

ANNÉE : 2016

THÈSE 2016/TOU3/2019

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du mémoire du

DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement par

BERGON Ludovic

***S. capitis, S. caprae et S. lugdunensis* : rôle dans les
infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur
la sensibilité aux antibiotiques**

Le 15 Avril 2016

Directeur de thèse : GRARE Marion, MCU-PH, Bactériologie

JURY

Président : ROQUES-CESCHIN Christine, PU-PH, Bactériologie

1^{er} assesseur : MARTY Nicole, PU-PH, Bactériologie

2^{ème} assesseur : LAFFOSSE Jean Michel, PU-PH Orthopédie Traumatologie

3^{ème} assesseur : DEBARD Alexa, PH, Infectiologie

4^{ème} assesseur : PRERE Marie Françoise, MCU-PH, Bactériologie

**PERSONNEL ENSEIGNANT de la faculté des Sciences Pharmaceutiques
de l'Université Paul Sabatier au 1^{er} octobre 2015**

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires

M. CESTAC P	Pharmacie Clinique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie
Mme THOMAS F	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C	Biophysique
M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C	Physiologie
Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
Mme COSTE A (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N	Biochimie
Mme DERAËVE C	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A	Toxicologie
Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
Mme LEFEVRE L	Physiologie
Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
M. LEMARIE A	Biochimie
M. MARTI G	Pharmacognosie
Mme MIREY G (*)	Toxicologie
Mme MONTFERRAN S	Biochimie
M. OLICHON A	Biochimie
M. PERE D	Pharmacognosie
Mme PORTHE G	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D	Hématologie
Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitolo-Universitaires

Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2015

Remerciements

En préambule de ce travail, je tiens à remercier :

Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse ainsi que pour m'avoir apporté votre aide pour la réalisation des travaux sur le biofilm dans votre Laboratoire

Madame le Dr Marion GRARE, merci d'avoir dirigé mon travail de thèse, pour tes précieux conseils, ton soutien et ta disponibilité tout au long de ce travail ainsi que pour les semestres passés en tant qu'interne !

Madame le Professeur Nicole MARTY pour avoir accepté de siéger au sein de ce jury de thèse, ainsi que pour vos enseignements en vos qualités de chef de service et de coordinatrice de notre discipline

Monsieur le Professeur Jean Michel LAFFOSSE, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de nous faire bénéficier de votre expertise dans le domaine de l'Orthopédie et de la Traumatologie

Madame le Dr Alexa DEBARD pour avoir accepté de juger ce travail, pour votre écoute, vos enseignements et votre attention pour le sujet

Madame le Dr Marie-Françoise PRERE, merci pour votre aide durant mes semestres d'interne, merci pour votre expérience et votre motivation ainsi que votre passion pour la microbiologie, la plus belle des matières comme vous dites !

Je tiens aussi à remercier Sophie Pecastaings et Aurelie Furiga pour leur aide concernant les expériences (pas toujours évidentes) sur le biofilm, ainsi que l'ensemble du personnel, techniciennes et techniciens du Laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse.

À mes parents, sans qui rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien durant ces années, à ma sœur Magali, de me supporter depuis 27 ans ! Je vous embrasse.

À ma famille, ici ou ailleurs, Grand-Parents, Oncles et Tantes, Parrain, Marraine, Cousins, Cousines, Beau-Frère

À mes amis, toujours aussi importants

Marco le cubain, Thierry la pointe, tous deux très fins connaisseurs du monde pharmaceutique et de l'internat, enfin surtout des soirées, Nardine, Audrezz, Davidmagic, Anne, Solenne, Remy, aux meilleurs pharmaciens du monde Seb kouki-Gnocchi-la-Gnocche, Vincent, Barni, Gendron-beurre, Gary, Charly, le Bask, Justine, Arnaud, Auré, Omar, Flo, Sylvain, Raphaëlle...

Toute la belle bande d'internes, Toulousains, Bordelais, Limougeauds, ou même du nord, rencontrés durant ces 4 années : Yannick Pipass/Bonnafous, Hugo la Boije, La Dufle, John-Brice, Romain, l'amiral Serri, Marine et Laure colocs ! Marie, Jess, Reda, Manu, Anne-Lise, David Metsu, Jérôme, Alex, Aude, Catoche, Ann-Lise, Sanaa, Pierre, Manton, Sherazade, Hélène-Hadri, Bernie, Marion, Alice-Anne, Pierre, Jeff, Caro, Espitorche, Brungsy, Camille, Arnaud, Sem, aux ruchistes Dacquois

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	12
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
1 GENERALITES SUR LES STAPHYLOCOQUES	14
1.1 CARACTERISTIQUES ET IDENTIFICATION	14
1.2 POUVOIR PATHOGENE ET FACTEURS DE VIRULENCE	16
1.3 STAPHYLOCOQUES ET BIOFILM	17
1.3.1 DEFINITIONS	17
1.3.2 PHYSIOPATHOLOGIE ET CYCLE DU BIOFILM	18
1.3.2.1 Pathogénèse	18
1.3.2.2 Composition et métabolisme	19
1.3.3 IMPLICATION MEDICALE	20
1.3.4 STAPHYLOCOQUES « VARIANTS A PETITES COLONIES »	22
2 LES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES	23
2.1 PHYSIOPATHOLOGIE ET CLASSIFICATION DES IOA	23
2.1.1 PHYSIOPATHOLOGIE	23
2.1.2 CLASSIFICATION	24
2.2 ÉLÉMENTS DE PRISE EN CHARGE DES IOA	25
2.2.1 ÉLÉMENTS DIAGNOSTIQUES	26
2.2.1.1 Arguments cliniques	26
2.2.1.2 Arguments paracliniques	26
2.2.2 TRAITEMENT MEDICO-CHIRURGICAL	27
2.2.2.1 Prise en charge chirurgicale	27
2.2.2.2 Prise en charge anti infectieuse	28
2.3 DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DES IOA	30
2.3.1 PRISE EN CHARGE DES PRELEVEMENTS AU LABORATOIRE	30
2.3.1.1 Types de prélèvements	31
2.3.1.2 Culture et identification	33

2.3.2	AUTRES TECHNIQUES ET AMELIORATIONS	34
2.3.2.1	Sonication	34
2.3.2.2	Biologie moléculaire	36
2.3.3	INTERPRETATION	38

3 PLACE DES STAPHYLOCOQUES DANS LES IOA **39**

3.1	PLACE DU GENRE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> DANS L'EPIDEMIOLOGIE DES IOA	39
3.2	EVOLUTION DES RESISTANCES	40

PARTIE EXPÉRIMENTALE

4 APPORT DU SPECTROMETRE DE MASSE MALDI-TOF POUR L'IDENTIFICATION DES *S. LUGDUNENSIS*, *S. CAPITIS* ET *S. CAPRAE* **44**

4.1	SPECTROMETRE DE MASSE MALDI-TOF	44
4.1.1	PRESENTATION	44
4.1.2	PRINCIPE	44
4.2	MATERIEL ET METHODE	46
4.3	RESULTATS COMPARES	47
4.3.1	COMPARAISON VIS A VIS DES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES D'IDENTIFICATION	47
4.3.1.1	Concordance d'identification en 1 ^{er} ou 2 nd passage	48
4.3.1.2	Discordances d'identification	48
4.3.2	APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE :	49
4.3.3	DISCUSSION : APPORT DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES	50

5 EPIDEMIOLOGIE DES IOA A *S. LUGDUNENSIS*, *S. CAPITIS* ET *S. CAPRAE* AU CHU DE TOULOUSE **52**

5.1	PLACE DES DIFFERENTES ESPECES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> DANS LES IOA ENTRE 2010 ET 2014	52
5.2	IOA A <i>S. LUGDUNENSIS</i>, <i>S. CAPITIS</i>, <i>S. CAPRAE</i> EN 2013-14	54
5.2.1	PATIENTS ET PRELEVEMENTS	54
5.2.1.1	Patients	54
5.2.1.2	Prélèvements	55
5.2.2	RESULTATS BACTERIOLOGIQUES	55
5.2.2.1	Infections/Contaminations à <i>Staphylococcus capitis</i>	56
5.2.2.2	Infections/Contaminations à <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	57
5.2.2.3	Infections/Contaminations à <i>Staphylococcus caprae</i>	58

5.2.2.4	Infections mixtes	58
5.2.2.5	Récapitulatif	59
5.3	PROFILS DE RESISTANCE DES <i>S. LUGDUNENSIS</i>, <i>S. CAPITIS</i> ET <i>S. CAPRAE</i>	60
5.4	DISCUSSION ET COMPARAISON DES RESULTATS AVEC LES DONNEES DE LA LITTERATURE	62
6	<u>EFFICACITE <i>IN VITRO</i> DES ANTIBIOTIQUES SUR <i>S. CAPITIS</i> ET <i>S. CAPRAE</i> DANS UN MODELE DE BIOFILM</u>	68
6.1	MATERIEL ET METHODE	68
6.1.1	SELECTION DES SOUCHES ET DES ANTIBIOTIQUES	68
6.1.1.1	Choix des souches	68
6.1.1.2	Choix des antibiotiques	69
6.1.2	DETERMINATION DES CMI ET CMB EN MILIEU PLANCTONIQUE	70
6.1.2.1	Concentrations minimales inhibitrices	70
6.1.2.2	Concentrations minimales bactéricides	71
6.1.3	DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE SUR UN MODELE DE BIOFILM	72
6.1.3.1	Pré requis	72
6.1.3.2	Protocole	73
6.2	RESULTATS	74
6.2.1	RESULTATS EXPERIMENTAUX CMI/CMB	74
6.2.2	EFFET ANTI-BIOFILM	75
6.3	DISCUSSION	78
7	<u>CONCLUSION</u>	81
8	<u>ANNEXES</u>	82
9	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	86

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Représentation schématique des différentes phases de la formation des biofilms (d'après (21))	19
Figure 2 : Colonisation du n-butyl-2-cyanoacrylate par <i>S. aureus</i> vue au microscope électronique (d'après (22)).....	19
Figure 3 : Cocci organisé en biofilm au fond d'une cassure (d'après (24)).....	20
Figure 4: Influence du biofilm sur les antibiotiques et les cellules immunitaires (d'après (17)).....	21
Figure 5: Différents entités cliniques des IOA de l'adulte en fonction de la présence ou non de matériel (d'après le PILLY 2016)	24
Figure 6: Schéma structurel d'un os long et d'une articulation mobile (d'après images future-sciences.com)	25
Figure 7: Modalités de prise en charge chirurgicale concernant la dépose et la repose de prothèse (d'après (36)).....	28
Figure 8 : <i>S. lugdunensis</i> sur gélose au sang : plusieurs aspects des colonies mais avec le même antibiogramme. (d'après (44))	34
Figure 9 : Protocole de sonication de matériel prothétique utilisé à la Mayo Clinical Microbiology Laboratory. (d'après (30)).....	36
Figure 10: Pourcentage de SARM isolés dans le service de traumatologie du CHU de Toulouse (d'après M.Grare)	42
Figure 11 : Principe général de l'analyse MALDI-TOF (d'après (56)).....	45
Figure 12 : Spectre protéiques de <i>S. aureus</i> (C) et <i>S. epidermidis</i> (D) obtenus par MALDI-TOF.....	46
Figure 13 : Concordance d'identification entre le SM et les techniques biochimiques.....	50
Figure 14 : Répartition des différents staphylocoques isolés de prélèvements ostéo-articulaires de 2010 à 2014 au Laboratoire de Bactériologie Hygiène du CHU de Toulouse.....	53
Figure 15 : Pourcentage de sensibilité de <i>S. lugdunensis</i> (a), <i>S. caprae</i> (b), et <i>S. capitis</i> (c).....	62
Figure 16 : Schéma de la plaque pour détermination des CMI sur souches planctoniques.....	71
Figure 17: plaque 24 puits	73
Figure 18 : Effet anti-biofilm des antibiotiques sur la souche n°33 de <i>S. caprae</i>	76
Figure 19 : Effet anti-biofilm de la minocycline (MNO) sur les souches de <i>S. caprae</i> et de <i>S. capitis</i>	77

<i>Tableau I : Identification des staphylocoques grâce à leurs caractéristiques biochimiques et culturels (d'après (3)).</i>	15
<i>Tableau II: Différences d'identification entre les staphylocoques DNase+ (d'après (5))</i>	15
<i>Tableau III : Épidémiologie des IOA (d'après (30)).</i>	39
<i>Tableau IV : Évolution de l'antibiorésistance des S.aureus et SCN (d'après (53))</i>	41
<i>Tableau V : Répartition des différentes souches ré-identifiées par spectromètre de masse :</i>	47
<i>Tableau VI : 2^{nde} identification des souches par spectromètre de masse.</i>	48
<i>Tableau VII : Souches identifiées de façon discordante entre Vitek2® et SM</i>	49
<i>Tableau VIII : identification des souches par spectromètre de masse (SM) et biologie moléculaire (BM)</i>	49
<i>Tableau IX : Souches de staphylocoques isolées de prélèvements ostéo-articulaires de 2010 à 2014 au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse</i>	53
<i>Tableau X : Caractéristiques des patients considérés infectés à S. capitis</i>	56
<i>Tableau XI : Caractéristiques des patients considérés infectés à S. lugdunensis</i>	57
<i>Tableau XII: Caractéristiques des patients considérés infectés à S. caprae</i>	58
<i>Tableau XIII : Caractéristiques des patients considérés infectés de façon mixte</i>	58
<i>Tableau XIV : Prélèvements positifs à S. capitis, S. lugdunensis, S. caprae et mixtes</i>	59
<i>Tableau XV : Récapitulatif des patients considérés infectés à S. capitis, S. lugdunensis, S. caprae ou de façon mixte</i>	60
<i>Tableau XVI : Origine des souches sélectionnées pour une évaluation sur le biofilm</i>	69
<i>Tableau XVII: CMI et CMB mesurées vis-à-vis de S. capitis et S. caprae :</i>	75
<i>Tableau XVIII : Concentrations efficaces sur biofilm (CMEB) d'après (85).</i>	79

Liste des abréviations

BGN : bacille gram négatif

CASFM : comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie

CMI et CMB : concentration minimale inhibitrice et bactéricide

CRIOAC : centre de référence pour les infections ostéo-articulaires

CRP : protéine C-réactive

EDS : eau distillée stérile

IOA : infections ostéo-articulaires

méti-S ou méti-R : sensible ou résistant à la méticilline

MGG : May Grunwald Giemsa

NFS : numération formule sanguine

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PSM : poste de sécurité microbiologique

PTG : prothèse totale de genou

PTH : prothèse totale de hanche

SARM : *S. aureus* résistant à la méticilline

SASM : *S. aureus* sensible à la méticilline

SCN: Staphylocoque à coagulase négative

SM : spectromètre de masse

UFC : unité formant colonie

Introduction

Les infections ostéo-articulaires ou IOA rassemblent diverses entités en fonction du contexte et de l'âge. Ce sont des infections qui engagent le pronostic fonctionnel articulaire et parfois le pronostic vital. Elles peuvent survenir sur une articulation native ou sur matériel prothétique. En effet, chaque année, environ 140 000 prothèses totales de hanche (ou PTH) et 80 000 prothèses totales de genou (ou PTG) sont implantées en France (1,2). Les infections sur prothèses peuvent nécessiter de nombreuses reprises chirurgicales et entraînent une morbi-mortalité non négligeable.

La prise en charge optimale des patients souffrant d'IOA nécessite une prise en charge multidisciplinaire. Elle sous-entend d'avoir une bonne connaissance de l'écologie bactérienne locale (type de bactéries impliquées, profils de résistance aux antibiotiques). Les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans les IOA sont les staphylocoques (*Staphylococcus aureus* et staphylocoques à Coagulase Négative (SCN)). *Staphylococcus epidermidis* étant le principal SCN rencontré, peu de données existent dans la littérature sur les IOA dues à d'autres SCN.

C'est l'objectif de notre étude qui s'est intéressée plus particulièrement aux IOA à *S. lugdunensis*, *S. caprae* et *S. capitis* dans les services d'Orthopédie et de Traumatologie du CHU de Toulouse. Nous avons voulu savoir si ces 3 staphylocoques étaient particulièrement impliqués dans les IOA, quelles étaient les articulations les plus souvent touchées et si ces IOA survenaient-elles plutôt sur matériel. Afin de mieux appréhender l'implication de ces espèces, nous nous sommes posés la question de la justesse de leur identification au laboratoire (avec l'apport de la spectrométrie de masse) ; et de la capacité de ces 3 espèces à former du biofilm.

Après quelques rappels sur les staphylocoques et la prise en charge générale des IOA, nous présenterons les données épidémiologiques des IOA à ces trois staphylocoques et leurs profils de résistance aux antibiotiques. Dans la dernière partie de ce travail nous aborderons l'activité de certains antibiotiques, notamment la minocycline, dans un modèle de biofilm à *S. capitis* et *S. caprae*.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

1 Généralités sur les staphylocoques

1.1 Caractéristiques et identification

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires, présentent dans la flore résidente de la peau de l'Homme et des animaux et de façon transitoire dans les autres flores. Morphologiquement, ce sont des cocci à Gram positif, groupés en amas (d'où l'origine de leur nom « *staphyle* » qui désigne la grappe de raisin en grec). Certaines de ces espèces sont rencontrées chez l'Homme et l'animal (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*), d'autres espèces sont rencontrées plus particulièrement chez l'Homme (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*) ou chez plus souvent chez l'animal (*S. caprae*, *S. pseudintermedius*...).

Les staphylocoques sont classiquement divisés en deux catégories :

- Ceux produisant une coagulase libre : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*...(attention à *S. lugdunensis* qui possède une coagulase liée)
- Ceux n'en produisant pas : ils sont appelés staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) ou *Staphylococcus non aureus*.

Les staphylocoques sont des germes peu exigeants, ils ont un métabolisme aérobie-anaérobie facultatif et se cultivent facilement sur les milieux usuels de laboratoire à 37°C . Ils présentent une activité catalase, ce qui les différencie du genre *Streptococcus*.

Si l'identification du genre est basée sur les critères cités ci-dessus, les différentes espèces du genre *Staphylococcus* présentent des caractéristiques biochimiques différentes. Ce principe est utilisé pour leur identification au moyen de galeries biochimiques commercialisées et adaptées à la routine d'un laboratoire. Une autre technique plus récente que nous aborderons plus tard dans ce travail consiste en l'identification de la bactérie par son spectre protéique à l'aide de la spectrométrie de masse. Le *Tableau 1* représente les différents critères biochimiques d'identification de ces germes.

