieu solide des souches P4 et du variant V4.**

<b>ANTIBIOTIQUE</b>	<b>SOUCHE P4 (CMI en mg/L)</b>	<b>SOUCHE V4 (CMI en mg/L)</b>
Kanamycine	<b>1</b>	<b>2</b>
Tobramycine	<b>2</b>	<b>4</b>
Gentamicine	<b>&lt; 0,125</b>	<b>0,25</b>
Ofloxacine	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>
Pefloxacine	<b>1</b>	<b>2</b>
Norfloxacine	<b>1</b>	<b>2</b>
Ciprofloxacine	0,5	0,5
Rifampicine	< 0,015	< 0,015
Pristinamycine	0,5	0,5
Vancomycine	1	1
Teicoplanine	0,5	0,5

Les CMI aux aminosides et aux fluoroquinolones à l'exception de la ciprofloxacine sont multipliées par 2 entre la souche parentale et le variant V4.

→ Souche V19

**Tableau 25 : Comparaison des trois techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Souche V19.**

ANTIBIOTIQUE	VITEK2 (CMI en mg/L)	DILUTION (CMI en mg/L)	DIFFUSION (diamètre critique en mm)	INTERPRETATION
<b>PENICILLINES</b>				
Benzylpénicilline	> 0,5	*	06	Résistant
Oxacilline	< 0,5	*	27	Sensible
<b>GLYCOPEPTIDES</b>				
Vancomycine	< 1	1	26	Sensible
Teicoplanine	< 0,5	1	29	Sensible
<b>QUINOLONES</b>				
Ofloxacin	< 0,5	0,25	*	Sensible
Péfloxacin	*	0,5	26	Sensible
Norfloxacin	*	0,5	*	Sensible
Ciprofloxacine	*	<0,125	*	Sensible
Lévofloxacine	*	*	34	Sensible
Moxifloxacine	*	*	30	Sensible
<b>AMINOSIDES</b>				
Kanamycine	< 4	0,25	23	Sensible
Tobramycine	< 1	2	25	Sensible
Gentamicine	< 0,5	0,25	22	Sensible
<b>MACROLIDES LINCOSAMIDES SYNERGISTINES</b>				
Erythromycine	<0.25	*	31	Sensible
Lincomycine	< 1	*	32	Sensible
Pristinamycine	< 0 ,5	0,25	33	Sensible
<b>AUTRES ANTIBIOTIQUES</b>				
Tétracycline	*	*	28	Sensible
Fosfomycine	<8	*	32	Sensible
Minocycline	< 0,5	*	*	Sensible
Acide fusidique	< 0.5	*	29	Sensible
Rifampicine	< 0,5	< 0,015	34	Sensible
Nitrofuranes	<16	*	28	Sensible
Cotrimoxazole	< 10	*	33	Sensible

\* : Non déterminée par cette technique.

**Tableau 26 : Comparaison des CMI avec la méthode par dilution sur milieu solide des souches P19 et du variant V19.**

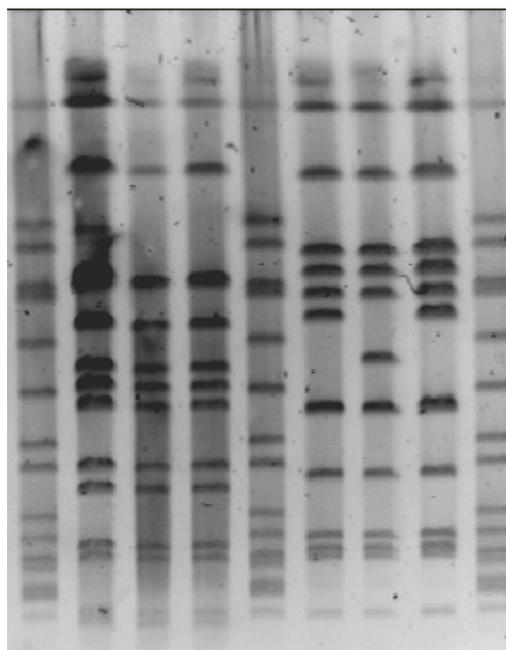
<b>ANTIBIOTIQUE</b>	<b>SOUCHE P19 (CMI en mg/L)</b>	<b>SOUCHE V19 (CMI en mg/L)</b>
Kanamycine	0,125	0,125
Tobramycine	2	2
Gentamicine	< 0,125	< 0,125
Ofloxacine	0,25	0,25
Pefloxacine	0,5	0,5
Norfloxacine	0,5	2
Ciprofloxacine	0,5	0, 5
Rifampicine	< 0,015	< 0,015
Pristinamycine	0,25	0,25
Vancomycine	1	1
Teicoplanine	1	1