Tableau I : Identification des staphylocoques grâce à leurs caractéristiques biochimiques et culturels (d'après (3))

Summary of the tests used in the first step of the simplified method for the identification of human *Staphylococcus* species

Species	Coagulase	D-Xylose	Sucrose	D-Trehalose	Maltose	Manitol	Anaerobic growth thioglycolate	Hemolysis
<i>S. aureus</i> ^a	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> ^a	+	-	+, -	-	-	+, -	+	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> ^b	-	-	-	+, -	-	-	+	+
<i>S. epidermidis</i> ^a	-	-	+	-	+	-	+	+, -
<i>S. haemolyticus</i> ^b	-	-	+	+	+	+, -	+	+
<i>S. saprophyticus</i> ^b	-	-	+	+	+	+, -	+	-
<i>S. warneri</i> ^b	-	-	+	+	+	+, -	+	+, -
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> ^a	-	-	+	+, -	+	-	-	-
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> ^b	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. simulans</i> ^a	-	-	+	+, -	±	+	+	+, -
<i>S. lugdunensis</i> ^b	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> ^a	-	-	+	-	-	+	+	+, -
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> ^a	-	-	+	-	+	+	+	+, -
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ^b	-	-	-	+	+, -	+, -	+	+, -
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i> ^b	-	-	-	+	+	+	+	+, -
<i>S. xylosus</i> ^a	-	+, ±	+	+	+	+	+, -	-
<i>S. caprae</i> ^b	-	-	-	+	+, -	+, -	+	+, -

On remarque ainsi que la majorité des staphylocoques peut pousser en anaérobie et que l'hémolyse sur gélose au sang est inconstamment présente. *S. lugdunensis* quant à lui, présente une hémolyse constante et ne fermente pas le mannitol.

Pour exemple, l'identification de *S. caprae* repose sur les caractères principaux suivants dont tous ne sont pas présentés dans le Tableau II: caractères positifs pour Dnase, PYR (=pyrrolydonyl-arylamidase), uréase, lactose tréhalose...et caractères négatifs pour ODC (=ornithine décarboxylase). Le diagnostic différentiel avec les souches Dnase positive se réalise avec la coagulase et le PYR pour *S. aureus*, le PYR pour *S. capitis*, l'ODC pour *S. lugdunensis* (4). Ainsi, l'identification précise de l'espèce n'est toujours pas aisée, notamment en raison de l'inconstance de certains de ces caractères (Tableau II).

Tableau II: Différences d'identification entre les staphylocoques DNase+ (d'après (5))

Staphylococcal species	% Positive				
	Tube coagulase	Ornithine decarboxylase	Mannitol	Maltose	PYR ^b
<i>S. caprae</i> (n = 38)	0	0	95	89	100
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (n = 133)	99	0	94	100	0
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (n = 39)	0	0	97	3	0
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> (n = 36)	0	0	97	100	0
<i>S. intermedius</i> (n = 86) ^c	94	0	13	100	99
<i>S. lugdunensis</i> (n = 109)	0	100	1	100	99
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> (n = 31)	6 (weak)	0	0	0	100

PYR = pyrrolydonyl aminopeptidase, ^c = souches animales

1.2 Pouvoir pathogène et facteurs de virulence

S. aureus ou « staphylocoque doré » en référence à son aspect en culture (colonies jaunes) représente l'espèce la plus rencontrée en pathologie humaine. Le site de colonisation préférentiel chez l'Homme est la muqueuse nasale, avec environ 30% des adultes porteurs (6). Les zones cutanées humides sont elles aussi préférentielles. Il est responsable d'infections suppuratives très diverses, superficielles ou profondes. Il est classiquement à l'origine d'infections cutanéomuqueuses comme des folliculites, panaris, impétigos, ou des infections invasives comme les dermo hypodermes nécrosantes, bactériémies ou infections ostéo-articulaires. *S. aureus* peut aussi être incriminé dans des pneumopathies, des infections ORL et oculaires. Cette pathogénicité accrue est liée à l'existence de nombreux facteurs de virulence : coagulase, protéases, nucléase thermostable, ainsi que la possibilité de produire différentes toxines selon les souches. Ces dernières sont, pour les plus fréquemment retrouvées :

- entérotoxines thermostables responsables de toxi-infections alimentaires
- exfoliatines (syndrome de « la peau ébouillantée »)
- toxine du choc staphylococcique (TSST-1)
- leucocidine de Panton Valentine (ou PVL) à l'origine de pneumopathies nécrosantes ou de panaris récidivants (6,7).

D'autres facteurs de virulence permettent à *S. aureus* d'envahir les tissus ou de se défendre contre le système immunitaire de l'hôte. En effet il possède des protéines ou toxines aux propriétés cytolytiques, protéolytiques et super-antigéniques (8).

Les SCN ou « staphylocoques blancs » sont reconnus majoritairement comme des bactéries opportunistes responsables d'infections nosocomiales. Trois principaux facteurs favorisent ces infections : l'immunodépression, l'antibiorésistance et la présence de matériel étranger dans l'organisme. Ces SCN peuvent être responsables de bactériémies, d'endocardites, d'IOA, de méningites post-opératoires ou sur matériel de dérivation, de conjonctivites, d'endophtalmies...(6,7). Les SCN sont pris en compte et identifiés lorsque les circonstances de leur isolement indiquent qu'ils sont potentiellement pathogènes : souches identiques isolées sur plusieurs prélèvements simultanément ou à plusieurs jours d'intervalle au niveau du même site (9). *S. epidermidis* est le plus fréquent des SCN identifié dans les prélèvements humains, il possède des facteurs d'adhérence et de production de biofilm (10). Cette capacité permet de coloniser des surfaces telles que des cathéters, prothèses et de disséminer secondairement. D'autres espèces ont été reportées dans la littérature comme pouvant être pathogènes, c'est le cas de *S. caprae* (11) et *S. lugdunensis* (12). En effet, *S.*

lugdunensis peut être responsable d'infections sévères locales (infections cutanées ou IOA) ou systémiques (endocardites) de manière similaire aux infections à *S. aureus* (12). Par exemple, la plus grande série de cas d'IOA à *S. lugdunensis* fait état de 28 épisodes infectieux chez 22 patients sur une période de 9 ans à la *Mayo Clinic* (Etats-Unis) (13). *S. caprae* a été décrit comme responsable d'IOA, d'endocardites et d'infections urinaires (11,14). Quant à *S. capitis*, certains auteurs l'ont identifié comme responsable de bactériémies (15) et d'IOA sur matériel (16).

1.3 Staphylocoques et biofilm

Les bactéries du genre *Staphylococcus* ont une aptitude à former des « biofilms » adhérant à des surfaces très diverses, avec une implication directe en pathologie humaine. Actuellement, il est considéré qu'environ 70% des infections chroniques sont en lien avec la formation de biofilm, tous genres ou espèces confondus. Nous allons voir dans cette partie des généralités sur la formation des biofilms et ce que cela implique pour le traitement. Dans la partie expérimentale, nous développerons l'évaluation de l'activité d'antibiotiques sur un modèle de biofilm.

1.3.1 Définitions

Les bactéries peuvent se rencontrer sous divers états physiologiques. **On différencie les bactéries planctoniques des bactéries sessiles.** Les premières sont en suspension dans un environnement aqueux et dans ces conditions présentent une sensibilité aux antibiotiques (selon le spectre défini) ou aux anticorps ; elles représentent la forme principalement utilisée au laboratoire. Les secondes ont la caractéristique d'être adhérentes à des surfaces (abiotiques ou inertes) ou à des cellules de leur environnement (vivantes ou biotiques) et de se multiplier sous forme adhérente. Ce mode d'existence (ou de persistance) leur confère une protection contre les agressions chimiques, physiques ou immunitaires ; elles constituent la forme la plus fréquemment rencontrée dans la nature, mais également dans les écosystèmes humains et animaux.

Plusieurs définitions peuvent être retenues. Celle de Costerton et *al.* (17) décrit le biofilm comme une « communauté structurée de cellules bactériennes incluses dans une matrice polymérique autoproduite et adhérentes à une surface inerte ou vivante ». D'autres auteurs allègent la définition comme Carpentier et Cerf (18) qui simplifient en une « communauté de microbes englobés dans une matrice organique polymérique et adhérents à une surface ». Quelle que soit la définition, il faut plusieurs entités pour constituer un biofilm : le

microorganisme (ou plutôt les microorganismes), le glycocalyx ou complexe d'exopolymères dont des polysaccharides qui va servir de colle avec la surface d'adhésion, la surface en présence elle-même et enfin le milieu environnemental.

1.3.2 Physiopathologie et Cycle du biofilm

1.3.2.1 Pathogénèse

La formation du biofilm est un processus en plusieurs étapes qui nécessite l'adhésion des bactéries à une surface, suivie de la croissance des cellules bactériennes et la création d'un premier consortium appelé microcolonie, pour aboutir à un biofilm multicouches où les cellules sont engluées dans le « slime », qui progressivement va recouvrir l'ensemble du biomatériau qui sera alors colonisé (19). La notion préliminaire concerne le rapprochement de la bactérie du support ou phase de transfert qui met en jeu des phénomènes aléatoires, mais également orientés tels que le chimiotactisme. Lorsque la bactérie atteindra une distance d'environ 50 nm par rapport à la surface, le processus pourra se mettre en place.

La première étape consiste en une adhérence réversible d'ue aux interactions électrostatiques, généralement répulsives (charges négatives au niveau des deux surfaces en présence) et aux forces de Van Der Waals attractives. Les conditions environnementales en termes de pH, oxygénation, température etc... doivent être appropriées. Le phénomène est favorisé par l'hydrophobicité d'une part des matériaux (métal, polymères) et de la paroi bactérienne (exemple : nombreux acides teichoïques chez les staphylocoques) (20). Par la suite (distance de l'ordre du nm), l'adhérence va devenir irréversible grâce à la mise en place de nombreuses interactions de faible énergie (liaisons H,...) et à la synthèse d'une matrice extracellulaire composée d'exopolysaccharides.

L'étape suivante est constituée par la division cellulaire sous forme adhérente, conduisant à la formation de microcolonies. Enfin, on observe le passage d'un biofilm précoce à un biofilm mature. La matrice extracellulaire sert de protection pour la formation de micro colonies qui vont sécréter de nombreux médiateurs bactériens pour faciliter la coordination cellulaire en fonction du microenvironnement et de la densité cellulaire : ce mécanisme est appelé le « quorum sensing ».

Le biofilm mature est alors constitué d'amas bactériens englués dans le slime, caractérisé par une hétérogénéité de populations et pouvant varier en épaisseur de quelques micromètres à même quelques millimètres. Parallèlement, il y a possibilité de décrochage et de dispersion de certaines bactéries ou amas issus du biofilm, entraînant la colonisation d'autres surfaces.

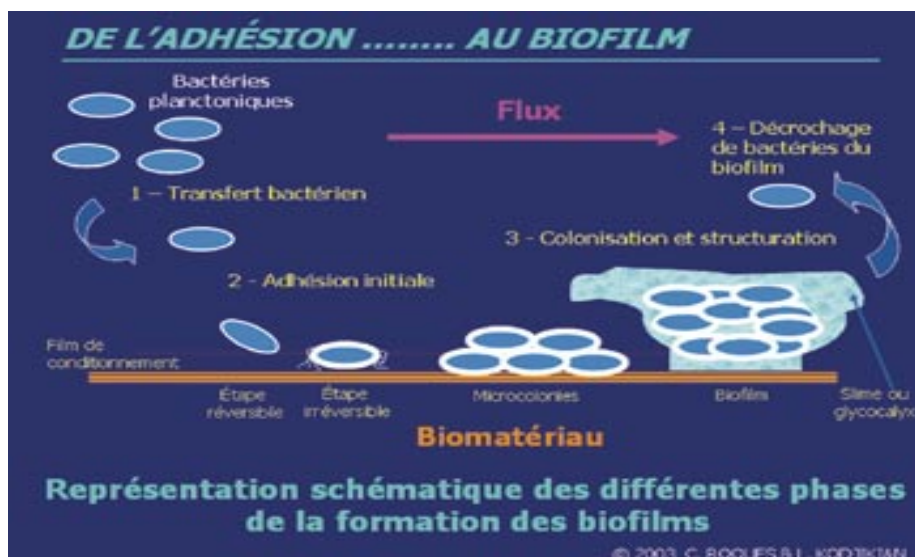


Figure 1 : Représentation schématique des différentes phases de la formation des biofilms (d'après (21))

Le biofilm est de ce fait une communauté dynamique en évolution constante. Elle représente la forme de survie la plus répandue et se structure rapidement comme le met en évidence la Figure 2.



Figure 2 : Colonisation du *n*-butyl-2-cyanoacrylate par *S. aureus* vue au microscope électronique (d'après (22))

1.3.2.2 Composition et métabolisme

Le biofilm est constitué d'une très grande proportion d'eau, il piège aussi les éléments nécessaires à la vie bactérienne (ions, lipides, protéines...) ou issus de l'activité cellulaire (ADN...) et l'attraction de nouvelles bactéries sera d'autant plus forte que la phase liquide sera pauvre en substances nutritives.

Cependant, deux caractéristiques sont à souligner :

- à l'intérieur de cette structure, le transfert des nutriments peut être limité, de par la nature hydrophile et polyanionique de la matrice. De nombreux travaux ont révélé l'existence de canaux aqueux permettant une « circulation » des fluides et nutriments. Cependant, l'accès à la cible cellulaire reste limité.
- le métabolisme bactérien est modifié quand les bactéries sont sous forme sessile, et celles situées dans les couches les plus profondes ou internes du biofilm ont une vitesse de croissance et de division ralentie, telles que les « small colony variants » (SCV). Ainsi, la division cellulaire est 5 à 15 fois plus lente dans un biofilm que sous forme planctonique (23).

Ces deux mécanismes sont impliqués dans la perte de sensibilité aux antibiotiques des bactéries sous forme biofilm (réduction du transfert de masse au sein de la matrice, non accessibilité ou moindre pertinence de la cible).

1.3.3 Implication médicale

Il est possible de différencier les biofilms environnementaux des biofilms des dispositifs médicaux. Les premiers sont généralement très complexes, plurimicrobiens (bactéries, champignons, algues, déchets), alors que les seconds sont plus simples, généralement monomicrobiens et ont des conséquences diagnostiques et thérapeutiques directes.

Parmi les différentes bactéries pouvant produire du biofilm, les staphylocoques (*S. aureus* ou SCN) prennent une place prépondérante : on peut les retrouver au niveau des cathéters veineux ou urinaires, des prothèses cardiaques, des prothèses articulaires, vocales, des lentilles de contact et des dispositifs intra-utérins (17). La présence d'un petit inoculum bactérien à la base, associé à des micro-environnements spécifiques et à un support et ses microanfractuosités permet le développement et la persistance d'un biofilm.

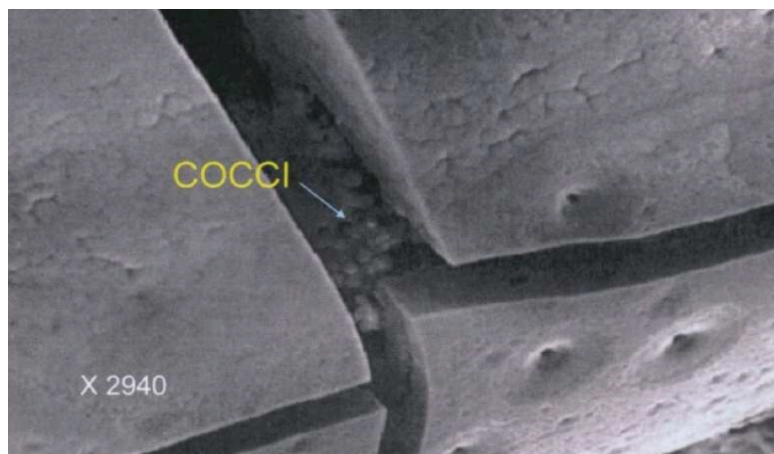


Figure 3 : Cocci organisé en biofilm au fond d'une cassure (d'après (24))

Une des principales implications médicales directes de la formation de biofilm est la résistance aux antibiotiques. Trois raisons permettent d'expliquer cette constatation :

- Premièrement la difficulté de pénétration de l'antibiotique dans la matrice exopolysaccharidique, ce qui diminue son taux de transport et sa fixation au niveau de la cible. Cette perte d'activité peut être également liée à un phénomène de neutralisation/consommation (cas des aminosides).
- Deuxièmement, la vitesse de croissance et le rythme de division ralentis des bactéries, ce qui diminue l'effet des antibiotiques croissance dépendants.
- Enfin, l'environnement immédiat du biofilm a une composition différente en minéraux, taux d'oxygénation...pouvant diminuer encore l'efficacité antibiotique.

Les deux derniers points sont liés et correspondent, via le quorum sensing, à une modification de l'expression génomique chez les bactéries sous forme sessile. De ce fait, les cibles définies pour les antibiotiques sous forme planctonique, peuvent se révéler non adéquates sous forme biofilm.

Les conséquences thérapeutiques peuvent être exprimées *in vitro* par une augmentation significative des concentrations actives entre les formes planctoniques et celles en biofilm. Widmer et al (25) ont démontré l'influence du métabolisme bactérien sur les CMB avec une multiplication de cette dernière par 2,5 pour la rifampicine, par 12,5 pour la vancomycine et par 200 pour la ciprofloxacine entre la phase de croissance bactérienne normale (ou logarithmique) et la phase stationnaire ou ralentie.

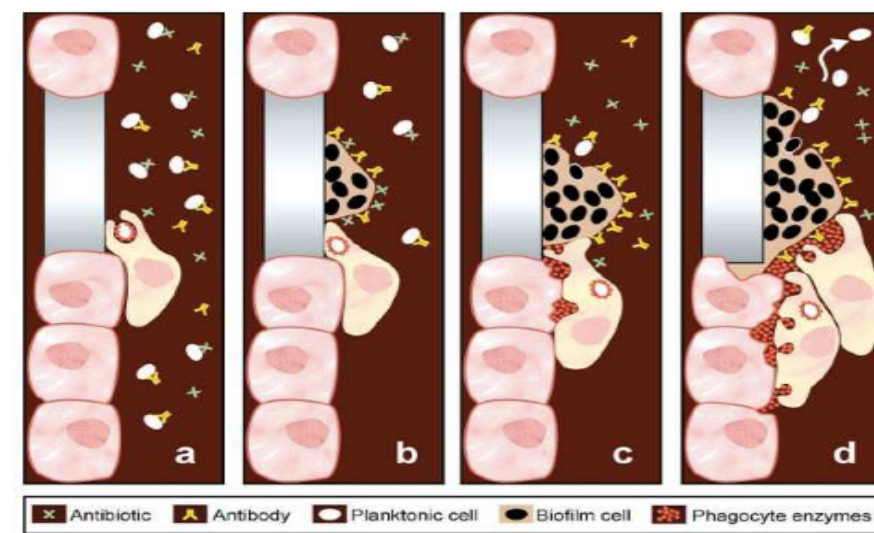


Figure 4: Influence du biofilm sur les antibiotiques et les cellules immunitaires (d'après (17))

La Figure 4 résume la difficulté d'accès des antibiotiques ainsi que des anticorps et cellules phagocytaires pour atteindre les bactéries organisées en biofilm surtout si ce dernier est mature. Il constitue une gangue de protection physique et chimique. La persistance de ces

bactéries peut entraîner la chronicité des symptômes et des rechutes et donc souvent le remplacement de la prothèse infectée. En fait, bien que les bactéries soient protégées par le biofilm, il se crée une réaction inflammatoire locale avec afflux de cellules phagocytaires qui vont être activées par l'environnement cytokinique. Ces cellules vont être responsables d'une lyse cellulaire avec, *in fine*, une ostéolyse et un descellement de la prothèse.

Enfin la question du diagnostic microbiologique est aussi délicate. Les staphylocoques issus du biofilm ne poussent pas facilement sur milieux usuels (ou mettent plus de temps) ce qui peut entraîner un diagnostic faussement négatif. Cela explique aussi la durée de conservation des prélèvements pour le diagnostic des IOA (15 jours) afin de récupérer ces bactéries à croissance lente.

1.3.4 Staphylocoques « variants à petites colonies »

Des formes auxotrophes de *S. aureus* peuvent exister au niveau des bronches des patients atteints de mucoviscidose et au sein de foyers ostéo-articulaires. Ces « variants à petites colonies » (ou SCV pour « small colony variants ») sont responsables de la persistance de *S. aureus* et de la récurrence des infections. Ils constituent des variants métaboliques issus en partie de la pression antibiotique, et cohabitent avec les souches « normales ». Ils sont d'autant plus difficiles à identifier que leur pousse est lente et que certains de leurs caractères biochimiques sont parfois déficients (26). Ces variants peuvent aussi être retrouvés chez les SCN comme *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* et *S. capitis* (27). Cela peut entraîner des récurrences d'infections et une résistance accrue aux antibiotiques (certains d'entre eux étant efficaces sur les bactéries en division, ils sont bien moins efficaces sur les bactéries à métabolisme ralenti).

2 Les infections ostéo-articulaires

2.1 Physiopathologie et classification des IOA

Les IOA représentent une morbi-mortalité importante, qu'elles soient associées ou non à la présence de matériel (prothèse, clou, vis, plaque...). En outre elles compliquent 1 à 2 % des prothèses posées (28,29). L'incidence cumulée des infections est de 0,5 ; 0,8 et 1,4% à respectivement 1 ; 5 et 10 ans d'une arthroplastie de la hanche ou du genou (30). Les deux premières années sont celles où le risque est le plus élevé : 60 à 70% des infections s'observent durant cette période. Lors d'une chirurgie traumatologique en cas de fracture ouverte l'incidence d'IOA peut atteindre 3 voire 5%.

2.1.1 Physiopathologie

Les origines des IOA peuvent être multiples :

- inoculation directe, cela peut être le cas lors d'une fracture ouverte souillée. L'infection est dans ce cas post traumatique et les germes en cause sont souvent d'origine tellurique ou hydrique.
- nosocomiale/iatrogène : l'inoculation directe de microorganismes est aussi possible lors d'une intervention chirurgicale avec mise en place d'un matériel d'ostéosynthèse ou d'une prothèse articulaire ou bien alors au cours d'une ponction articulaire, d'une infiltration ou d'une arthroscopie. L'origine de l'IOA est alors iatrogène (per/post-opératoire ou post interventionnelle) par contamination bactérienne de la plaie. Les germes en cause sont souvent d'origine cutanée (staphylocoques, *P. acnes*, Corynébactéries) ou sont apportés par les instruments chirurgicaux, les gants du chirurgien ou tout autre matériel en contact (Entérobactéries, *Pseudomonas*...).
- extension d'un foyer septique par contiguïté. L'infection progresse et atteint l'os et/ou l'articulation, il convient de rechercher et de traiter aussi le foyer septique d'origine.
- enfin, l'origine peut être hématogène au décours d'une bactériémie ou d'une endocardite. Les germes vont atteindre l'articulation ou l'os notamment au niveau des métaphyses (voir Figure 6); on parle alors d'ostéomyélite.

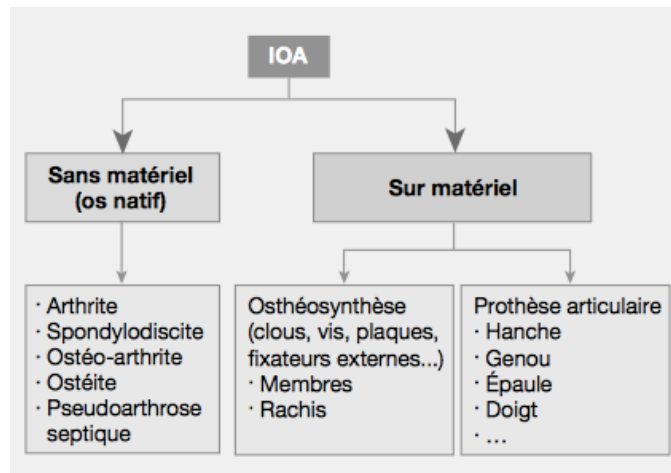


Figure 5: Différents entités cliniques des IOA de l'adulte en fonction de la présence ou non de matériel (d'après le PILLY 2016)

2.1.2 Classification

La classification des IOA peut se découper selon divers critères. En premier lieu, l'élément important est sa localisation : concernant une atteinte isolée de l'articulation on parle d'arthrite, pour une atteinte osseuse isolée cela constitue une ostéite ou une ostéomyélite, sinon l'infection mixte est appelée ostéo-arthrite. La Figure 6 rappelle et situe les éventuels sites d'infections au niveau d'un os long et d'une articulation mobile (cf éléments ci-dessus). Il existe certaines conditions pour parler d'**IOA complexe**. La complexité d'une IOA est définie par l'association de critères concernant :

- le type de programme chirurgical qui nécessite par exemple des gestes majeurs d'excision ou de reconstruction osseuse ou prothétique
- le terrain médical du patient
- la microbiologie (germes impliqués et résistance aux antibiotiques)
- la prise en charge thérapeutique antérieure (31).

Par exemple les ostéo-arthrites des grosses articulations, ostéites ou pseudarthrose nécessitant une reconstruction, l'échec thérapeutique primaire ou l'allergie au traitement antibiotique, une défaillance viscérale etc...entrent dans les cadres d'IOA compliquées ou complexes.

Certains facteurs de risques associés aux infections sur prothèses, plutôt d'ordre général, peuvent être identifiés. Par exemple le diabète, l'obésité (IMC>40), la cirrhose, la polyarthrite rhumatoïde, le tabagisme actif, un temps opératoire >2,5 h, la présence d'un hématome post-opératoire...Cependant, aucun d'entre eux ne permet de prédire la survenue d'une infection précoce (31).

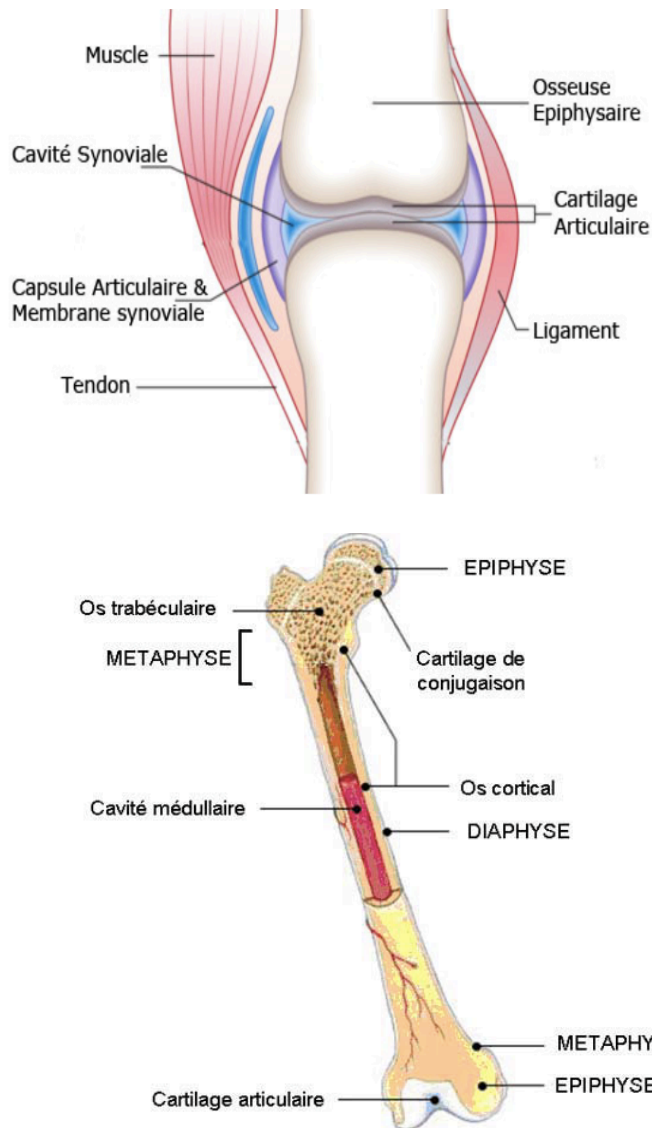


Figure 6: Schéma structurel d'un os long et d'une articulation mobile (d'après images future-sciences.com)

2.2 Éléments de prise en charge des IOA

Les IOA doivent être prises en charge de façon rapide pour avoir le maximum de chances d'éradiquer l'infection et d'améliorer le pronostic fonctionnel de l'articulation. Cette prise en charge s'est structurée depuis 2008, date à laquelle le Ministère de la Santé a reconnu 9 centres de référence des infections ostéo-articulaires complexes (CRIOAC, dont le CHU de Toulouse), qui sont complétés par une quinzaine de centres correspondants. Ces centres ont des missions de coordination des soins, d'expertise, de formation et de recherche (31).

2.2.1 Éléments diagnostiques

2.2.1.1 *Arguments cliniques*

Les IOA peuvent survenir suivant différents modes. On parle d'infection aiguë sur matériel étranger lorsque celle-ci survient avant 21 jours, d'infection précoce si elle est inférieure à 3 mois et tardive si elle est supérieure à 3 mois. Une infection est qualifiée de nosocomiale jusqu'à un an après l'intervention mais les IOAC tardives/chroniques peuvent se déclarer de nombreuses années après la chirurgie (parfois > 10 ans).

Du point de vue clinique, certains éléments vont être évocateurs : un incident cicatriciel (écoulement, fistule, absence ou retard de cicatrisation, désunion), une (ré)apparition ou augmentation de la douleur locale avec +/- la présence d'un épanchement, un dysfonctionnement de prothèse évolutif (descellement) avec dégradation de la récupération fonctionnelle et un syndrome septique avec la présence de signes généraux (fièvre, frissons). L'infection aiguë associe volontiers des signes inflammatoires locaux (abcès, douleur...) et un syndrome fébrile alors que l'infection chronique est évoquée sur des signes souvent plus discrets à savoir une limitation fonctionnelle, une rougeur locale, un œdème, un épanchement, ou une fistule.

Les manifestations cliniques des IOA dépendent aussi de la virulence du germe en cause, de l'origine de l'infection, du statut immunitaire du patient, de l'atteinte des tissus adjacents...Par conséquent, et en tenant compte du fait qu'il s'agisse parfois d'urgence diagnostique, il est recommandé d'analyser certaines données fondamentales pour la prise en charge des IOA : le mode de contamination suspecté, le délai de contamination permettant de différencier l'infection post-opératoire de l'infection hématogène, l'état infectieux, la localisation ainsi que l'état mécanique du foyer infecté, l'état des parties molles ainsi que de la peau et enfin le statut du malade.

2.2.1.2 *Arguments paracliniques*

La radiologie occupe une part importante dans le diagnostic des IOA. La **radiographie standard** permet de mettre en évidence une ostéolyse, une ostéocondensation, une chondrolyse, des séquestres, des appositions périostées... mais sa sensibilité reste faible. Le **scanner** procure une analyse osseuse meilleure en termes de sensibilité mais la présence de matériel d'ostéosynthèse entraîne d'importants artefacts pouvant gêner l'interprétation des résultats. L'**IRM** est encore plus précise, elle permet de mettre en évidence des signes plus précoces, une meilleure caractérisation des tissus périphériques, parties molles, collections et abcès intra osseux. L'**échographie** est une méthode intéressante en présence de matériel car les images échographiques ne sont quasiment pas influencées par des artefacts liés au matériel métallique, en revanche l'analyse des

structures osseuses profondes est plus compliquée. L'utilité est surtout dans la recherche de collections des parties molles au contact de l'os et de permettre une ponction guidée des épanchements intra-articulaires (32). D'autres procédés permettent d'étayer le diagnostic d'infection sur prothèse comme la scintigraphie osseuse et le TEP scan. La première est un examen « de débrouillage » caractérisé par une bonne sensibilité mais une spécificité assez faible entraînant de possibles faux positifs. La scintigraphie aux polynucléaires neutrophiles marqués *in vitro* est plus spécifique de l'activité infectieuse avec des images à 30 minutes, 3 et 24 heures. Le TEP scan utilise un analogue du glucose marqué au Fluor 18 dont la fixation va être favorisée dans les cellules de l'inflammation, mais de manière non spécifique.

L'examen anatomopathologique des biopsies per-opératoires est recommandé pour le tissu osseux et la synoviale. La mise en évidence de polynucléaires neutrophiles (minimum 5 au grossissement x400 sur 5 champs) est en faveur d'un processus inflammatoire. Cet examen est aussi utile pour orienter le diagnostic vers une infection fongique ou à mycobactéries (29).

D'autres examens de biologie peuvent être prescrits pour étayer le diagnostic et la suspicion d'inflammation. Par exemple le dosage de la **CRP** (protéine C réactive), même si une CRP normale n'exclue pas une IOA, la **VS** (vitesse de sédimentation) ou la **PCT** (procalcitonine) plus spécifique d'une infection d'origine bactérienne (33). Une méta-analyse met en avant que les dosages de l'**IL-6** (interleukine 6) et de la CRP semblent être les meilleurs marqueurs inflammatoires pour le diagnostic des IOA, bien que l'IL-6 ne soit pas encore adaptée en routine (34). Bottner *et al.* (35) ont cependant conclu que la PCT est aussi spécifique que le dosage de CRP mais beaucoup moins sensible (33% versus 95%), de la même manière que le **TNF- α** (Tumor necrosis factor), qui ne sont donc pas indiqués dans la démarche diagnostique des IOA.

2.2.2 Traitement médico-chirurgical

2.2.2.1 *Prise en charge chirurgicale*

La prise en charge thérapeutique des IOA n'est pas seulement médicale grâce à un traitement antibiotique, elle est aussi et souvent chirurgicale. La chirurgie pratiquée dépend du contexte de l'infection, de sa localisation, de l'état de l'articulation ou de l'os et bien sûr de la présence ou non de matériel. Le sujet de ce travail n'est pas de détailler cette prise en charge, néanmoins on ne peut pas éluder le versant chirurgical en abordant le thème des IOA. Le traitement chirurgical doit atteindre trois objectifs à savoir l'éradication de l'infection, la sauvegarde du capital osseux et la préservation de la fonction articulaire.

Dans le cas d'une arthrite aiguë, il y a plusieurs possibilités selon le degré d'évolution allant du lavage articulaire réalisé sous arthroscopie, à une arthrotomie et synovectomie ou résection articulaire totale ou arthrodèse. En cas d'infection aiguë sur matériel, le chirurgien peut être amené à réaliser un nettoyage articulaire et péri-articulaire sans forcément changer la prothèse. Si l'infection de cette dernière est chronique, l'ablation et la réimplantation du matériel prothétique est de mise. Cette chirurgie peut être effectuée en « 1 temps » avec documentation microbiologique, c'est à dire si une ponction a été réalisée au préalable. Dans ce cas, le germe en cause doit être facilement traitable (pas de BMR, de *P. aeruginosa*...), le terrain clinique non compliqué et ce doit être si possible la première reprise. Si ces conditions ne sont pas réunies, la dépose et la repose se font généralement en « 2 temps ». Un espaceur en ciment peut être implanté pour faciliter la repose de prothèse ultérieure et permettre la mobilisation. Ce ciment a la particularité de pouvoir contenir des antibiotiques (gentamicine, vancomycine et clindamycine). L'intervalle de temps entre les gestes de dépose et de repose est variable, ce qui conditionnera des « 2 temps longs » et des « 2 temps courts ». Le délai de repose idéal n'est pas défini. Pour le « 2 temps court » le délai recommandé est de 4 à 6 semaines pendant lesquelles l'antibiothérapie est dispensée, ce délai varie de 3 à 6 mois pour le « 2 temps long » (29). Les prélèvements bactériologiques et histologiques sont réalisés au moment de la repose et conditionnent la poursuite ou l'arrêt de l'antibiothérapie, comme les paramètres biologiques de l'inflammation. La Figure 7 résume ces différents temps chirurgicaux.

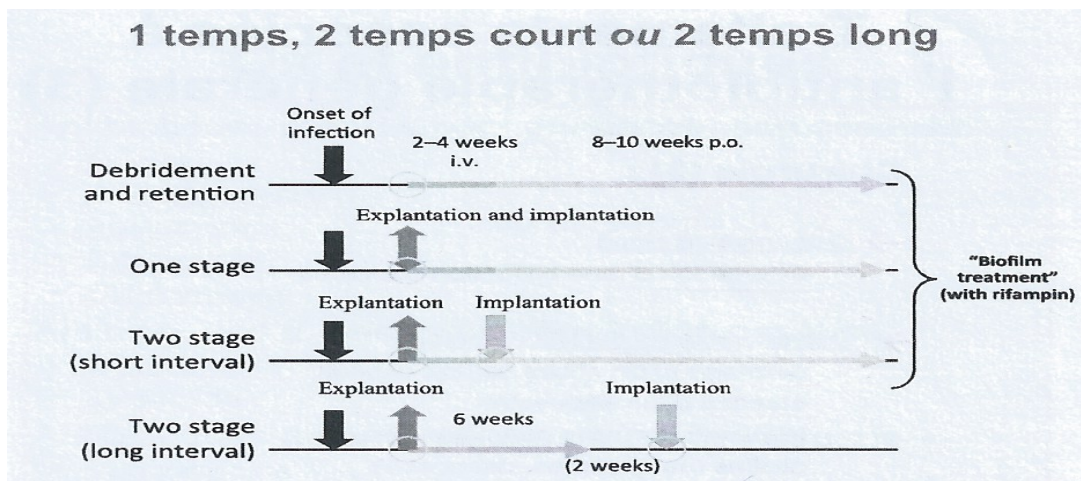


Figure 7: Modalités de prise en charge chirurgicale concernant la dépose et la repose de prothèse (d'après (36))

2.2.2.2 Prise en charge anti infectieuse

Le traitement médical, quant à lui, repose sur une antibiothérapie qui doit répondre à certains critères pour être prescrite:

- documentation du germe en cause (ou alors probabiliste et large spectre puis adapté secondairement à l'antibiogramme)
- bonne pénétration osseuse
- administration par voie intra veineuse pour avoir rapidement des concentrations plasmatiques et surtout osseuses efficaces, et débutée par une association de deux antibiotiques (ne pas utiliser la rifampicine, l'acide fusidique, les fluoroquinolones en monothérapie).

Le choix des antibiotiques, en complément du traitement chirurgical, est primordial. L'antibiothérapie idéalement souhaitée répond à plusieurs exigences :

- bonne diffusion osseuse,
- bactéricide *in situ*
- activité persistante sur les bactéries adhérentes, organisées en biofilm
- diffusion intra phagocytaire
- faible pouvoir de sélection de mutants résistants
- bonne tolérance en utilisation prolongée
- bonne biodisponibilité si administration par voie orale.

Bien que le tissu osseux soit hétérogène (l'os spongieux est bien vascularisé alors l'os cortical est plus inerte), il est possible de classer les antibiotiques selon leur pénétration osseuse déterminée par un ratio os/sang. Il existe ceux à « très bonne pénétration osseuse » (ratio > 30%) : quinolones, acide fusidique, fosfomycine, rifampicine, clindamycine, cyclines ; ceux à « bonne pénétration osseuse » (ratio 15-30%) : bêta-lactamines, linézolide ; et ceux à pénétration osseuse « moyenne » (ratio < 20%) : glycopeptides.