Les souches V19 et la souche parentale P19 ont des CMI identiques.

### II.1.5.7- Etude de la clonalité

**Figure 14 : Profils électrophorétiques des VCN isolés in vivo et de leurs souches parentales**

**M V4 P4 P4' M V19 P19 P19'M**



Souche P4' : souche isolée en juillet 2004 d'un liquide de collection profonde

Souche P19' isolée en novembre 2004 d'une collection. fermée prélevée lors de l'ablation du stimulateur, 2 mois avant l'ablation de l'électrode. Il s'agissait également d'un variant colonie grise, ayant posé des difficultés de diagnostic au laboratoire.

Les souches variantes V4 et V19 et la souche dite parentale P4 et P19 sont effectivement isogéniques.

La souche P4' retrouvée lors d'une récurrence était de phénotype normal et son profil correspond aux souches précédemment isolées chez ce patient.

La souche P19' appartient au même clone que les souches V19 et P19.

Concernant le cas n°4, il n'a pas été possible de vérifier la souche isolée en juin 2003 lors du premier épisode septique, en raison d'une contamination du tube de collection.

## DISCUSSION

Des variants colonies naines ont été isolés depuis plusieurs années au cours d'infections persistantes ou récidivantes, ou lors de colonisations.

Les pathologies décrites (infections ostéo-articulaires, mucoviscidose) ont en commun le caractère chronique de leur évolution, rendant ainsi favorable l'émergence de mutants. Ces mutants résultent principalement d'une altération dans la chaîne de transport des électrons. Ces variants sont auxotrophes pour l'hémin, la ménadione et la thymidine sont les plus fréquemment isolés (Proctor, Kahl et al, 1998).

Les VCN ont des caractéristiques communes quelle que soit l'espèce et exhibent un morphotype particulier et présentent des résistances à certains antibiotiques. L'aspect en culture est atypique et repose sur des anomalies de taille, de pigmentation, d'hémolyse. De même la modification de caractéristiques biochimiques peut compromettre une identification correcte.

L'un des enjeux est de résoudre la difficulté à isoler et caractériser ces variants au laboratoire. L'aspect à l'examen direct des VCN est identique à celui des souches parentales, ce qui ne permet pas de suspecter au Gram une culture mixte. Le développement des VCN est retardé par rapport aux souches parentales en raison de l'allongement du temps de doublement (Proctor and Peters, 1998). Cette croissance ralentie prend en défaut les méthodes usuelles de détection de la sensibilité aux antibiotiques tels que l'antibiogramme automatisé ou l'antibiogramme manuel par diffusion en milieu gélosé. Devant ces difficultés, des variants ont été sélectionnés in vitro de caractériser leur aspect morphologique sur différents milieux de culture, de mettre au point et de valider une technique de test d'auxotrophisme.

Le premier point fut de définir les milieux à utiliser. Lors de l'étude in vitro, la sélection du mutant à la gentamicine était aisée et correspondait aux protocoles

décrits dans la littérature. L'obtention d'un mutant sous ofloxacine s'est avérée plus difficile mais le caractère particulièrement instable des mutants isolés a empêché la détermination des CMI.