La durée de l'antibiothérapie n'est pas standardisée. Elle est généralement de deux semaines en IV initialement aux posologies maximales type bactériémie, puis le relais per os sera envisagé si l'évolution clinique est bonne, s'il n'y a pas de collection, cela pour limiter les problèmes d'accès veineux et réduire la durée d'hospitalisation. La durée totale de traitement est comprise entre 6 semaines et 12 semaines, au-delà la poursuite thérapeutique doit être argumentée.

Classiquement, le traitement antibiotique des IOA à staphylocoques associe le couple rifampicine (antibiotique sensé être le plus efficace sur le biofilm, que nous aborderons plus précisément) et une fluoroquinolone. Nous ne détaillerons pas les schémas thérapeutiques mais citons ici d'autres antibiotiques pouvant être prescrits en phase initiale en IV comme l'oxacilline (si staphylocoque méti-S), la vancomycine (si staphylocoque méti-R), la daptomycine, ou en relais par voie orale la minocycline, la clindamycine, l'acide fusidique, et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. La rifampicine apparaît comme l'antibiotique de choix, elle doit être introduite précocement mais pas d'emblée pour laisser le temps à l'antibiotique

coadministré de diminuer l'inoculum afin d'éviter le risque de sélection de mutants résistants. La question se pose pour le choix de l'antibiotique à associer à la rifampicine. En cas d'impossibilité de prescrire une fluoroquinolone, la minocycline peut s'avérer être un antibiotique efficace, ce sera l'objet de la dernière partie de notre travail.

La surveillance du traitement antibiotique se fera habituellement à l'aide de la NFS, appréciation de la fonction rénale, hépatique, CRP, et éventuellement dosage des antibiotiques. La tolérance du traitement est importante d'autant plus que sa durée est longue. Le suivi de patient à long terme associera des considérations cliniques (réadaptation fonctionnelle, douleur, confort...), radiologiques et biologiques. Cette surveillance sera espacée au fil du temps mais le patient doit être informé des différents signes d'alertes à reconnaître si l'évolution de sa prise en charge n'est pas bonne. En effet, après la pose d'une prothèse, une IOA peut apparaître de manière très tardive, même des années après le geste chirurgical.

Afin de synthétiser ces informations, les recommandations HAS actuelles concernant le diagnostic et la prise en charge d'une infection sur PTH ou PTG dans le mois suivant l'implantation sont présentées en Annexe 1. En Annexe 2, un algorithme décisionnel de prise en charge d'IOA aiguë ou sur prothèse suivant Peel et *al.* est disponible.

La prise en charge des IOA est complexe d'autant plus qu'il existe relativement peu de référentiels, consensus, et d'études randomisées. C'est un argument de plus pour que les discussions et la prise de décision se fassent de manière collégiale et que la prise en charge soit multidisciplinaire. Enfin, la connaissance de l'écologie bactérienne (types de bactéries impliquées, profils de résistances retrouvés fréquemment) des services d'Orthopédie Traumatologie est un avantage non négligeable.

2.3 Diagnostic microbiologique des IOA

2.3.1 Prise en charge des prélèvements au laboratoire

Le diagnostic microbiologique constitue, avec la clinique, la radiologie et l'anatomopathologie, une étape clé du diagnostic des IOA. Tout d'abord pour savoir si la cause du dysfonctionnement articulaire est d'origine aseptique ou septique et, si tel est le cas, pour identifier le ou les germes incriminés ainsi que tester leur sensibilité aux antibiotiques ou aux antifongiques. Ce diagnostic peut être rendu difficile car les bactéries incriminées appartiennent à des espèces variées, appartenant à la flore commensale cutanée ou muqueuse et elles présentent pour certaines d'entre elles une croissance lente

ou difficile. Une démarche rigoureuse, sûre et la plus rapide possible est nécessaire pour adapter au mieux le traitement. Le RÉMIC (référentiel en microbiologie médicale) sert de référentiel pour les bonnes pratiques à réaliser au laboratoire (37).

2.3.1.1 Types de prélèvements

Plusieurs types de prélèvements peuvent être réalisés pour argumenter le diagnostic. Ils doivent être réalisés dans des conditions d'asepsie, logiquement ce sont donc les prélèvements les plus profonds et ceux réalisés au bloc opératoire qui seront les plus contributifs.

Les prélèvements superficiels de plaies, de fistule ou d'écoulement sont à proscrire car le plus souvent contaminés par la flore cutanée. Cependant, une étude espagnole (38) a démontré 80% de concordance entre des prélèvements superficiels (par eSwab) et des prélèvements profonds, c'est-à-dire qu'au moins un microorganisme commun a été trouvé entre les deux types de prélèvements. La concordance est bonne pour *S. aureus* ou les bacilles à Gram négatif (respectivement 100% et 85% des cas) mais en revanche l'isolement de SCN est peu prédictif de ce qui est retrouvé dans les prélèvements profonds. La règle à retenir est donc de ne jamais réaliser de prélèvement superficiel par écouvillonnage.

Les liquides de ponction (pus et liquide articulaire) doivent être recueillis en partie dans un tube hépariné pour éviter la coagulation et réaliser l'analyse cytologique ainsi que dans un tube ou pot sec stérile prévu à cet effet. De plus, des **flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie doivent êtreensemencés** si la quantité de liquide est suffisante. Cette pratique permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité diagnostique ainsi que de diminuer les éventuels risques de contamination lors de la manipulation du liquide, en particulier lors de l'ensemencement (39). Une étude de Roberts *et al.* (40) sur des prélèvements de prothèse de hanche a montré une sensibilité de 87% et une spécificité de 95% lorsque le liquide synovial est inséré dans des flacons d'hémocultures.

L'analyse du liquide synovial sera réalisée avec premièrement un comptage cytologique comprenant une formule (polynucléaires neutrophiles et cellules mononuclées) pour évaluer le caractère inflammatoire du liquide, et secondairement la culture bactériologique. L'aspect, la couleur, la viscosité du liquide ainsi que la présence de cristaux sont aussi notés. **On parle de liquide inflammatoire pour un nombre de leucocytes supérieur à 2000/mm³ avec plus de 50% de polynucléaires neutrophiles.** Cependant, dans le cas d'une arthrite septique, ces valeurs sont généralement plus élevées, à fortiori si le processus est aiguë (10000/mm³). Dans le cas d'une infection sur prothèse, ces valeurs sont inférieures : plus de 1700 éléments/mm³ avec 65% de PNN sont généralement très évocateurs d'une infection.

En revanche, un liquide synovial classé inflammatoire n'est pas obligatoirement septique (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite, goutte...), d'où l'intérêt de la

culture. Enfin, la sensibilité de la culture du liquide synovial est meilleure dans le cas d'une infection sur prothèse aigüe (91%) que chronique (79%) (41).

Il y a possibilité de réaliser des biopsies en préopératoire, qu'elles soient osseuses ou tissulaires. Sadiq *et al.* (42) ont mis en évidence 70% de concordance entre ces prélèvements préopératoires et ceux peropératoires, avec 10% de cas négatifs en préopératoire et positifs en peropératoire. Globalement, la sensibilité et la spécificité sont de 88% et 91% pour ce type de prélèvements dans le diagnostic des IOA.

Enfin, la mise en culture des prélèvements peropératoires constitue l'aide microbiologique la plus importante. On peut citer par exemple comme prélèvements anatomiques : biopsie synoviale, os, capsule, membrane d'interposition ; et comme prélèvement de matériel : matériel prothétique ou une partie de celui-ci, matériel d'ostéosynthèse (vis, ciment, tige, plaque), fiche de fixateur externe (le long de la fiche avec une seringue et un cathlon, sans écouvillon) etc...

Point important, **il doit y avoir de préférence plusieurs prélèvements (au minimum 5) au niveau de sites anatomiques différents afin d'être le plus exhaustif possible** (43). Les prélèvements liquides prélevés par aspiration peuvent être transvasés dans un pot de prélèvement (mais risque accru de contamination) ou alors laissés dans la seringue bouchée avec un bouchon spécial (ex : female luer-lock Ref 888.0, Vygon) après avoir chassé l'air, ou ensemencés directement dans des flacons d'hémoculture. Les prélèvements solides sont déposés dans des pots stériles secs ou des milieux de transports, sous double emballage. Des pots contenant des billes en inox destinées au broyage mécanique du prélèvement sont disponibles.

Les prélèvements doivent être acheminés le plus rapidement possible (idéalement dans les 2 heures) au laboratoire à température ambiante, dans un milieu adapté et stérile, si possible dans un délai minimal de 15 jours par rapport à toute antibiothérapie. Un bon de demande spécifique est recommandé. Il doit spécifier les localisations exactes des différents prélèvements ainsi que des informations cliniques et thérapeutiques.

Une petite partie du prélèvement non ensemencée ou de l'échantillon une fois techniqué (en cas de prélèvement de petite quantité) doit être conservé par congélation (-80°C ou à défaut à -20°C) au moins jusqu'au rendu du résultat définitif, idéalement jusqu'à 2 à 4 mois après ce rendu (37).

Il est à noter que lorsqu'il s'agit d'une infection aigüe, l'agent pathogène doit être recherché avant toute antibiothérapie également dans d'autres sites tels que le sang, urines, peau, sphère ORL...

2.3.1.2 Culture et identification

Les prélèvements ostéo-articulaires sont considérés comme des prélèvements précieux et doivent être manipulés sous PSM-2 en utilisant les techniques de manipulation stérile. Un examen direct est réalisé par coloration de Gram (6% de sensibilité mais 99% de spécificité) et un examen cytologique par coloration MGG pour la formule. Une recherche de cristaux peut être faite sur demande explicite pour le diagnostic différentiel de chondrocalcinose et de goutte articulaire aigue.

Les prélèvements liquides peuvent êtreensemencés directement sur les milieux dédiés. Les prélèvements solides (fragments d'os, de tissus) doivent être impérativement broyés dans un environnement confiné. Des dispositifs (homogénéiseurs / disperseurs à billes) permettent de limiter les manipulations et donc les risques de contamination. Le broyage permet de libérer les bactéries de la matrice osseuse et éventuellement du biofilm. L'eau de qualité biologie moléculaire est recommandée par rapport aux bouillons de culture, pour ne pas empêcher une éventuelle analyse par biologie moléculaire. Concernant le matériel d'ostéo synthèse, il peut être directement apposé sur les milieux de culture (solides et liquides) ou alors on ensemence le liquide après agitation au vortex ou sonication (voir chapitre 2.3.2.1).

Le RÉMIC recommande d'ensemencer les liquides ou broyats sur des milieux riches non sélectifs à environ 36+/-1°C dans diverses atmosphères. Au laboratoire du CHU de Toulouse, les ensemencements se font sur plusieurs milieux : gélose au sang de type COS et gélose au sang cuit avec facteurs de croissance (type PVX) en aérobie sous 5% de CO₂, deux géloses incubées en anaérobie (gélose type « Brucella ») ainsi qu'un milieu liquide d'enrichissement non sélectif, le thioglycolate. La lecture des boites incubées sous CO₂ est réalisée à J1, J2, J5 et techniqués s'il y a présence de pousse bactérienne. Le bouillon thioglycolate est repiqué sur milieux solides (COS, PVX et brucella) s'il est trouble à J2 et en absence de croissance sur les autres milieux, même si limpide à J5 ; ces géloses seront lues à J10 et J15 (recherche des germes dits déficients ou à croissance lente comme certains SCN ou *P. acnes*). Les géloses incubées en anaérobie sont lues à J2 et J5 pour la première boite, et J10 et J15 pour la seconde boite, afin de minimiser le risque de contamination lors de la lecture des boites. Ainsi les cultures sont conservées 15 jours, voire 21 jours pour la recherche de *P. acnes* si précisé sur le bon de demande ou après discussion en RCP. Toutes ces opérations doivent être réalisées sous un PSM de type II afin de limiter au maximum la contamination. Enfin, les souches bactériennes isolées sont congelées à -20°C ou -80°C et conservées au minimum 3 ans.

L'identification et l'antibiogramme doivent être réalisés sur toutes les colonies isolées et d'aspect différent. Si la culture solide est positive de manière précoce, cela ne dispense pas de réaliser les lectures suivantes jusqu'à l'incubation complète, car les infections

polymicrobiennes représentent 10-15% des IOA, notamment sur prothèse (37). L'identification était réalisée par des galeries biochimiques d'identification (type Vitek2 Biomérieux® ou galeries API Biomérieux®) jusqu'en février 2014 puis par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Brucker Daltonics®). L'antibiogramme ainsi que la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide ou solide sont obligatoires, en suivant les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie (CA-SFM). L'antibiogramme en milieu liquide est réalisé sur système automatisé Vitek2 (BioMérieux®) ou par la technique de diffusion en milieu gélosé.

Il est important de bien respecter ces procédures car il est fréquent, notamment pour les staphylocoques, d'observer plusieurs phénotypes de résistance et un polymorphisme des colonies pour une même espèce bactérienne et pour un même patient. Certaines microcolonies peuvent signer la présence de variants métaboliques. Ces résultats doivent toujours être confrontés à d'éventuels résultats antérieurs obtenus pour le même patient dans le laboratoire ou dans des laboratoires extérieurs.



Figure 8 : S. lugdunensis sur gélose au sang : plusieurs aspects des colonies mais avec le même antibiogramme. (d'après (44))

2.3.2 Autres techniques et améliorations

Le diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires étant délicat, certaines méthodes peuvent être utilisées pour améliorer la sensibilité, en routine ou à la demande sur justification.

2.3.2.1 *Sonication*

Une des principales limitations de la sensibilité de la culture est l'organisation des bactéries sous forme de biofilm. Parmi les méthodes permettant de déloger et de cultiver les bactéries à la surface de la prothèse, nous pouvons citer la sonication. En effet, il est possible de

traiter le matériel étranger (vis, plaque, pièces prothétiques) avec des ultra-sons pour libérer les bactéries prisonnières du biofilm. Une étude récente (45) a évalué et quantifié l'adhérence bactérienne vis à vis de divers composants de prothèse de hanche (tige fémorale, tête, insert et cupule ou cotyle). Ce travail met en évidence une plus forte proportion de colonies bactériennes adhérees au niveau des structures en polyéthylène (cupule) et confirme la moindre aptitude des colonies à se fixer sur les structures en métal (tige fémorale en titane). Les bactéries isolées préférentiellement étaient *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. aureus* et aussi *S. lugdunensis*. En outre, la sonication des différents éléments prothétiques a permis d'augmenter la sensibilité des cultures bactériennes.

La sonication peut ainsi être réalisée sur divers éléments de prothèses de hanche, de genou, d'épaule, de coude, de cheville... La majorité des études de la littérature des dix dernières années a montré une plus grande sensibilité pour la culture du liquide de sonication (62 à 94% selon les études) par rapport aux méthodes conventionnelles de culture du tissu prothétique seul (54 à 88% selon les études) (46–48). La sensibilité des cultures après sonication est là aussi meilleure chez les patients qui ont reçu une antibiothérapie avant la dépose de la prothèse (46,47).

Un protocole tel que celui-ci peut être proposé : le matériel à analyser est placé dans des récipients stériles adaptés et du bouillon thioglycolate est ajouté. Le pot est placé dans un bac à ultra-sons pendant 5 minutes à la fréquence de 50Hz. Certains auteurs préconisent une homogénéisation au vortex avant et après la sonication (30). Le sonicat (ou liquide de sonication) estensemencé sur les différents milieux de cultures cités plus haut. La réalisation de la coloration de Gram sur le culot est peu sensible (<45%), mais très spécifique (47) et peut permettre une orientation rapide du diagnostic. Ce protocole est utilisé au laboratoire du CHU de Toulouse sur les petits matériels (vis, plaque, tête de prothèse...). La possibilité de sonication sur des prothèses entières est en cours de réflexion.

Un exemple de protocole de sonication est présenté Figure 9.

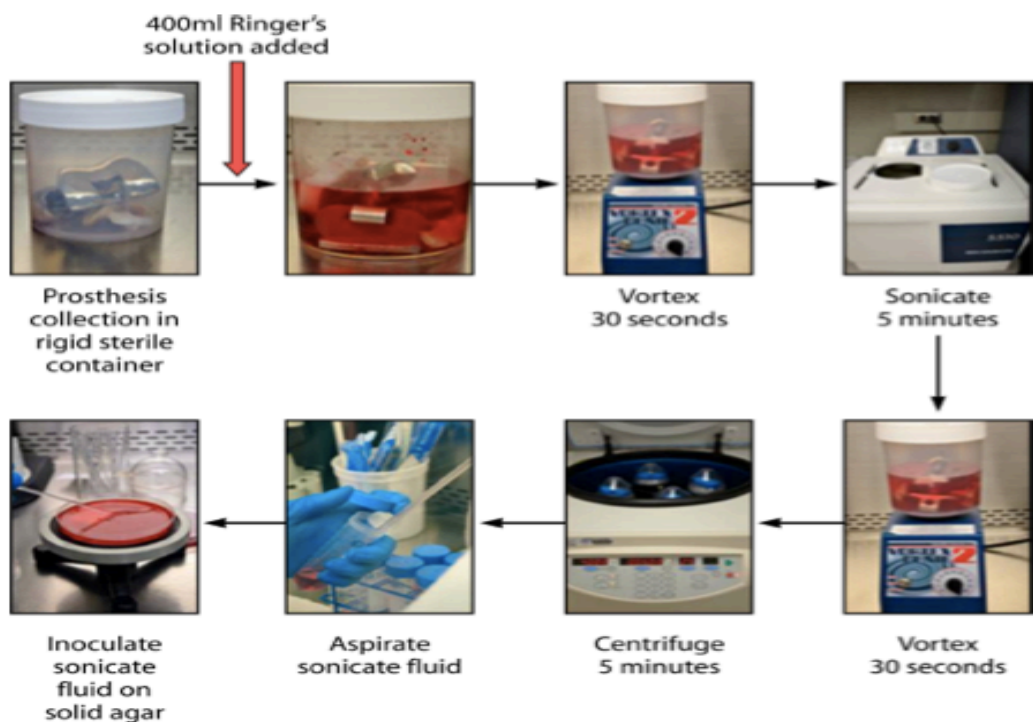


Figure 9 : Protocole de sonication de matériel prothétique utilisé à la Mayo Clinical Microbiology Laboratory. (d'après (30))

2.3.2.2 Biologie moléculaire

L'utilisation de la biologie moléculaire dans le diagnostic des IOA à l'avantage théorique d'une plus grande sensibilité par rapport aux méthodes classiques. Ces techniques peuvent compléter les techniques conventionnelles de diagnostic sans pour autant les remplacer. Elles peuvent être envisagées lorsqu'il y a une forte suspicion clinique ou biologique mais avec une antibiothérapie préalable inhibant la croissance des bactéries en cultures ou alors dans le cas d'une suspicion clinique faible avec des cultures positives posant le problème d'une éventuelle contamination de laboratoire. Dans ce dernier cas, il faut réensemencer le prélèvement conservé congelé afin de confirmer ou d'infirmer une éventuelle contamination des milieux de culture. La présence d'ADN bactérien dans un ou plusieurs prélèvements peut permettre de confirmer l'existence d'une infection non suspectée. Cependant, la sensibilité des techniques de biologie moléculaire est imparfaite ; un résultat négatif n'exclue pas une IOA.