Le choix des géloses permettant la détection de VCN à partir de prélèvements cliniques était également corrélé aux données de la littérature qui préconisaient l'utilisation de géloses anaérobies (Schaedler) ou au sang cuit (Chocolat) est préconisée (Kahl, 1998) (Borderon and Horodniceanu, 1978). Le variant V4 a ainsi pu être mis en évidence sur Schaedler en anaérobiose. L'obtention de mutants sur gélose au sang de mouton a aussi été rapportée, ce qui fut le cas pour le patient porteur d'une infection sur électrodes sous-thalamiques. La réalisation d'examen direct a contribué dans 8 cas à anticiper les résultats de la culture en montrant la présence de cocci. Le broyage préalable des prélèvements solides a permis d'optimiser l'examen direct dans 5 cas sur 8.

La durée d'incubation des milieux solides et liquides a été volontairement prolongée à 21 jours contre 15 jours actuellement en routine au laboratoire. Au cours de cette étude, les deux VCN issus de prélèvements cliniques, ont été isolés avant J15.

L'auxotrophisme pour la thymidine de la souche témoin corrobore les données de la littérature sur les VCN isolés de patients atteints de mucoviscidose

Le mutant sélectionné in vitro par la gentamicine est auxotrophe pour la thiamine. Ceci est en accord avec plusieurs observations (Proctor and Peters, 1998 ; Proctor et al, 1998). Concernant le type d'auxotrophisme des variants sélectionnés sous fluoroquinolone, les données sont peu nombreuses. L'auxotrophisme des variants issus des travaux de Pan XS et al (Pan, 2002) vis-à-vis de l'hémin, la ménadione et la thymidine n'a pu être démontré. Quant à l'étude de Mitsuyama (Mitsuyama et al, 1997), elle ne comporte pas de test d'auxotrophisme.

La mise en évidence de l'auxotrophisme de la souche V4 a nécessité d'augmenter la concentration de ménadione d'un facteur 10 par rapport aux concentrations décrites (Acar et al, 1978). D'autres cas de VCN, ménadione déficients ont été décrits dans des infections osseuses sur matériel (Borderon and Horodniceanu, 1976). Aucune relation entre le type d'auxotrophisme et la résistance aux antibiotiques n'a pu être décrite.

La détermination de l'auxotrophisme en routine au laboratoire n'a pas d'intérêt particulier. Les rares cas de traitement par la vitamine K chez des patients porteurs de variants ménadione déficients suscitent l'interrogation sur ce point.

Concernant la sensibilité des VCN aux antibiotiques et notamment aux aminosides, l'étude de Pelletier (Pelletier et al, 1979) portant sur 9 souches de *S.aureus* et leurs variants respectifs sélectionnés sous gentamicine retrouve des CMI, pour les souches mutantes significativement augmentées ( $2,3 \pm 0,8$  µg/ml versus  $0,4 \pm 0,2$ ;  $p < 0,001$ ). Le variant V1 a une CMI à la gentamicine deux fois plus élevée que la souche parentale par la méthode en dilution. Le variant V4, ménadione déficient a des CMI aux aminosides de 2 fois celles de la souche parentale ; ce qui correspond au mécanisme physiopathologique impliquant l'altération dans le transport de la chaîne d'électrons.

Le variant V2 sélectionné sous ofloxacine, ne présente pas de modification de CMI à cet antibiotique. L'instabilité de ce variant peut expliquer que les CMI observées soient identiques. Deux études portent sur la sélection in vitro de *S.aureus* sous quinolones. La ciprofloxacine sélectionne des souches résistantes par un mécanisme chromosomique touchant l'ADN- gyrase et la topoisomérase IV, mais les colonies obtenues sont d'aspect variable. Il s'agit soit de VCN (Schmitz et al, 2001), soit de colonies morphologiquement normales (Mitsuyama et al, 1997). La sélection de mutants sous pazufloxacine. (Mitsuyama et al, 1997) donne des VCN résistants sans que le mécanisme ne

soit définit. Cet antibiotique n'est pas commercialisé en France, toutefois l'auteur précise que la lévofloxacine se comporterait de façon identique à la pazufloxacine. Les conséquences thérapeutiques à propos des risques de résistance sous fluoroquinolones lors d'infection à VCN sont plus difficiles à établir.

Les résultats de l'étude in vivo montre que les milieux préconisés dans la littérature ont effectivement permis d'isoler 2 variants sur les 69 prélèvements ensemencés.

Le patient correspondant au cas N°4 a présenté un premier épisode infectieux à 7 mois de l'intervention, en juin 2003. Un prélèvement de collection profonde positif à *S. aureus* ne montrait pas de variant. La présence du mutant est détectée sur le prélèvement per-opératoire réalisé lors de la mise en place du ciment à la gentamicine en octobre 2003, ce qui laisse supposer que sa présence était antérieure à la pose du ciment. Deux autres patients ont reçu du ciment à la gentamicine et n'ont pas développé de VCN. Il a été démontré que la présence d'un matériel étranger était un facteur de risque de chronicité car il facilitait l'adhérence des bactéries et la formation d'un biofilm. Ceci a pu être vérifié pour les VCN de *S. aureus* (Chuard et al, 1997). L'étude de von Eiff (von Eiff, Bettin, 1997) montrait que des rechutes d'ostéomyélites à VCN survenaient chez des patients porteurs de ciment à la gentamicine. Cependant quelques cas d'infections spontanées survenant sans pression antibiotique ont été répertoriés. Les avis sont controversés quant à l'usage du ciment aux antibiotiques. La cinétique de libération de l'antibiotique contenu dans le ciment serait inadéquate et contribuerait à l'émergence de souches résistantes et l'efficacité en prophylaxie lors d'une première pose de matériel ne serait pas établie (van de Belt et al, 2001). A contrario, ces ciments diminueraient le taux d'infections périprothétiques comparé au ciment standard même lorsque ces derniers sont utilisés en association à une antibiothérapie systémique. La concentration locale

en antibiotiques serait bien supérieure à celle obtenues par antibiothérapie générale. Enfin l'utilisation de ces ciments permettrait le remplacement en un temps lors des sepsis sur prothèse (Passuti and Gouin, 2003).

Concernant les deux patients de l'étude in vivo, des rechutes multiples sont signalées probablement du fait de la persistance in vivo de ces souches particulières. A noter que le cas N°19 traité par oxacilline seule, ne bénéficiait pas d'une antibiothérapie à bonne diffusion osseuse.

Le comportement in vivo de ces variants et leur sélection au sein de la cellule reste méconnu. L'étude de Proctor (Proctor, 1994) a tenté de déterminer quels pouvaient être les facteurs déclenchant dans la cellule, la conversion en VCN.

Plusieurs conditions de PH, de concentration en potassium et en métabolites du cycle de Kreb's ont été testés sans succès. La culture de cellules endothéliales avec des souches de *S. aureus* donne des VCN préférentiellement auxotrophes pour la ménadione, et plus résistant à la gentamicine sans exposition préalable aux aminosides (Vesga et al, 1996). De nombreuses interrogations persistent donc sur le comportement in vivo de ces variants colonies naines.

## **CONCLUSION**

Bien que rarement isolés, les variants colonies naines posent les problèmes de leur détection et leur caractérisation.

Cette étude nous a permis d'appréhender une nouvelle approche pour la prise en charge des prélèvements ostéo-articulaires au sein du laboratoire. En particulier, l'examen direct et le broyage, jusqu'à présent non réalisés, le seront dans certains cas. Ce traitement préalable des échantillons sera cependant réservé à certaines indications. L'utilisation d'une gélose Schaedler qui ne faisait pas partie des milieux ensemencés et aura pour objectif d'améliorer la sensibilité dans la détection de variants colonies naines. L'établissement d'une durée

d'incubation standardisée doit également contribuer à réaliser cet objectif. Enfin la poursuite et l'amélioration de la coopération entre chirurgiens, infectiologues et biologistes reste primordiale afin d'optimiser la prise en charge des patients.