On peut avoir recours à une PCR universelle ciblant l'ADN ribosomal 16S de toutes les bactéries suivie du séquençage ou alors à une PCR spécifique (et plus sensible) ciblant un pathogène en particulier (ex : *S. aureus*, *Staphylococcus spp.*, *K. kingae*...).

Dans la pratique, les différentes études montrent des résultats variés. Dans une étude sur 34 patients atteints d'IOA, Vandercam *et al.* (49) ont évalué les performances de la recherche des gènes de l'ARN 16S ribosomal et du gène *femA* du genre *Staphylococcus* sur des

prélèvements peropératoires (tissus, liquide synovial, écouvillon). Les résultats ont montré 91,2% (31/34 patients) de détection bactérienne par biologie moléculaire, par rapport au 64,7% (22/34 patients) de détection par la culture classique. En d'autres termes, une bactérie a été identifiée uniquement par biologie moléculaire pour 9 patients, dont 7 ayant reçu une antibiothérapie récente.

Achermann *et al.* (50) ont évalué une PCR multiplex en temps réel (SeptiFast, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) pour l'identification d'un nombre limité de bactéries ou de champignons isolés dans les hémocultures. Le pourcentage d'identification bactérienne a été évalué sur les cultures classiques tissulaires, les cultures du liquide de sonication et la PCR sur le liquide de sonication avec des résultats de 65%, 64% et 78% respectivement. Parmi les patients qui ont reçu un traitement antibiotique avant la chirurgie, la PCR sur le liquide de sonication a permis de détecter 100% des pathogènes incriminés (en excluant *P. acnes* et les Corynébactéries, non détectés avec les amorces utilisées dans l'étude) contre 42% avec les techniques de culture classiques. Par conséquent, tous les patients diagnostiqués seulement avec la PCR multiplex avaient reçu des antibiotiques. Les bactéries identifiées ont bien été pris en compte : *S. aureus*, SCN, Streptocoques, *K. pneumoniae* ou *K. oxytoca*.

La technique utilisant une PCR multiplex (la même que celle de l'étude sus citée : SeptiFast; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) a été réalisée sur le liquide de sonication et semble apporter les meilleurs résultats. En effet Portillo *et al.* (51) mettent en avant une sensibilité de 96% et une spécificité de 100% pour le diagnostic des IOA avec cette technique, principalement pour différencier une IOA d'une origine aseptique.

Le principal inconvénient des techniques de biologie moléculaire est de ne pas avoir la possibilité de réaliser d'antibiogramme, car pour cela le germe doit être obtenu en culture. D'autre part, il est parfois difficile par biologie moléculaire, comme par culture, de faire la différence entre une réelle infection et une contamination ; ceci est d'autant plus vrai que la sensibilité des techniques de biologie moléculaire est grande.

Cependant d'autres investigations peuvent être réalisées pour connaître la sensibilité générale du germe même sans avoir les colonies en culture. C'est le cas par exemple de la recherche du gène *mecA* pour la résistance à la méticilline des staphylocoques par PCR en temps réel (Xpert[®] MRSA/SA SSTI, Cepheid). Ce test permet détecter les SARM, les SASM et les SCN méti-R ce qui permet de guider la décision thérapeutique plus rapidement. Ce test apparaît spécifique à 98% mais sensible à seulement 36% pour la détection des SCN méti-R ce qui, associé à un prix élevé, limite son utilisation (52).

Ainsi, les méthodes de biologie moléculaire apparaissent efficaces et sensibles pour le diagnostic des IOA, en complément des méthodes de cultures et principalement pour des patients sous antibiothérapie. Leur réalisation ne doit pas être systématique et doit se faire dans le cadre d'une discussion clinico-biologique.

2.3.3 Interprétation

L'interprétation des résultats microbiologiques peut s'avérer complexe et doit bien évidemment s'intégrer dans le contexte clinique et avec les autres données paracliniques. Dans le cas de prélèvements bien réalisés, préférentiellement per opératoires et en nombre suffisant (au moins 5), le REMIC 2015 permet d'énoncer les critères suivants pour affirmer une IOA :

→ présence de minimum 2 prélèvements positifs (même si en pratique un seul prélèvement peut être pris en compte) à une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée et dont la question de la contamination ne se pose pas : *S. aureus*, Entérobactéries, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Salmonella*, *Listeria*, *N. gonorrhoeae*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, par exemple.

→ présence d'au moins 3 prélèvements peropératoires ou 2 prélèvements espacés dans le temps (1 prélèvement per opératoire + 1 prélèvement par ponction articulaire ou hémoculture) positifs à la même bactérie appartenant à la flore cutanée : SCN, *P. acnes*, Corynebactéries, par exemple.

Dans le cas d'une arthrite, un seul prélèvement est réalisé (ponction de liquide articulaire). Pour affirmer une infection, on doit tenir compte de la cytologie (nombre de PNN), de la nature de l'espèce bactérienne isolée et la quantité de pousse en culture. Concernant les IOA aiguës, l'interprétation des résultats ne pose habituellement pas de problème sauf si le patient est déjà sous antibiothérapie. La coloration de Gram est généralement positive et les cultures sont positives rapidement (24 ou 48h). Par contre pour les IOA chroniques, et particulièrement en présence de matériel, l'interprétation est plus délicate : faible nombre de bactéries, variants métaboliques (« small colony variants »), culture plus longue, polymorphisme d'une même espèce sur un même milieu de culture avec des antibiogrammes différents, infections polymicrobiennes...

D'autres référentiels tels que le Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society ont proposé des recommandations diagnostiques des IOA en 2011 (43). Du point de vue microbiologique, ces critères sont : une culture bactérienne positive pour au minimum 2 prélèvements ostéo-articulaires ou alors 1 seul prélèvement positif associé à d'autres arguments (cytologie articulaire avec augmentation des PNN, élévation de la CRP, clinique...). Cependant, ils recommandent de prendre en compte une seule culture positive à des germes virulents tels que *S. aureus* par exemple.

Dans ce contexte, les réunions de concertation pluridisciplinaires associant chirurgiens, infectiologue, microbiologiste, radiologue, anesthésiste et pharmacien permettent de standardiser et de discuter du diagnostic et de la conduite thérapeutique à tenir.

3 Place des staphylocoques dans les IOA

3.1 Place du genre *Staphylococcus* dans l'épidémiologie des IOA

Tande et Patel. (30) ont comparé les résultats microbiologiques de 14 études incluant plus de 2400 patients atteints d'IOA suite à une chirurgie arthroplastique de la hanche ou du genou. Ces données américaines proviennent de la *Mayo Clinic* (fédération Hospitalo-Universitaire, Rochester, Minnesota) et d'études dans divers pays et avec diverses stratégies chirurgicales. Les cocci à Gram positif représentent la majorité des microorganismes isolés d'IOA sur hanche ou genou dans toutes les études. ***S. aureus* et les SCN qui représentent à eux seuls 50 à 60% de l'épidémiologie générale**, alors que les streptocoques et entérocoques représentent à peu près 10% des cas. Les bacilles à Gram négatif aérobies sont impliqués dans un peu moins de 10% des cas, les germes anaérobies, principalement *P. acnes*, dans 4% des cas. On remarque par ailleurs un nombre non négligeable de cultures négatives (14% pour hanche et genou), même si l'infection se déclare de façon précoce.

Tableau III : Épidémiologie des IOA (d'après (30))

Infection	% of patients with prosthetic joint infection					
	Hip and knee					
	All time periods ^a	Early infection ^b	Hip ^c	Knee ^c	Shoulder ^d	Elbow ^e
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	38	13	23	18	42
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	27	22	30	23	41	41
<i>Streptococcus</i> species	8	4	6	6	4	4
<i>Enterococcus</i> species	3	10	2	2	3	0
Aerobic Gram-negative bacilli	9	24	7	5	10	7
Anaerobic bacteria	4	3	9	5		
<i>Propionibacterium acnes</i>					24	1
Other anaerobes					3	0
Culture negative	14	10	7	11	15	5
Polymicrobial	15	31	14	12	16	3
Other	3					

^a données de 2435 articulations

^b données de 637 articulations

^c données d'IOA de 1979 hanches et 1427 genoux (Mayo Clinic PJIs Database, E. F. Berbari, personal communication).

^d données de 199 épaules

^e données de 110 coudes

L'épidémiologie varie si l'on considère les infections précoces ou tardives. Les données de la méta-analyse font état de 637 patients atteints d'infections précoces de la hanche ou de genou après arthroplastie (inférieur à 1 ou 3 mois après la chirurgie, selon les études), avec quelques différences épidémiologiques pendant cette période : **S. aureus et les bacilles à Gram négatif représentent 60% des cas précoces**. Cela peut être expliqué par la virulence importante de ces germes, ce qui entraîne des manifestations cliniques plus précoces. Cependant, le pourcentage de SCN demeure important dans ce type d'infection (22%). **Le nombre de patients atteint d'infection polymicrobienne est deux fois plus important dans la période précoce**, possiblement en rapport avec l'inoculation de plusieurs microorganismes consécutivement à une fracture ouverte souillée par l'environnement ou un traumatisme délabrant.

De façon opposée, les IOA tardives sont typiquement dues à l'inoculation pendant la chirurgie de microorganismes moins virulents comme les SCN et entérocoques, résidents de la flore cutanée. Les infections par voie hématogène via un autre site septique sont souvent aussi qualifiées de tardives, avec une prédominance pour *S. aureus* (30).

Une étude Française dans un centre de référence des IOA (CRIOAC Nord-Ouest) met en évidence sur 10 années une distribution des germes stable avec notamment 70,7% de cocci à Gram positif responsables d'IOA. Dans ce travail **la proportion de S. aureus est de 19,1% et celle de SCN de 38,4%, sans différencier les infections précoces ou tardives** (53). Suivant le pays (USA, Australie, Suède, Grande Bretagne) et l'époque (de 1977 à 2012) ces données varient avec en moyenne 26% de *S. aureus* isolés (de 14 à 38%) et 24% de SCN (de 11 à 48%) (54).

Les SCN représentent donc une part importante dans les IOA précoces et tardives mais, à cause de la difficulté d'identification exacte, de nombreux articles de littérature ne mentionnent pas l'espèce et par conséquent la pathogénicité, les manifestations cliniques et les facteurs de risque restent à déterminer. La bonne prise en charge des IOA nécessite une bonne connaissance de l'épidémiologie et cette dernière doit être déterminée au niveau local et il apparaît utile de comparer ses résultats aux données nationales ou internationales.

3.2 Evolution des résistances

L'étude rétrospective sur 10 années du CRIOAC de Lille (53) a permis de suivre l'antibiorésistance, notamment des staphylocoques. On note une diminution du pourcentage de SARM à travers le temps et aucun germe résistant aux glycopeptides ou au linézolide n'a été isolé. **Pour les SCN, on observe une augmentation significative de la résistance à la**

méticilline, aux fluoroquinolones et à rifampicine qui sont, pour les deux dernières, des molécules de base dans le traitement des IOA. Il y a aussi une augmentation des résistances à la vancomycine, à la teicoplanine et au linézolide, ce qui a entraîné le retrait des deux derniers antibiotiques du traitement antibiotique probabiliste dans les pratiques locales du CHU de Lille et Tourcoing.

Tableau IV : Évolution de l'antibiorésistance des S.aureus et SCN (d'après (53))

	2002	2008	2009	2010	2011	Mean % (±SD)
<i>Staphylococcus aureus</i>						
Méthicillin	27.9	21.1	21.1	23.7	20.6	22.9 (±3.1)
Levofloxacin	27	22.2	23	31.8	17.7	24.3 (±3.1)
Rifampicin	13.1	6.6	5.3	2.6	1	5.7 (±3.1)
Vancomycin	0	0	0	0	0	0.0 (±0.0)
Teicoplanin	0	0	0	0	0	0.0 (±0.0)
Linezolid	NT	0	0	0	0	0.0 (±0.0)
CoNS						
Méthicillin	30.4	44.3	54.4	49.8	43.9	44.6 (±9.0)
Levofloxacin	20.3	32.5	41.2	24.5	34.1	30.5 (±8.2)
Rifampicin	13	18.3	18.5	20.2	18.5	17.7 (±2.7)
Vancomycin	0.4	0	0	0	2.3	0.5 (±1.0)
Teicoplanin	3.7	14.9	21.3	7.4	22	13.9 (±8.2)
Linezolid	NT	1.2	2	1	3.5	1.9 (±1.1)

CoNS : *staphylocoques à coagulase négative*, Mean : moyenne

D'autres auteurs, Américains (54), ont utilisé les données épidémiologiques des résistances pour évaluer la pertinence de l'antibioprophylaxie à travers une étude regroupant dix hôpitaux sur trois ans. Ce travail montre des pourcentages de SARM et SASM assez équivalents (26% et 30% des pathogènes isolés respectivement), alors que la résistance à la méticilline est là aussi plus marquée chez les SCN (22% de SCN méti-R vs 3% méti-S). Seul *S. lugdunensis* est à différencier dans ce domaine, car il est sensible à la méticilline dans la très grande majorité des cas et même à la pénicilline dans les trois quarts des cas du fait de l'absence d'une pénicillinase (55). Au CHU de Toulouse, le pourcentage de SARM est globalement en diminution sur trois années, hormis dans le service de Traumatologie où il semblerait que ce pourcentage augmente pour les souches isolées au niveau des prélèvements réalisés en per&opérateur (Figure 10).

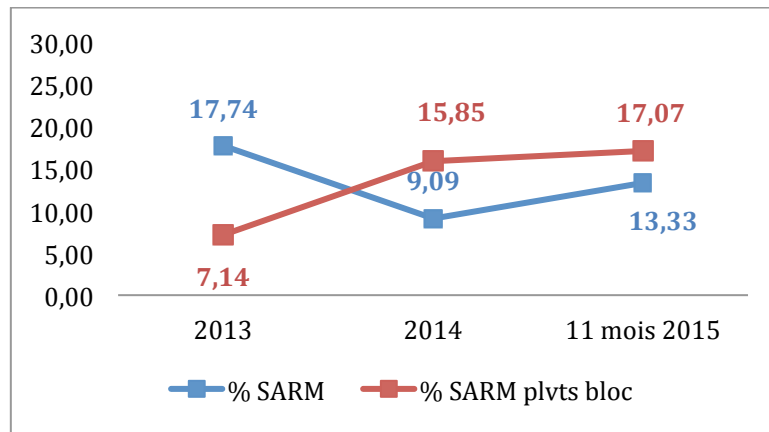


Figure 10: Pourcentage de SARM isolés dans le service de traumatologie du CHU de Toulouse (d'après M.Grare)

Ces données soulignent l'importance d'avoir accès à l'épidémiologie et à l'antibiorésistance locale, ainsi qu'à l'identification complète et précise du microorganisme.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

4 Apport du spectromètre de masse MALDI-TOF pour l'identification des *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae*

Nous l'avons vu, le diagnostic microbiologique des IOA est considéré comme un exercice délicat pour le laboratoire de Microbiologie. Une des étapes clé dans la démarche diagnostique est bien évidemment l'identification précise de la ou des colonie(s) poussant sur les différents milieux de culture. Le travail effectué en amont (prélèvement, transport, ensemencement) doit être rigoureux ainsi que la lecture des cultures. La reconnaissance d'une ou plusieurs colonies bactériennes doit être précise.

L'un des objectifs de ce travail était d'évaluer l'apport du spectromètre de masse dans cette démarche diagnostique et de la comparer aux autres techniques d'identification utilisées afin d'améliorer la description épidémiologiques des IOA et l'implication plus précise de ces trois SCN.

4.1 Spectromètre de masse MALDI-TOF

4.1.1 Présentation

L'identification des microorganismes reposait jusqu'à récemment sur l'étude des caractères cultureux et biochimiques. Depuis quelques années, une nouvelle technique de spectrométrie de masse appelée MALDI-TOF pour « Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight » s'est développée. Alors que les méthodes biochimiques classiques nécessitent un délai de rendu de résultat de 18h minimum, la technique MALDI-TOF permet une identification en quelques minutes.

4.1.2 Principe

La spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Ces derniers doivent être transformés en ions en phase gazeuse pour être analysés. Un spectromètre de masse est donc classiquement composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur séparant les ions en fonction de leur masse/charge (m/z) et d'un détecteur ionique transformant le signal en signal électrique qui sera analysé par informatique.

Une colonie bactérienne est déposée sur un support et va être mélangée avec une matrice. Les deux composés vont co-cristalliser par évaporation et se présenter sous forme de dépôt solide. La plaque est insérée dans le spectromètre de masse et le mélange matrice – échantillon va être brièvement atteint par un faisceau laser. Cette ionisation douce est une étape importante car elle permet l'analyse de macromolécules telles que les protéines contenues par exemple chez les bactéries. La matrice joue un rôle essentiel car elle permet d'absorber l'énergie du laser et permettre la désorption, c'est-à-dire le passage en phase gazeuse des ions du mélange échantillon – matrice. En même temps un transfert d'ions entre la matrice et les protéines va se réaliser afin que ces dernières soient chargées (majoritairement mono chargées). La suite de la méthode est symbolisée par les initiales « TOF » pour temps de vol (« time of flight »). Les ions produits sont introduits en même temps dans un « tube de vol » sous vide et vont être accélérés grâce à une impulsion électrique pouvant aller jusqu'à 20 kiloélectron volt. Les protéines ionisées volent ensuite jusqu'au détecteur (multiplicateurs d'électrons) situé à une extrémité du tube en fonction de leur vitesse et donc de leur masse, en partant du principe que les ions de masse plus élevée atteindront le détecteur plus tardivement. Le signal est enregistré par un multiplicateur d'électrons puis traité informatiquement afin de générer un spectre sur la base du rapport m/z (Figure 11).