**Annexe 1 : METHODOLOGIE DE DETERMINATION DES CMI EN DILUTION SUR MILIEU SOLIDE.**

**• ANTIBIOTIQUES TESTES**

<b>ANTIBIOTIQUE</b>	<b>REFERENCE</b>	<b>TITRE</b>	<b>SOLVANT</b>
Kanamycine	Bristol lot 70439	79,8%	Eau distillée stérile
Tobramycine	Merck lot 3506	100%	Eau distillée stérile
Gentamicine	Sigma lot 50k0924	66%	Eau distillée stérile
Ofloxacin	Aventis lot W245010	99,7%	Acide acétique
Pefloxacin	Rhône Poulenc lot WSD3072	92,3%	NaOH 0,1 N
Norfloxacin	Sigma lot 83H0921	100%	NaOH 0,1 N
Ciprofloxacine	Bayer Pharma lot BXR0A2S	99%	HCL 0,1 N
Rifampicine	Aventis	100%	Eau distillée stérile
Pristinamycine	Rhône Poulenc lot RP7293	108,4%	Méthanol
Vancomycine	Sigma lot 31K1738	100%	Eau distillée stérile
Teicoplanine	Aventis lot 0270/Z/R	88,9%	Eau distillée stérile

### • PREPARATION DES SOLUTIONS ANTIBIOTIQUES

Une solution concentrée à 1000 mg/L est obtenue en additionnant l'équivalent de 10mg d'antibiotique dans 10 ml de solvant (en fonction du titre). Des dilutions successives au  $1/10^e$  et au  $1/5^e$  donne une solution mère concentrée à 20 mg/L.

2ml de cette solution d'antibiotique incorporée dans 2 ml d'eau distillée stérile donne une solution de concentration initiale à 10mg/L.

Des dilutions successives des solutions d'antibiotiques sont réalisées selon la méthode internationale. Deux millilitres de ces différentes dilutions sont ajoutés à 18 ml de bouillon Mueller- Hinton.

Des géloses de 20 ml sont ainsi constituées avec pour chacune une concentration finale définit d'antibiotique.

### • TECHNIQUE D'ENSEMENCEMENT

Chaque souche est incubée dans un bouillon cœur- cervelle pendant 18 heures avec un inoculum à 0,5 macFarland, soit  $10^8$  CFU/ml. Une dilution du germe en finale au  $1/10^e$  est réalisée. On ensemence la suspension de germes avec l'appareil de Steers qui dépose 1  $\mu$ l sur la gélose.

## REFERENCES

- Abele- Horn M, Schupfner B et al. Persistent wound infection after herniotomy associated with small colony variants of staphylococcus aureus. *Infection* 2000; 28: 53-54.
- Abele-Horn M, Schupfner B, Emmerling P et al. Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection* 2000; 28(1):53-4.
- Acar JF, Goldstein FW, Lagrange P. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 1978 Aug; 8(2):142-7.
- Adler H, Widmer A, Frei R. Emergence of Teicoplanin-resistant small colony variant of *Staphylococcus epidermidis* during vancomycin therapy. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 2003 Dec; 22(12):746-8. Epub 2003 Nov 06.
- Baddour L, Simpson WA, Weems JJ et al. Phenotypic selection of small-colony variant forms of *Staphylococcus epidermidis* in the rat model of endocarditis. *The journal of infectious diseases* 1988 Apr; 157(4):757-63.
- Baddour LM, Christensen GD. Prosthetic valve endocardis due to small-colony staphylococcal variants. *Reviews of infectious diseases* 1987; Nov-Dec, 9(6):1168-74.
- Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM et al. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *The journal of infectious diseases* 1994; 170:1033-7.
- Bascomb S, Manafi M. Use of enzyme tests in chracterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic gram- positive cocci. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(2): 318-40.