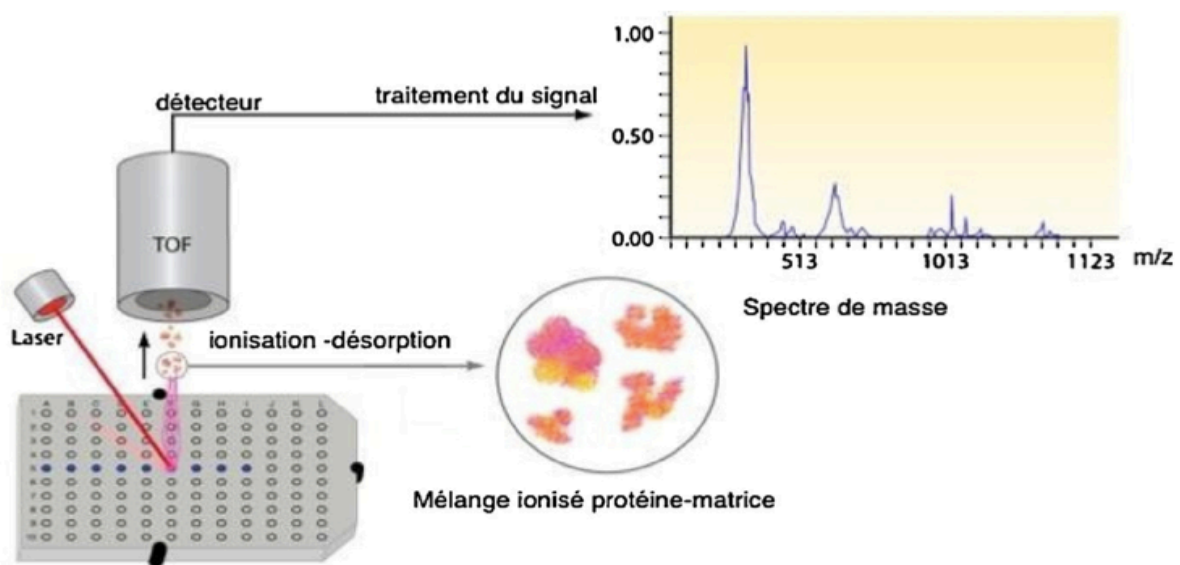


Figure 11 : Principe général de l'analyse MALDI-TOF (d'après (56))

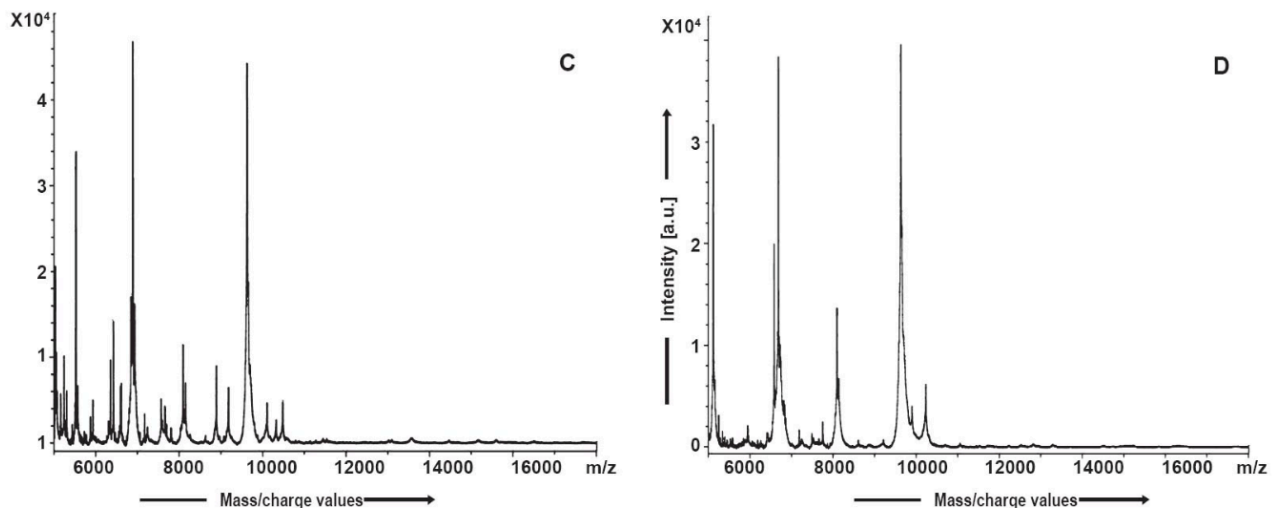


Figure 12 : Spectre protéiques de *S. aureus* (C) et *S. epidermidis* (D) obtenus par MALDI-TOF

Le spectre issu de l'analyse de la colonie bactérienne va être comparé à une base de données, c'est-à-dire une bibliothèque de souches de référence (57). Les pics de références correspondent donc à des pics communs et reproductibles du passage à plusieurs reprises des souches de référence au MALDI-TOF. Cette méthode d'identification est donc simple et adaptable à l'utilisation en routine dans les laboratoires de microbiologie.

4.2 Matériel et méthode

Nous avons ré-identifié au laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse toutes les souches de *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae* issues des prélèvements de Traumatologie et d'Orthopédie, entre 2010 et 2014. Les souches utilisées pour cette étude ont été décongelées et ensemencées sur gélose au sang COS, incubées 24h à 37°C.

L'identification des colonies a été réalisée par le spectromètre de masse MALDI-TOF Biotyper System de Bruker Daltonics®. Le logiciel interface utilisé pour exploiter les données du SM est Infectio-MALDI®. Il n'y a pas de préparation systématique de l'échantillon par extraction, les spots sont réalisés sur les plaques dédiées directement à partir des colonies. Ces spots doivent être fins et réguliers, réalisés à l'aide d'anses stériles. La dernière étape consiste en l'addition de la matrice sur tous les spots, y compris sur le standard interne (souche d'*E. coli*). La matrice utilisée dans notre étude est du HCCA (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamic) dilué dans de l'acétonitrile ; le BTS (« bacterial test standard ») est utilisé pour la calibration.

La validation de l'identification répond à certains critères : le score du résultat doit être supérieur ou égal à 2 avec une différence d'au moins 20% avec une autre espèce proposée.

L'arbre décisionnel utilisé par le logiciel Infectio-MALDI prend en compte 10 identifications réalisées sur le même spot ; nous avons pris les résultats catégorisé A++ ou A+++, ce qui correspond à la même identification avec un score supérieur ou égal à 2 retrouvée sur minimum 8 souches sur 10.

Le spectromètre de masse a été utilisé en routine dans le laboratoire à partir du 08 avril 2014. Nous avons donc comparé le SM aux précédentes techniques d'identification basées sur des caractères biochimiques qui étaient principalement le VITEK2® (Biomérieux) et/ou des tests biochimiques complémentaires (par exemple le PYR).

En cas de discordance ou de score <2, nous avons procédé à un deuxième passage sur le SM. Si une discordance était toujours observée, nous avons réalisé l'amplification par PCR et le séquençage du gène de l'ARN 16S. Les réactifs utilisés sont détaillés en Annexe 3. La séquence a été comparée à différentes bases de données : BIBI (Quick BioInformatic Phylogeny of Prokaryotes (<https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>)) ou alors le site internet de GeneBank Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/). Un exemple de rendu d'identification est disponible en Annexe 3.

4.3 Résultats comparés

4.3.1 Comparaison vis à vis des techniques biochimiques d'identification

Le nombre total de souches incluses dans l'étude est de 169 : 84 *S. capit*, 23 *S. caprae*, 54 *S. lugdunensis* et 8 *S. capit/caprae* ou souches à confirmer.

Tableau V : Répartition des différentes souches ré-identifiées par spectromètre de masse :

Année	<i>S. capit</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. lugdunensis</i>	Souches à confirmer	TOTAL
2010	16	4	10	2	32
2011	18	5	10	0	33
2012	15	4	10	3	32
2013	19	6	15	1	41
2014	16	4	9	2	31
Total	84	23	54	8	169

Cependant, certaines souches ont été mal congelées, ou alors contaminées et étaient donc inexploitable. Dix-neuf souches n'ont ainsi pas pu être incluses au final dans l'étude : **n=150 souches incluses.**

4.3.1.1 Concordance d'identification en 1^{er} ou 2nd passage

La concordance d'identification vis à vis des techniques biochimiques lors du premier passage au spectromètre de masse concerne respectivement 25, 23, 27, 33 et 24 souches pour 2010, 2011, 2012, 2013 et 2014, ce qui correspond au total à 132 souches soit un pourcentage de 88% (132/150).

Certaines souches ont nécessité un second passage car les critères d'identification tels que nous les avons définis plus haut n'étaient pas obtenus. Cela représente principalement les souches dont le score a été <2 en premier passage :

Tableau VI : 2^{nde} identification des souches par spectromètre de masse

N° souche	ID Vitek2	1 ^{ère} ID SM	Score	2 ^{ème} ID SM	Score	2 ^{ème} espèce + score
98	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>	1,84	<i>S. capitis</i>	2,17	-
152	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	1,92	<i>S. lugdunensis</i>	1,97	<i>S. aureus</i> 1,48
85	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,98	<i>S. caprae</i>	2,28	-
184	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,98	<i>S. caprae</i>	1,94	<i>S. aureus</i> 1,66
186	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,99	<i>S. caprae</i>	2,28	-
167	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,76	<i>S. caprae</i>	2,05	-
172	<i>S. capitis</i>	<i>S. capitis</i>	1,95	<i>S. capitis</i>	2,17	-
101	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,90	<i>S. caprae</i>	2,12	-
5	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,90	<i>S. caprae</i>	1,83	<i>S. simiae</i> 1,34
16	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,94	<i>S. caprae</i>	1,9	<i>S. simiae</i> 1,54
31	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,74	<i>S. caprae</i>	2,39	-
162	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>	1,96	<i>S. caprae</i>	1,97	<i>S. epidermidis</i> 1,61

ID = identification

Douze souches, soit 8% (12/150), ont bénéficié d'un second passage. Parmi ces souches, 7 donnent la même identification avec un meilleur score (>2), et 5 donnent la même identification avec un score <2. Cependant ce score est proche de la valeur attendue et surtout il y a dans chaque cas une différence de plus de 20% avec la seconde identification proposée (notons que cette dernière est du même genre, seule l'espèce varie). Par conséquent, le deuxième passage a permis d'identifier les 12 souches de manière correcte, c'est-à-dire en concordance avec les règles de validation du spectromètre de masse.

4.3.1.2 Discordances d'identification

En tenant compte des données ci-dessus il reste 6 souches, soit 4%, qui n'ont pas donné d'emblée la même identification entre la SM et le Vitek2[®]. Ces souches ont été analysées par séquençage.

Tableau VII : Souches identifiées de façon discordante entre Vitek2® et SM

N° souche	Vitek2	SM
99	<i>S. capitis / caprae</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
112	<i>S. caprae</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
110	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. pasteuri</i>
64	<i>S. capitis</i>	<i>S. caprae</i>
146	<i>S. capitis</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
94	<i>S. capitis</i>	<i>S. lugdunensis</i>

4.3.2 Apport de la biologie moléculaire :

Nous avons comparé ces « souches discordantes » par biologie moléculaire. Pour être le plus exhaustif possible et éviter les erreurs d'identification suite à des contaminations de souches, nous avons testé toutes les colonies d'aspect différent en culture (ex : colonie « normale » et colonie blanc/jaune). La liste des souches identifiées par biologie moléculaire est présentée Tableau VIII.

Tableau VIII : identification des souches par spectromètre de masse (SM) et biologie moléculaire (BM)

N° souche	Vitek2	SM	BM
99	<i>S. capitis / caprae</i>	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
99 col. blanc/jaune	<i>S. capitis / caprae</i>	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
112	<i>S. caprae</i>	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
112 col. blanche	<i>S. caprae</i>	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
110	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. pasteuri</i>	<i>S. pasteuri</i>
64	<i>S. capitis</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>
146	<i>S. capitis</i>	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
94	<i>S. capitis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. lugdunensis</i>

Le premier résultat confirme l'identification de 2 nouvelles espèces de staphylocoques (non identifiées par méthode biochimique) que sont *S. pettenkoferi* et *S. pasteuri*. Deuxièmement, quelque soit l'aspect de la colonie, l'identification est la même et l'on remarque une parfaite concordance entre les résultats de la technique MALDI-TOF et le séquençage du gène de l'ARN 16S. Les résultats des séquençages permettent de bien identifier l'espèce et le genre en question, selon des arbres phylogénétiques issus de l'analyse comparative des séquences et de leur distance patristique (ce que l'on pourrait assimiler à la « longueur de la branche d'un arbre phylogénétique »). Cela représente un nouvel argument quant à la fiabilité d'identification du SM.

4.3.3 DISCUSSION : apport de la Spectrométrie de masse pour le diagnostic des infections ostéo-articulaires

Nous avons donc vu qu'il y a 88% de concordance en premier passage et au total 96% (144/150) de concordance globale avec le second passage. Le faible coût et la rapidité d'identification permettent de réaliser plusieurs passages pour une même souche et ce même en routine, il suffit de définir des critères d'acceptation propres au laboratoire. Cette technique permet aussi d'identifier plus facilement tous les types de colonies différents, ce qui permet d'être plus exhaustif.

Un autre enseignement de ces données est que la technique d'identification biochimique (Vitek2[®]) est fiable. La différenciation entre *S. capitis* et *S. caprae* n'était pas toujours évidente, elle était surtout établie grâce au PYR (pyrrolydonyl-arylamidase) (positif pour *S. caprae*).

Afin de nous affranchir de la possible coexistence de plusieurs souches de SCN dans le prélèvement de départ ou de la mauvaise congélation des souches, nous avons pris comme précautions d'éliminer les souches qui ont pu être mal congelées, ou celles identifiées sur d'autres prélèvements pour le même patient. Par conséquent, par rapport à la technique Vitek2[®], la spectrométrie de masse nous a permis d'identifier trois souches de *S. pettenkoferi* à la place de *S. capitis* ou *S. caprae*, une souche de *S. pasteurii* à la place de *S. lugdunensis*, une de *S. caprae* à la place de *S. capitis* et enfin une souche de *S. lugdunensis* à la place de *S. capitis*.

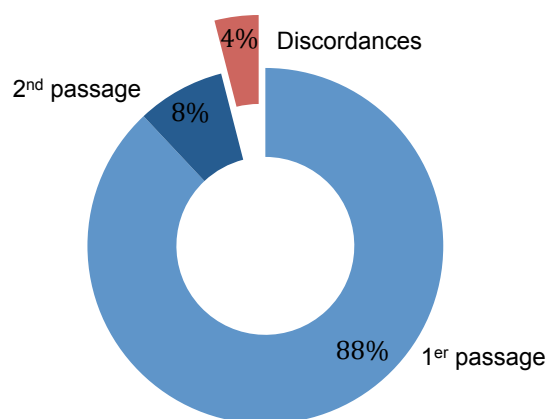


Figure 13 : Concordance d'identification entre le SM et les techniques biochimiques

De manière générale, le spectromètre de masse apporte un gain de temps, de coût, d'organisation et de facilité d'utilisation. Appliqué au diagnostic des IOA, le MALDI-TOF apporte une grande exactitude dans l'identification des souches, notamment pour le genre staphylocoque, de la même manière que cela a été démontré dans d'autres études (58).

L'identification par MALDI-TOF permet en outre de s'affranchir de certains problèmes d'identification de SCN variants métaboliques qui peuvent conduire à des erreurs d'identification par perte de certains caractères phénotypiques et biochimiques.

Dans le cas de ce travail, cette technique nous a permis de mettre en évidence de nouvelles espèces de staphylocoques qui ont pu être sous estimées auparavant. En effet la banque de données des méthodes biochimiques d'identification ne comportait pas les espèces *S. pettenkoferi* et *S. pasteurii*. La SM est donc une aide précieuse dans le diagnostic des IOA à SCN, en particulier pour identifier rapidement des souches issues de prélèvements différents et pour différencier des espèces très proches pour lesquelles le pouvoir pathogène est encore mal connu. L'intérêt n'est donc pas seulement analytique mais il est aussi épidémiologique, et nous aborderons dans la cinquième partie de ce travail les données actuelles concernant la pathogénicité de ces deux espèces nouvellement identifiées.

5 Épidémiologie des IOA à *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae* au CHU de TOULOUSE

Les staphylocoques représentent les microorganismes les plus souvent isolés dans les IOA. Ce groupe est hétérogène, notamment au niveau de l'épidémiologie et de la virulence. Après avoir décrit l'épidémiologie au sein du genre *Staphylococcus* au niveau local, nous nous intéresserons plus précisément à trois SCN que sont *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae*, et tenterons d'évaluer leur implication dans les IOA ainsi que leurs profils de résistance.

5.1 Place des différentes espèces de *Staphylococcus* dans les IOA entre 2010 et 2014

Il est important de préciser ici que les données ci-dessous sont brutes, elles ne représentent pas l'épidémiologie des IOA à staphylocoques à proprement parler car tous les dossiers des patients n'ont pas été consultés et certains SCN sont possiblement des contaminants. Un travail plus précis concernant les IOA à *S. lugdunensis*, *S. caprae* ou *S. capitis* sera détaillé dans la partie 5.2.

Nous avons pris en compte les différentes espèces de staphylocoques identifiées au laboratoire sur des prélèvements ostéo-articulaires issus des services d'Orthopédie et de Traumatologie durant 5 années, de 2010 à 2014.

***S. aureus* apparaît comme le germe le plus fréquemment isolé (37%)** et, du fait de sa virulence, ne peut pas être considéré comme un contaminant. La répartition annuelle est assez stable hormis en 2013 où l'on observe une augmentation du nombre de *S. aureus* isolés. **Le groupe des SCN représente 63% des staphylocoques isolés** avec une large domination de *S. epidermidis* qui est le second germe le plus fréquent au total, représentant 29% des isolats. Ces résultats confirment donc la place principale de *S. epidermidis* parmi les SCN. Cependant d'autres espèces de SCN sont relativement fréquemment isolées, c'est les cas de *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis* et *S. lugdunensis* qui représentent 22% des isolats. De façon moins fréquente sont rencontrés *S. caprae*, *S. haemolyticus* et *S. simulans* qui représentent 6% des isolats. D'autres espèces ont été identifiées, mais de manière plus ponctuelle. La ligne « SCN » correspond aux staphylocoques qui n'ont pas été identifiés exactement (car considérés comme contaminants) ; ils représentent 2% des isolats.

Tableau IX : Souches de staphylocoques isolées de prélèvements ostéo-articulaires de 2010 à 2014 au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse

	2010	2011	2012	2013	2014	TOTAL
<i>S. aureus</i>	76	87	88	118	74	443
<i>S. epidermidis</i>	66	68	80	81	50	345
<i>S. capitis</i>	16	18	18	19	17	88
<i>S. warneri</i>	16	12	16	13	8	65
<i>S. hominis</i>	17	11	16	7	9	60
<i>S. lugdunensis</i>	10	10	11	15	9	55
<i>S. caprae</i>	6	5	5	7	5	28
<i>S. haemolyticus</i>	3	4	10	7	2	26
<i>S. simulans</i>	5	5	5	5	6	26
SCN	5	4	5	11	1	26
<i>S. cohnii</i>	3	1	1	3	3	11
<i>S. auricularis</i>	5	2	1	2	0	10
<i>S. saprophyticus</i>	0	4	0	2	0	6
<i>S. intermedius</i>	1	1	1	0	2	5
<i>S. xylosus</i>	1	3	0	0	0	4
<i>S. lentus</i>	0	0	1	1	0	2
<i>S. schleiferi</i>	0	1	0	0	0	1
TOTAL						1201

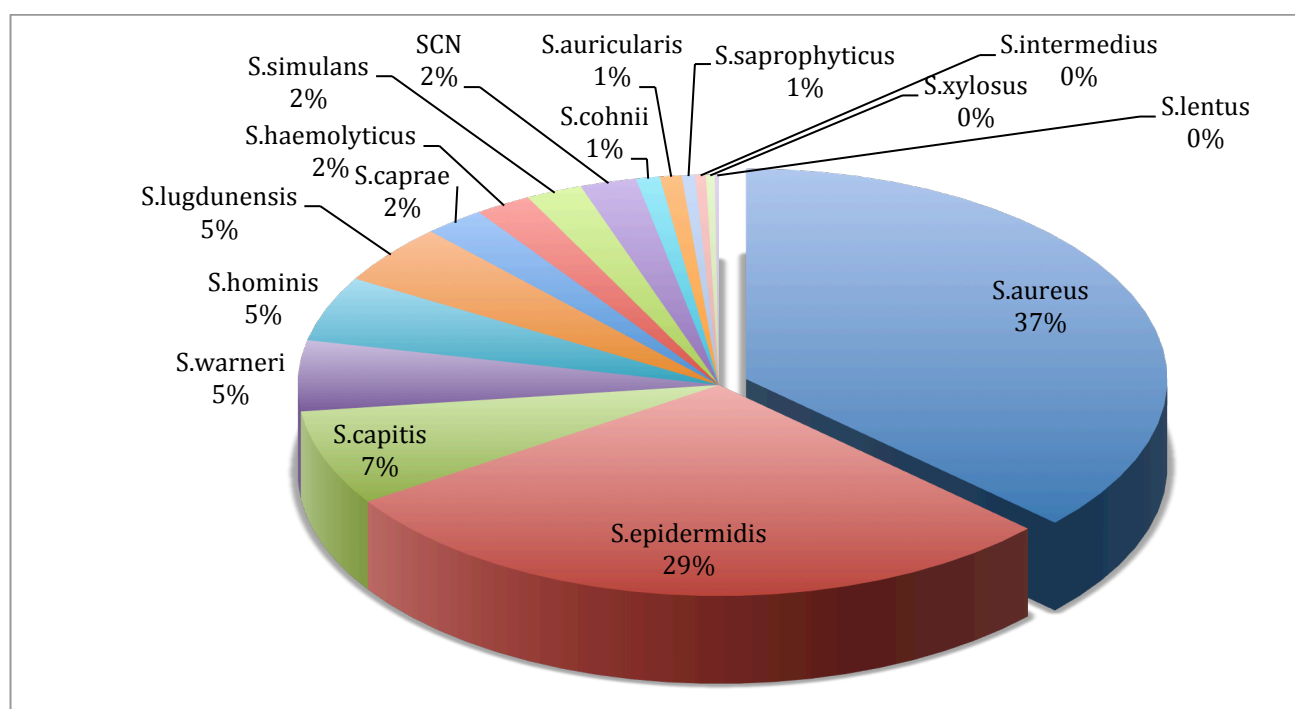


Figure 14 : Répartition des différents staphylocoques isolés de prélèvements ostéo-articulaires de 2010 à 2014 au Laboratoire de Bactériologie Hygiène du CHU de Toulouse

Les données de la seule année 2015 font état de 55% de staphylocoques isolés dans des prélèvements ostéo-articulaires issus de Traumatologie et d'Orthopédie. Parmi eux, 50% de *S. aureus*, 27% de *S. epidermidis* suivi par 5% de *S. lugdunensis* et de *S. capitis* ; *S. caprae*

ne représentant que 1% des isolats de SCN. *S. aureus* semble donc en augmentation, et ces données confirment l'isolement régulier de *S. lugdunensis* et *S. capitis*.

À titre de comparaison, une étude menée sur 40 mois rapporte la prévalence de 193 souches de staphylocoques *non aureus / non epidermidis* isolées d'implants orthopédiques (59). Ces SCN (hormis *S. epidermidis*) représentent 17% de tous les isolats de staphylocoques contre 34,4% pour notre étude. Les auteurs mettent en avant 5 espèces les plus souvent isolées (entre 1 à 5%) à savoir *S. hominis* (4,2%), *S. haemolyticus* (3,7%), *S. capitis* (2,7%), *S. warneri* (2,6%), et *S. cohnii* (1,6%). Nous avons donc isolé une proportion plus importante de *S. capitis* et *S. warneri*.

Cependant la plupart des données de la littérature concernant les IOA à SCN ne font pas état de l'identification précise hormis pour *S. epidermidis*. Pourtant, comme le suggère les informations ci-dessus, d'autres germes sont fréquemment isolés et il nous semble intéressant d'approfondir cette question pour connaître la responsabilité de certains d'entre eux dans les IOA.

5.2 IOA à *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. caprae* en 2013-14

Les données issues de la partie 5.1 mettent en avant une proportion importante de *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae* parmi les SCN. Cependant, comme cela a été précisé, l'imputabilité de ces germes dans les IOA doit être démontrée de façon plus précise et c'est l'objet du travail qui va suivre. À l'aide des logiciels MOLIS[®] (système informatique de laboratoire) et ORBIS[®] (dossiers patients et résultats), nous avons collecté de manière rétrospective les données des patients ayant eu au moins un prélèvement ostéo-articulaire positif à *S. lugdunensis*, *S. capitis* ou *S. caprae* pour la période 2013-2014 au CHU de Toulouse (nous avons recentré les résultats sur ces deux années car il était difficile de réaliser l'étude de tous les dossiers de patients sur 5 années).

5.2.1 Patients et prélèvements

5.2.1.1 Patients

Les patients ont été identifiés selon leur service d'hospitalisation ce qui permet d'avoir une extraction des données par service fiable. Dans notre étude, ils proviennent des services de Traumatologie et d'Orthopédie du CHU de Toulouse.

Sur ces deux années, nous avons dénombré **68 patients** présentant au moins un prélèvement ostéo-articulaire positif à *S. lugdunensis*, *S. capitis* ou *S. caprae*. Cela représentait 48 hommes pour 20 femmes soit un ratio homme/femme de 2,4. L'étendue des âges était de 11 à 91 ans, avec un âge moyen de 54 ans.

5.2.1.2 Prélèvements

Le nombre total de **prélèvements positifs s'élève à 255**. Le nombre de prélèvements par patient s'étend de 1 à 7, avec une médiane de 3 prélèvements par patient et une moyenne de quasiment 4.

Les prélèvements réalisés au bloc opératoire d'Orthopédie et de Traumatologie sont adressés au laboratoire munis d'un bon spécifique contenant le site anatomique, la zone, l'os en question, les circonstances cliniques, la présence ou non de matériel et sa caractérisation, le traitement antibiotique en cours... Au total, les principales articulations concernées étaient par ordre de fréquence : hanche (32,4%), genou (27,9%), cheville (7,4%). Les autres prélèvements étaient issus de localisations diverses telles que la cuisse, jambe, doigt, poignet, pied et d'autres n'étaient pas renseignés. Il faut préciser que pour chaque site anatomique ou articulation, la zone de prélèvement a été identifiée : matériel d'ostéosynthèse, sérosité en contact avec du matériel, synoviale, membrane d'interposition, liquide articulaire, hématome/collection par exemple.

Un point important est que parmi les 68 patients, **48 étaient porteur de matériel soit 70,5%**. Soit le matériel était envoyé au laboratoire : par exemple du matériel d'ostéosynthèse (vis, clou...), ou un matériel prothétique (PTH, PTG, tête, vis...), soit la sérosité était prélevée.

5.2.2 Résultats Bactériologiques

Le principal problème dans le diagnostic des IOA à SCN est de savoir s'ils sont des contaminants ou s'ils sont réellement en cause. *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae* ne sont pas des germes aussi virulents que *S. aureus* ou des BGN (cf chapitre 1.2 et (37,43)) mais les prélèvements ostéo-articulaires correctement réalisés doivent bien sûr être stériles.

Par conséquent, pour considérer une IOA, notre raisonnement a été le suivant : ***au minimum deux prélèvements positifs avec le même germe et +/- un résultat anatomo-pathologique (si disponible) en faveur d'une infection. De plus, le nombre de prélèvements contenant d'autres germes doit être inférieur ou égal au nombre de prélèvements à S. lugdunensis, S. capitis ou S. caprae.***

Nous avons choisi de ne pas mentionner la quantité de pousse bactérienne car cette donnée n'est pas toujours interprétable. Par exemple, lors d'une infection chronique il est probable de n'avoir que quelques colonies en culture (surtout s'il y a des « small colony variant ») mais le germe est bien en cause dans l'infection. Inversement, une contamination par un SCN commensal de la peau peut donner de nombreuses colonies sans être responsable de l'infection.

5.2.2.1 Infections/Contaminations à *Staphylococcus capitis*

Nous avons relevé 32 patients chez lesquels au moins un *S. capitis* a été isolé dans les prélèvements ostéo-articulaires, soit 47% des patients. Le nombre de prélèvements positifs par rapport au nombre total était de 54/111 (48,6%). 17 patients ont eu des prélèvements polymicrobiens, ce qui représente 33 prélèvements sur 111 (29,7%). Les résultats anatomopathologiques étaient disponibles dans 9 cas, et en faveur d'une infection pour 4 patients.

En suivant le raisonnement mentionné plus haut, nous avons considéré **13 patients** avec une IOA à *S. capitis*, les caractéristiques des patients sont détaillées dans le Tableau X. Pour chaque patient sont mentionnés les données personnelles, l'articulation en cause, la présence de matériel, le nombre de prélèvements positifs par rapport au nombre total de prélèvements réalisés, le nombre de prélèvements polymicrobiens et les éventuels résultats anatomopathologiques.

L'âge moyen était de 51 ans (de 22 à 79 ans), le nombre d'hommes était majoritaire (sex ratio Homme/Femme 5,5) et la localisation principale était le genou (46,2%), avec une présence de matériel dans la plupart de cas (69,2%). Les prélèvements positifs par patient s'étaient de : minimum: 2/8 (25%), maximum: 6/6 (100%), moyenne de positivité : 68%.

Pour les patients DEB.X (collection du fémur gauche, suspicion d'infection du site opératoire: ostéosynthèse) et MAR.L, les résultats anatomopathologiques étaient négatifs mais, avec un nombre important de prélèvements positifs à *S. capitis*, ces patients ont été considérés comme infectés.

Tableau X : Caractéristiques des patients considérés infectés à S. capitis

Patient	Sexe	Age	Localisation	Matériel	Prélèvements+ /total	Prélèvements polymicrobiens	Anapath
BEG.M	M	22	Genou	Oui	2/3	2/3	NR
DRY.J	M	57	Jambe	Oui	2/3	1/3	NR
CAB.P	M	79	Genou	Oui	3/5	0	+
FON.S	M	60	Genou	Oui	2/8	0	NR
COS.M	M	32	Pied	Oui	2/2	2/2	NR
COU.M	F	76	Clavicule	Non	3/3	0	NR
MAR.F	M	34	Hanche	Oui	3/5	0	NR
CAS.G	M	57	Poignet	Non	2/2	0	NR
DEB.X	M	45	Fémur	Non	2/4	2/4	-
SAL.M	F	26	Jambe	Oui	3/5	1/5	+

KLA.G	M	69	Genou	Oui	2/2	2/2	NR
GAY.B	M	63	Genou	Non	2/2	2/2	NR
MAR.L	M	53	Genou	Oui	6/6	3/6	-

NR : non renseigné ; anapath +/- : résultat anatomopathologique positif ou négatif

5.2.2.2 Infections/Contaminations à *Staphylococcus lugdunensis*

Vingt-deux patients ont présenté un isolement de *S. lugdunensis* dans les prélèvements ostéo-articulaires, soit 33%. Cela représente 60 prélèvements sur 90 (66,7%). Douze patients ont eu des prélèvements polymicrobiens (54,5%), ce qui correspond à 30 prélèvements sur 90 (33,3%).

Nous avons considéré en tout **15 patients** avec une IOA à *S. lugdunensis*. L'âge moyen était de 60 ans (de 23 à 83 ans) et le sex ratio proche de 1. Les sites préférentiels étaient le genou et la hanche (un tiers des cas pour chacun). Là aussi la proportion de patients avec matériel était grande (73,3%), et souvent plusieurs prélèvements étaient positifs pour un patient (minimum: 2/5 [40%]; maximum: 6/6 [100%]; moyenne de positivité : 82,5%).

Tableau XI : Caractéristiques des patients considérés infectés à S. lugdunensis

Patient	Sexe	Age	Localisation	Matériel	Prélèvements+ /total	Prélèvements polymicrobiens	Anapath
FOL.G	F	79	Pied	Oui	2/3	1/3	NR
LEN.N	F	64	Genou	Oui	5/5	0	NR
MEY.P	M	51	Jambe	Oui	2/5	0	NR
GAR.B	M	41	Hanche	Oui	4/4	1/4	NR
SAB.D	M	64	Genou	Non	2/2	2/2	NR
DEL.M	F	78	Genou	Oui	3/3	0	+
ROU.P	M	65	Jambe	Oui	4/5	1/5	NR
HUE.A	F	40	Cheville	Oui	2/2	0	NR
GER.H	F	83	Genou	Non	2/2	2/2	NR
DES.J	F	59	Jambe	Non	3/3	3/3	NR
PAR.E	F	75	Hanche	Oui	3/5	0	+
ZAM.Y	M	23	Genou	Non	6/6	0	+
KAZ.M	M	73	Hanche	Oui	4/4	0	+
YUF.D	F	61	Hanche	Oui	3/3	0	+
MOR.L	M	44	Hanche	Oui	2/5	0	+

NR : non renseigné ; anapath +/- : résultat anatomopathologique positif ou négatif

5.2.2.3 Infections/Contaminations à *Staphylococcus caprae*

Seuls 9 patients ont présenté au moins un prélèvement ostéo-articulaire positif à *S. caprae*, ce qui représente 13% des patients. Il y a eu en tout 19 prélèvements positifs sur les 34 totaux (55,9%) et 6 patients ont eu des prélèvements polymicrobiens (66,7%), ce qui correspond à 6 prélèvements sur 34 (17,6%).

Cinq patients ont été considérés avec une IOA à *S. caprae*. Les prélèvements positifs par patient s'étaient de : minimum: 2/4 (50%), maximum: 5/5 (100%), moyenne de positivité : 70,8%. Ici aussi la présence de matériel était prépondérante (80%), l'âge moyen était de 48,6 ans (de 25 à 89 ans), et le sex ratio H/F de 1,5.

Tableau XII: Caractéristiques des patients considérés infectés à *S. caprae*

Patient	Sexe	Age	Localisation	Matériel	Prélèvements+ /total	Prélèvements polymicrobiens	Anapath
REM.L	M	25	Genou	non	2/4	1/4	NR
NOG.M	F	89	Cheville	oui	2/3	0	NR
ASS.A	M	38	Hanche	oui	3/6	0	NR
MAI.I	F	49	Jambe	oui	5/5	0	NR
NAV.M	M	42	Hanche	oui	3/3	1/3	+

NR : non renseigné ; anapath +/- : résultat anatomopathologique positif ou négatif

5.2.2.4 Infections mixtes

Cinq patients ont présenté une infection mixte soit 7% : deux cas d'infection à *S. caprae* + *S. lugdunensis* et 3 cas d'infections à *S. caprae* + *S. capitis*. Cela représentait un total de 13 prélèvements positifs sur 20 (65%) et un patient a eu des prélèvements polymicrobiens (c'est-à-dire avec des germes autres que les 3 SCN). On ne peut pas déterminer l'imputabilité de l'un ou l'autre germe mais **2 patients** ont été considérés avec une IOA : un patient (BAR.F) avec *S. capitis* + *S. caprae* et un autre (LEC.J) avec *S. lugdunensis* + *S. caprae*. Le résultat d'anatomopathologie douteux mentionnait « signes d'inflammation subaiguë ». Dans ces deux cas on note la présence de matériel.

Tableau XIII : Caractéristiques des patients considérés infectés de façon mixte

Patient	Sexe	Age	Localisation	Matériel	Prélèvements+ /total	Prélèvements polymicrobiens	Anapath
LEC.J	M	45	Jambe	oui	4/6	0	douteux
BAR.F	M	80	Genou	oui	6/7	0	NR

NR : non renseigné ; anapath +/- : résultat anatomopathologique positif ou négatif

5.2.2.5 Récapitulatif

En moyenne, $2,04 \pm 1,04$ prélèvements par patient étaient positifs, avec une médiane de 2. Pour **35 patients soit 51,5%** d'entre eux, ces 3 SCN ont été considérés comme potentiellement responsables d'IOA sur les années 2013 et 2014 selon les critères définis. Autrement dit, ces trois germes semblaient être impliqués dans l'IOA dans la moitié des cas où ils ont été isolés. Ce pourcentage est un peu plus élevé pour *S. lugdunensis* où l'on a considéré 68% des patients infectés. Cela semble logique étant donné la pathogénicité reconnue de ce germe, proche de celle de *S. aureus*.

Dans à peu près $\frac{3}{4}$ des cas il y a présence de matériel (de 69,2 à 80%). Le sex ratio n'était par contre pas le même selon les germes : de 1 pour *S. lugdunensis* à 5,5 pour *S. capitis*. Les résultats de l'examen anatomopathologique étaient disponibles dans 23 cas (soit 33,8%) et étaient en faveur d'une infection dans 13 cas (56,5%) et **la concordance résultats anatomopathologiques/culture était de 78,3%**. Cela a été d'autant plus vérifié avec *S. lugdunensis*. Nous devons mentionner que pour 36 patients (53%) d'autres germes étaient retrouvés dans les prélèvements ostéo-articulaires, mais sur un nombre limité de prélèvements (*cf critères*). La fréquence des articulations touchées corrobore avec la fréquence générale des localisations des prélèvements, à savoir majoritairement des prélèvements issus de genou et de hanche. De ce fait nous n'avons pas mis en avant de localisations préférentielles en fonction des germes.

Tableau XIV : Prélèvements positifs à S. capitis, S. lugdunensis, S. caprae et mixtes

Germe	Nombre Patients	Prélèvements+ /total	Prélèvements polymicrobiens	Anapath+ /total
<i>S. capitis</i>	32	54/111 (48,6%)	33/111 (29,7%)	4/9
<i>S. lugdunensis</i>	22	60/90 (66,7%)	30/90 (33,3%)	7/8
<i>S. caprae</i>	9	19/34 (55,9%)	6/34 (17,6%)	2/3
mixte	5	13/20 (65%)	4/20 (20%)	0/3

Tableau XV : Récapitulatif des patients considérés infectés à S. capitis, S. lugdunensis, S. caprae ou de façon mixte

IOA à :	Patients+/ Total (*)	Patients+/ pvt+ (* ²)	Sex ratio H/F	Age moy. (min-max)	Site Ppal (* ³)	Matériel (%)	Pvt+/ Patient (moy. min-max)
<i>S. capitis</i>	13/68 (19,1%)	13/32 (40,6%)	5,5	51 [22-79]	Genou (46,2%)	69,2	68% [25-100]
<i>S. lugdunensis</i>	15/68 (22,1%)	15/22 (68%)	1	60 [23-83]	Genou (33%) Hanche (33%)	73,3%	82,5% [40-100]
<i>S. caprae</i>	5/68 (7,4%)	5/9 (55,6%)	1,5	48,6 [25-89]	Hanche (40%)	80%	70,8% [50-100]
mixtes	2/68 (2,9%)	2/5 (40%)	-	-	-	100%	-

(*¹) Patients +/total : nombre de patients considérés infectés par rapport au nombre total de patients

(*²) Patients+ /pvt+ : nombre de patients considérés infectés par rapport au nombre de patients chez qui le germe a été isolé.

(*³) Site ppal : localisation principale

5.3 Profils de Résistance des *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae*

Durant la même période 2013-2014, nous avons récupéré les antibiogrammes de tous les *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae* isolés de prélèvements ostéo-articulaires. Ces antibiogrammes ont été réalisés en milieu liquide sur l'automate Vitek2[®] (bioMérieux, France). Certaines CMI ont été déterminées en milieu solide sur gélose par la technique des bandelettes E-Test. Nous nous sommes intéressés à la résistance aux antibiotiques principalement prescrits dans le traitement des IOA à staphylocoques à savoir : clindamycine, rifampicine, ofloxacine, cotrimoxazole, tétracycline (ou minocycline) et oxacilline (résistance à la méticilline, confirmée par les disques de céfoxitine et moxalactam).