- Bates DM, von Eiff C , McNamara PJ et al. *Staphylococcus aureus menD* and *hemB* Mutants are as infective as the strains, but the menadione biosynthetic mutant persists within the kidney. The journal of infectious diseases 2003; 187:1654-61.
- Bernard L, Infections de prothèse articulaire. Médecine et maladies infectieuses 2003 ; 33 : 231-239.
- Bes M, Brun Y. Staphylococcus: actualités taxonomiques et identification. Revue française des laboratoires 2002 mai ; 343 :23-30.
- BlancV, Picaud J, Legros E, et al. Infection sur prothèse totale de hanche à *Staphylococcus caprae*. Cas et revue de la littérature. Pathol Biol 1999 ; 47 : 409-413.
- Borderon E, Horodniceanu T. Dwarf colony mutants of staphylococcus: study of three strains isolated from patients with osteosynthesis. Ann Microbiol 1976 May- Jun; 127(4): 503-14.
- Borderon E, Horodniceanu T. Metabolically deficient dwarf colony mutants of *Escherichia coli*: deficiency and resistance to antibiotics of strains isolated from urine culture. J Clin Microbiol 1978 Dec; 629-634.strains
- Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ et al. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. FEMS Immunology and medical microbiology 2004 May 1; 41(1):35-41.
- Carricajo A, treny A, fonsale N et al. Performance of the chromogenic medium CHROMagar Staph aureus and the Staphychrom coagulase test in the detection and identification of staphylococcus aureus in clinical specimens. J Clin Microbiol 2001; 39: 2581-2583.

- Carsenti- Etesse, Doyon F, Desplaces N et al. Epidemiology of bacterial infection during management of open leg fractures. Eur J Clin Microbiol Infect Disease 1999; 18: 315-323.
- Cayeux P, Acar JF, Chabbert YA. Bacterial persistence in streptococcal endocarditis due to thiol- requiring mutants. J Infect Dis 1971; 124: 247-54.
- Chuard C, Vaudaux PE, Proctor RA et al. Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. Journal of antimicrobial chemotherapy 1997; 39:603-8.
- Coello R, Glenister H, Fereres J et al. The cost of infection in surgical patients : a case- control study. J Hosp Infect 1993 Dec ; 25(4) : 239-50.
- Cremieux AC, Saleh- Mghir A. Infections ostéo-articulaires en milieu chirurgical : l'exemple des infections sur prothèse articulaire. Conférences d'actualisation Société Française de Réanimation 2003, p. 539-544.
- David BD. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev 1987 ; 51 : 341-350.
- Desplaces N. Epidémiologie et diagnostic bactériologique des infections sur prothèses articulaires.23<sup>e</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse Paris 2003.
- Ferrero L, Cameron B, Manse B et al. Cloning and primary structure of staphylococcus aureus DNA topoisomerase IV: a primary target of flouoroquinolones. Molecular microbiology; 13: 641-653.
- Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Précis de bactériologie clinique. Lememed. 2000.

- Hale JH. Studies on staphylococcus mutation: a naturally occurring G gonadial variant and its carbon dioxide requirements. Br J Exp pathol 1951; 32: 307-13.
- Heczko PB, Hoffler U, Kasprowicz A et al. Quantitative studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 1981; 14(3): 233-41.
- Hoffstadt RE, Youmans GP. Staphylococcus aureus: dissociation and its relation to infection and to immunity. J Infect Dis 1932; 51: 216-42.
- Hoiby N, et al. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant staphylococcus epidermidis. Lancet; 349: 167-169.
- Honea N, Jarrard E, Martens T et al. Variability in *S. aureus* for expected mannitol, tréhalose and mannose reaction. 100<sup>th</sup> General Meeting of the American society for Microbiology, Los Angeles May 2000.
- Jonsson IM, von Eiff C, Proctor RA et al. Virulence of a hemB mutant displaying the phenotype of a Staphylococcus aureus small colony variant in a murine model of septic arthritis. Microb Pathog 2003 Feb; 34(2): 73-9.
- Kahl B, Hermann M, Schulze Everding A et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. The journal of infectious diseases 1998; 177:1023-9.
- Kahl BC, Belling G, Reichelt R et al. Thymidine-depend small-colony variants of Staphylococcus aureus exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. Journal of clinical microbiology 2003 Jan; 41(1):410-13.
- Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G et al. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis

- patients during a 6-year prospective study. *Journal of clinical microbiology* 2003 Sep; 41(9):4424-27.
- Kipp F, Becker K, Peters G et al. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 2004 Mar; 42(3):1277-79.
- Kipp F, Ziebuhr W, Becker K et al. Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA directed in situ hybridisation in a patient with a brain abscess caused by small colony variants. *Journal of neurology neurosurgery and psychiatry* 2003; 74:1000-2.
- Kipp F, Kahl BC, Becker K et al. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of staphylococcus aureus small colony variants. *J Clin Microbiol* 2005 Apr; 43(4): 1956-9.
- Kohler C, von Eiff C, Peters G et al. Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. *Journal of bacteriology* 2003 Dec; 185(23):6928-37.
- Levinton IM, Fraimown HS, Carrasco N et al. Tobramycin uptake in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 ; 369 : 467- 475.
- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111:1265-73.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 1998 Aug 20; 339(8):520-32.
- Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 248: 705-711.
- Massey RC, Buckling A, Peacock SJ. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Current biology* 2001 Nov 13; 11(22):1810-14.

- McNamara PJ, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents* 2000 Mar; 14(2): 117-22.
- Mitsuyama J, Yamada H, Maehana J et al. Characteristics of quinolone-induced small colony variants in *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 1997; 39:697-705.
- Murdoch DR, Everts RJ, Chambers ST et al. Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34 : 993-994.
- National Nosocomial Infections Surveillance System report, Data from January 1990- May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999; 27: 520-532.
- O' Donoghue MA, Allen KD. Costs of an outbreak of wound infections in an orthopaedic ward. *J Hosp Infect* 1992 Sep; 22(1): 73-9.
- Ogston A, Micrococcus poisoning. *J Anat* 1882; 17: 24-58.
- Pan XS, Hamlyn PJ, Talens-Visconti R et al. Small-colony mutants of *Staphylococcus aureus* allow selection of gyrase-mediated resistance to dual-target fluoroquinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002 Aug; 46(8):2498-506.
- Passuti N, Gouin F. Antibiotic-loaded bone cement in orthopaedic surgery. *Joint Bone Spine* 2003 June; 70(3): 169-174.
- Pelletier LL Jr, Richardson M, Feist M. Virulent gentamicin-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Lab Clin Med* 1979 Aug; 94(2):324-34.
- Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infectious agents and disease* 1994; 3:302-12.

- Proctor RA, Kahl B, von Eiff C et al. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clinical infectious diseases* 1998; 27 suppl 1:S68-74.
- Proctor RA, Peters G. Small colony variants in Staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clinical infectious diseases* 1998; 27:419-23.
- Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M et al. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases* 1995; 20:95-102.
- R.A.I.S.I.N: [www.sante.gouv.fr/htm/actu/nosoco/Branger](http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/nosoco/Branger)
- Sadowska B, Bonar A, von Eiff C et al. Characteristic of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS immunology and medical microbiology* 2002 Feb 18; 32(3):191-7.
- Sasarman A, Surdeanu M, Sabados J et al. Classification of vitamine K deficient mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Gen microbiol* 1971 ; 65 :125- 30.
- Schleifer KH, Kroppenstedt RM. Chemical and molecular classification of staphylococci. *J Appl Microbiol Suppl* 1990: 9S-24S.
- Schmitz FJ, Fluit AC, Beeck A et al. Development of chromosomally encoded resistance mutations in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 2001; 47:113-5.
- Seifert H, von Eiff C, Fatkenheuer G. Fatal case due methicillin-resistant *Staphylococcus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerging infectious diseases* 1999 May-Jun; 5(3):450-3.

- Sherries JC. Two small colony variant of *S. aureus* isolated in pure culture from closed infected lesions and their carbone dioxide requirement. *J Clin Pathol* 1952; 5: 354-5.
- Spearman P, Lakey D, Jotte S et al. Sternoclavicular joint septic arthritis with small-colony variant *Staphylococcus aureus*. *Diagn microbial infect dis* 1996; 26:13-5.
- Swingle EL. Studies on small colony variant of *Staphylococcus aureus*. *J bacterial* 1935; 29: 467-89.
- Tankovic J, Desplaces N, Duval J et al. In vivo selection during pefloxacin therapy of mutant of *Staphylococcus aureus* with two mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1994 May; 38(5):1149-51.
- Vaudaux P, Francois P, Bisognano C et al. Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infection and immunity* 2002 Oct; 70(10):5428-37.
- Vesga O, Groeschel MC, Otten MF et al. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial milieu. *J Infect Dis* 1996; 173: 739-42.
- Von Eiff C, Becker K, Metze D et al. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. *Clinical infectious diseases* 2001;32:1643-47.
- Von Eiff C, Bettin D, Proctor RA et al. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin infect dis* 1997 Nov; 25(5):1250-1.
- Von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA et al. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists

- intracellularly. Journal of bacteriology 1997 Aug; 179(15):4706-12.
- Von Eiff C, Lubritz G, Heese C et al. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in AIDS patients on the formation of small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. Diagnostic microbiology and infectious disease 2004 Mar; 48(3):191-4.
- Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Infectious diseases 2002 Nov; 2(11):677-85.
- Von Eiff C, Vaudaux P, Kahl BC et al. Bloodstream infections caused by small- colony of coagulase negative staphylococci following pace maker implantation. Clin Infect Dis 1999; 29: 932-934.
- Wilson SG, Sanders CC. Selection and characterization of strains of *Staphylococcus aureus* displaying unusual resistance to aminoglycosides. Antimicrobial agents and chemotherapy 1976 Sep; 10(3):519-25
- Wise RI, Spink WW. The influence of antibiotics on the origin of small colonies of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. J Clin Invest 1954; 33: 1611-22
- Yegian D, Gallo G, Toll MW. Kanamycin resistant staphylococcus mutant requiring heme for growth. J bacterial 1959; 78: 10-2.
- Yegian D, Gallo G, Toll MW. Kanamycin resistant staphylococcus mutant requiring heme for growth. J bacterial 1958; 78: 10-12.
- Youmans GP, delves E. The effect of inorganic salts on the production of small colony variants by staphylococcus aureus. J bacterial 1942; 44: 127-36.

NOM : MENDES

PRENOM : STEPHANIE

**Titre de la thèse :**

**Etude des variants métaboliques dans le genre *Staphylococcus* :  
Caractérisation in vitro et étude in vivo**

---

## RESUME

L'implication des variants colonies naines n'a cessé de croître ces dernières années en particulier dans les pathologies chroniques. La particularité de ces variants résulte d'altération dans la chaîne de transport des électrons, conduisant à des modifications phénotypiques et métaboliques. Ces variants ont la faculté de persister au sein des cellules de l'hôte et à exprimer une résistance accrue à certains antibiotiques. Au cours de ce travail, nous avons défini les conditions optimales pour la détection, l'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des variants après sélection in vitro. Dans un second temps, nous avons recueilli, 68 prélèvements de tissus provenant de sepsis osseux avérés cliniquement à *Staphylococcus aureus* et à staphylocoques négatifs afin de détecter la présence de variants colonies naines. Seuls deux patients étaient porteurs de ces souches. L'un des variants exprime un auxotrophisme pour la ménadione et se révèle être plus résistant aux aminosides que la souche isogénique. L'autre souche ne présentait pas de résistances particulières. Ces variants restent donc peu fréquents. Cette étude aura pour intérêt de modifier les pratiques actuelles au sein du laboratoire de Bactériologie du CHU de Nantes, concernant la prise en charge des prélèvements ostéo-articulaires afin d'optimiser la détection de ces variants.

---

## MOTS-CLES

**Variants colonies naines- Staphylocoques- Sepsis osseux**