Pour *S. lugdunensis*, 24 souches ont été testées. Cette espèce apparaît très sensible aux antibiotiques testés. Aucune souche méti-R n'a été isolée, de même, aucune résistance n'a été observée concernant la rifampicine, l'ofloxacine et le cotrimoxazole. Seulement une

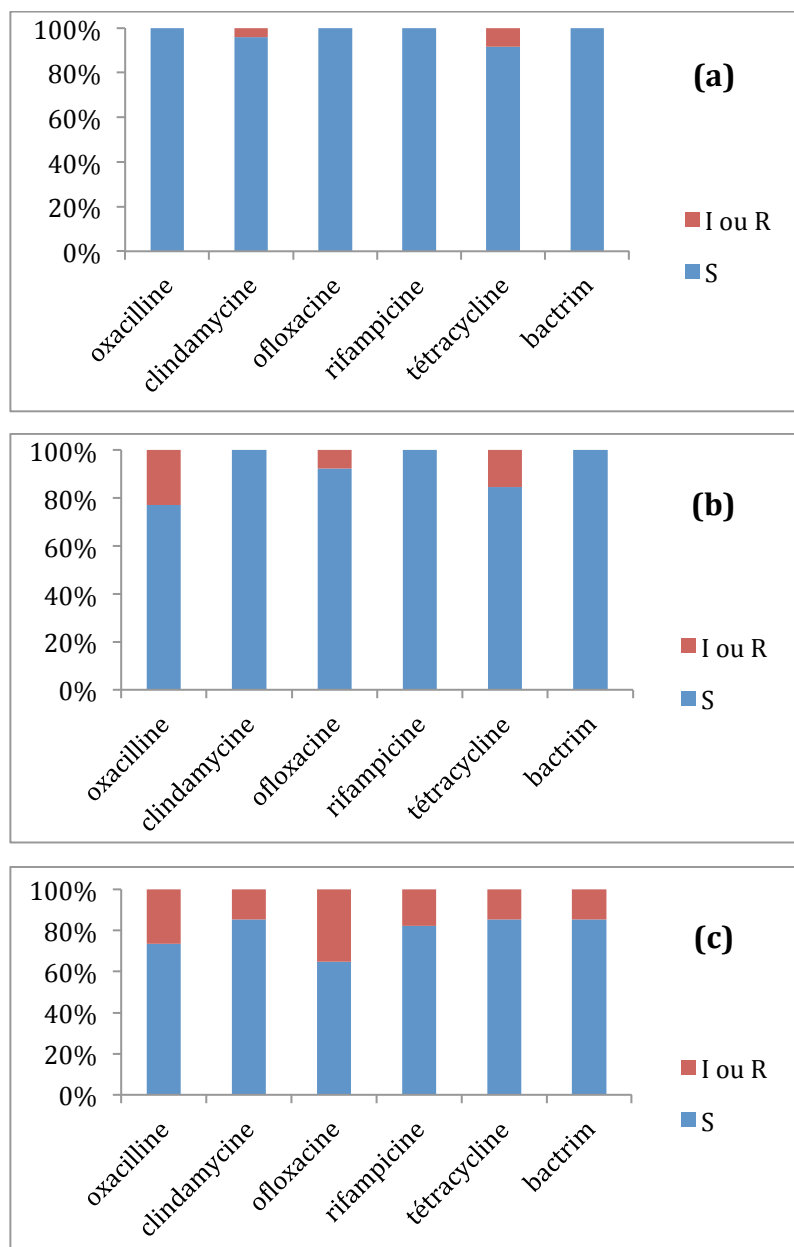
souche était résistante à la clindamycine et deux à la tétracycline, alors que dans un cas la sensibilité à la minocycline était conservée. La daptomycine a été testée dans un seul cas et la souche était sensible.

Les antibiogrammes de 13 souches de *S. caprae* ont été réalisés. De façon comparable à *S. lugdunensis*, ce germe apparaît globalement sensible aux antibiotiques. La seule différence notable concerne la méticillino-résistance de 3 souches de *S. caprae*, soit 23%. Ni la minocycline ni la daptomycine n'ont été testées.

Enfin, 34 souches de *S. capitis* ont été testées et cette espèce apparaît comme la plus résistante. En effet nous avons pu constater 25% de souches méti-R, 35% de résistance à l'ofloxacine, 18% à la rifampicine, 15% à la tétracycline, à la clindamycine et au cotrimoxazole. Les résistances associées étaient la plupart du temps parmi les souches méti-R. La daptomycine a été testée sur deux souches méti-R (souches sensibles), la minocycline a été rendue sensible pour 2 souches.

Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) ont aussi été sensibles quelle que soit l'espèce testée.

La Figure 15 présente les résultats des résistances observées pour les différentes souches.



I ou R : intermédiaire ou résistant, S : sensible

Figure 15 : Pourcentage de sensibilité de *S. lugdunensis* (a), *S. caprae* (b), et *S. capitis*(c)

5.4 Discussion et comparaison des résultats avec les données de la littérature

Un des objectifs principaux de ce travail était de considérer, au sein d'un centre de référence, l'imputabilité que peuvent avoir trois SCN dans les IOA. Globalement, nos résultats permettent de mettre en cause *S. lugdunensis*, *S. capitis* ou *S. caprae* chez la moitié des patients où ces germes ont été isolés. En d'autres termes nous avons pu

confirmer la pathogénicité de *S. lugdunensis* et avons montré que *S. capitis/caprae*, souvent considérés comme des contaminants, sont aussi fréquemment responsables d'IOA. Nous avons réalisé une revue non exhaustive de la littérature permettant de comparer notre travail aux données déjà existantes.

Rôle de *S. lugdunensis*, *S. caprae* et *S. capitis* dans les IOA

La pathogénicité de *S. lugdunensis* a de nombreuses fois été mise en évidence. Décrit pour la première fois à Lyon (à l'origine de son nom d'espèce) en 1988, il est à l'origine d'infections diverses, redouté en cardiologie car il peut être responsable d'endocardites de gravité particulière (délabrement très rapide des valves cardiaques). Sa pathogénicité inhabituelle pour un SCN est à rapprocher de celle de *S. aureus*. En effet il possède de nombreux facteurs de virulence comme la présence d'une coagulase liée (différente de la coagulase libre de *S. aureus*, mais qui peut entraîner des faux positifs en laboratoire avec les tests de détection rapide de la coagulase), une alphatoxine, une hémolysine et des protéines d'adhésion (60,61). Aucune différence n'a été décrite entre les souches commensales de la peau et les souches responsables d'infections. Certains auteurs ont remarqué un fort portage inguinal de ce staphylocoque, pouvant être à l'origine d'infections post-opératoires (62). De nombreux cas d'IOA sont aussi reportés. Lecuire et *al.* (63) rapportent 7 cas d'infections de PTH ou de PTG, dont 4 infections chroniques traitées par ablation puis repose d'évolution favorable et 3 cas d'infections précoces d'évolution défavorable après lavage et antibiothérapie. D'autres auteurs ont montré une efficacité de la prise en charge chirurgicale par ablation puis repose de la prothèse (12). Les différents cas décrits surviennent autant de façon aigue que chronique, mais dans presque toutes les situations il y a présence de matériel, ce qui renforce l'idée de persistance de ce germe sous forme de biofilm. De plus, les stratégies de prise en charge chirurgicales associant changement de la prothèse et antibiothérapie semblent les plus efficaces. Nous n'avons pas mis en évidence une incidence plus grande en fonction du sexe ni localisations préférentielles de l'infection (5 PTH et 5 PTG), alors que certains auteurs ont montré une majorité d'IOA sur PTG (13). Notre série est cependant petite ; cela explique peut-être cette répartition. Ainsi, nous confirmons ici la place de *S. lugdunensis* comme pathogène à part entière dans les IOA, qu'il soit isolé seul ou en association avec d'autres bactéries. Cependant, une critique pourrait être formulée quant aux patients considérés infectés par *S. lugdunensis* : nous avons considéré dans nos critères qu'il faut au minimum 2 prélèvements positifs avec ce germe alors que, en pratique et au vue de son pouvoir pathogène décrit plus haut, un seul prélèvement positif est généralement pris en compte. Ainsi nous avons possiblement sous-estimé le nombre de patients infectés à *S. lugdunensis* (parmi les 7/22 patients non considérés, cf Tableau XV et chapitre 5.2.2.2).

Concernant *S. caprae*, il a été décrit la première fois en 1983, à partir d'échantillons de lait de chèvre, d'où son nom. Ce n'est qu'en 1991 que cette espèce a été isolée pour la première fois à partir d'échantillons humains (principalement des prélèvements ostéo-articulaires) (64). Les rares cas publiés faisaient alors état d'infections urinaires, de bactériémies ou d'endocardites, en différenciant les souches humaines des souches issues de prélèvements animaliers (lait de chèvre) (14). Dans la majorité des cas, la présence d'un matériel (voie veineuse centrale, cathéter ombilical) était à l'origine de l'infection. En 1997, Shuttleworth et *al.* ont décrit 14 observations cliniques de patients chez qui une souche humaine de *S. caprae* a été isolée. Dans 10 cas, il s'agissait d'IOA et 7 patients étaient porteurs d'une prothèse orthopédique (5). Mais les prélèvements étaient polymicrobiens dans la majorité des cas, alors que d'autres observations montreront plus tard des IOA certaines à *S. caprae*, seule bactérie retrouvée (11). Certains cas rapportaient une IOA au niveau de la PTG dix ans après la pose de la prothèse, d'autres cas étaient sans rapport avec un contexte chirurgical ou une immunodépression (65). D'autres études plus récentes dressent un bilan de ce germe et de son implication en pathologie humaine. Les travaux récapitulatifs de Seng et *al.* (66) font état de 31 cas publiés dans la littérature et décrivent 25 autres cas d'IOA à *S. caprae* sur 6 années dans leur étude. Dans 88% des cas il y a présence de matériel. Majoritairement d'expression tardive, ces infections ont été observées dans un contexte d'immunodépression chez un quart des patients (cancer, diabète, immunosuppresseurs ou corticothérapie). Comme dans notre étude, une proportion importante d'infections était polymicrobienne (40%), souvent avec d'autres staphylocoques, et pour 20% des patients, un contact antérieur avec des chèvres ou des moutons a été mentionné. Dans notre étude, aucun facteur de risque particulier n'a pu être relevé quant à la survenue d'infections à *S. caprae* et aucun contact avec des animaux n'a pu être investigué. Ainsi, *S. caprae*, sous-évalué avant les techniques modernes d'identification tel que le MALDI-TOF, apparaît donc comme un germe à connaître dans les étiologies d'infections ostéo-articulaires nosocomiales sur matériel mais il peut également être mis en cause dans un contexte communautaire (dans ce cas, il serait intéressant de rechercher systématiquement un contact avec des moutons ou des chèvres).

Les données liant *S. capitis* et IOA sont moins nombreuses que pour les deux germes précédents alors que nous avons considéré 13 patients atteints d'IOA avec ce germe dans notre étude. Les patients étaient majoritairement des hommes porteurs de PTG. Une étude de 2015 utilise la même manière de raisonner (à savoir un nombre de prélèvements positif ≥ 2) ainsi qu'une identification par MALDI-TOF (16). Ils décrivent 16 patients avec une IOA à *S. capitis* avec des prélèvements aussi bien mono que polymicrobiens. De manière intéressante, ils ont mis en évidence une proportion relativement élevée de *S. capitis* dans l'environnement du bloc opératoire (en suspension dans l'air), suggérant donc que le germe

a été acquis en peropératoire ou post-opératoire précoce, de manière nosocomiale. Aucune investigation de ce type n'a été menée dans notre étude.

En conclusion, grâce à la popularisation de nouvelles techniques d'identification en laboratoire de Biologie Médicale, les données épidémiologiques évoluent, c'est le cas pour les IOA. Bien que ces outils ne permettent pas à eux seuls de trancher si le microorganisme est pathogène ou contaminant, ils contribuent à la précision de ces données. Les SCN représentent un groupe hétérogène de bactéries à bien des égards. Sivadon et al. (67) avaient testé 212 souches de SCN provenant d'IOA. Soixante-dix pourcents étaient des *S. epidermidis*, les autres souches se distribuaient parmi *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. caprae*, *S. pasteurii*, *S. simulans* et *S. cohnii*. Malgré cela, seuls *S. epidermidis* et les trois SCN que nous étudions étaient réellement impliqués dans une IOA. Nous avons donc pu, à notre échelle, incrémenter les données concernant la responsabilité réelle de *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. caprae* dans les IOA.

Certaines critiques ou limites peuvent être formulées sur ce travail. Tout d'abord concernant la première étape d'identification des souches : nous nous sommes en effet basés pour cela sur l'identification par Vitek2. La ré-identification préalable par MALDI-TOF de toutes les souches utilisées nous a permis d'être le plus exhaustif possible en terme épidémiologique, à l'aide de techniques fiables et de référence. Nous avons ainsi montré que l'identification par spectromètre de masse permettait, tout en confirmant les bonnes performances de nos anciennes techniques, de réattribuer certaines souches à une autre espèce. Il est probable que certaines souches présentes dans notre collection et identifiées autrement, soient des *S. caprae*, *S. capitis* et *S. lugdunensis*. Il sera intéressant, dans la poursuite de ce travail, de regarder l'épidémiologie des années à venir, et de voir si l'amélioration des techniques d'identification marque une réelle évolution de l'épidémiologie concernant les staphylocoques isolés dans les IOA. Il est probable que ce biais soit aussi présent dans les quelques anciens articles portant sur l'épidémiologie des IOA à staphylocoques.

Ensuite, en l'absence de réel consensus concernant les critères de définition des IOA, les critères peuvent être discutés et ils constituent de fait la base du raisonnement. Nous avons défini ces critères dans un souci d'uniformiser les dossiers pris en compte mais les résultats anatomopathologiques n'étaient pas tous disponibles ou réalisés, ainsi que l'analyse complète des dossiers patients (facteurs de risques, immunodépression...). Nous avons pu cependant avoir accès au traitement anti-infectieux (non détaillé ici), confirmant la prise en compte de ces staphylocoques dans la prise en charge thérapeutique. De plus, nous n'avons pas évalué le mode de survenue de l'infection, c'est à dire mode aigu ou chronique, ni inclus le suivi des patients au long terme. Cela pourrait faire l'objet d'une étude clinique mono ou multicentrique, afin de mieux définir les caractéristiques cliniques, radiologiques et biologiques de ces IOA.

Enfin, notre étude porte uniquement sur deux années, ce qui fait un nombre très restreint d'IOA à *S. lugdunensis*, *S. caprae* et *S. capititis*. Il serait intéressant de poursuivre cette étude et de la mener de façon prospective, afin de confirmer l'implication de ces trois SCN dans les IOA. Les études épidémiologiques plus longues disponibles dans la littérature séparent généralement *S. aureus* (voire aussi *S. lugdunensis*) des SCN mais détaillent très rarement les différentes espèces de SCN impliquées. Il serait donc intéressant d'améliorer nos connaissances sur ces 3 pathogènes en particulier.

Profils de résistance aux antibiotiques de *S. lugdunensis*, *S. caprae* et *S. capititis*

S'agissant des profils de résistances aux antibiotiques, nos résultats confirment la grande sensibilité de *S. lugdunensis* et *S. caprae*. Pour le premier, le travail de Thean Yen Tan et al. (55) a permis de tester 106 souches de *S. lugdunensis* issues d'endocardites, d'IOA, de méningites, d'infections de la peau et des tissus mous. Dans cette étude, 27% des souches avaient une pénicillinase et chose importante 4 souches étaient résistantes à la céfoxitine (c'est-à-dire méti-R) avec recherche du gène *mecA* positive, ce qui est très rare. Du reste, la sensibilité à la ciprofloxacine, au cotrimoxazole, à la clindamycine était supérieure à 98% et était de 88% pour la tétracycline. Une autre étude rétrospective (13) montre des résultats similaires mais avec une seule souche *mecA* identifiée. La résistance à la méticilline chez *S. lugdunensis* reste donc un phénomène très rare et dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence de souches méti-R.

Pour *S. caprae*, les données de la littérature concordent avec celles de notre étude. Hormis la production régulière d'une pénicillinase, ce germe est très souvent sensible à de nombreux antibiotiques, que ce soit l'oxacilline, les fluoroquinolones, la rifampicine, les cyclines ou le cotrimoxazole (5,66). Malgré la bonne sensibilité de ce germe certains auteurs rapportent un taux élevé d'échec clinique, comme pour *S. lugdunensis* (66), l'implication du biofilm semble en être une des raisons.

Enfin, pour *S. capititis*, les données de la littérature sont plus rares. Tevell et al. (16) classent 26% de leurs souches comme MDR, c'est à dire résistantes à au moins trois classes d'antibiotiques. Nous retrouvons nous aussi un taux de résistance plus élevé par rapport aux autres germes. D'autres auteurs (15) ont trouvé un taux très important de souches résistantes à l'oxacilline (85%), avec une bonne concordance quant à la présence du gène *mecA*. De manière intéressante, ces auteurs mettent en avant la relation entre l'antibiorésistance et une des sous espèces de *S. capititis*. En effet *S. capititis* subsp. *urealyticus* est souvent résistant à l'oxacilline, à la pénicilline et à l'érythromycine, alors que *S. capititis* subsp. *capititis* est assez sensible. La distinction entre les deux sous espèces n'a pas été réalisée dans notre étude. Cela fera l'objet d'un prochain travail.

Identification de 2 nouvelles espèces isolées dans des prélèvements ostéo-articulaires : *S. pettenkoferi* et *S. pasteurii*

À travers notre travail de ré-identification des souches au spectromètre de masse, nous avons nouvellement identifié 2 espèces, confirmées par la biologie moléculaire : *S. pettenkoferi* et *S. pasteurii*. Le premier a été isolé la première fois en 2002 à partir d'hémocultures (68). Ce germe a déjà pu être considéré comme pathogène au décours d'une bactériémie (69), responsable de la colonisation d'un cathéter ou alors contaminant de la flore cutanée (70). Dans cet article, Sholhui et al. (70) mettent en avant la difficulté d'identification de *S. pettenkoferi* par les méthodes phénotypiques à cause de l'inconstance des caractéristiques biochimiques de ce germe. De plus, certains automates MALDI-TOF ne permettent pas non plus d'identifier ce germe: le Vitek MS® (Biomérieux) ne le contient pas dans sa base de données alors que celui utilisé au laboratoire du CHU de Toulouse, le Biotyper® (Bruker Daltonics) le contient. De manière intéressante, *S. pettenkoferi* est souvent identifié comme *S. auricularis*, *S. warneri* ou alors, comme dans nos résultats, comme *S. capitis* (subsp. *capitis*) car ses caractères biochimiques sont proches (68,70). Le premier cas d'ostéomyélite à *S. pettenkoferi* a été décrit en 2006 avec les mêmes problèmes d'identification avec *S. capitis* et *S. auricularis* (71). La plupart des souches décrites sont globalement résistantes : les trois quart sont résistantes à la pénicilline ainsi qu'à l'oxacilline, la ciprofloxacine, l'érythromycine, la moitié sont résistantes à la clindamycine et au triméthoprime-sulfaméthoxazole, alors qu'aucune souche résistante aux glycopeptides n'a été décrite. Concernant les trois souches que nous avons ré-identifié *S. pettenkoferi*, elles étaient issues de prélèvements d'arthrodèse, de foyer profond de pseudarthrose ou d'hématome profond et ont été considérées comme des contaminants. Ces trois souches apparaissaient sensibles aux antibiotiques testés sauf pour la fosfomycine (les 3 résistantes), et deux souches sur trois étaient méti-R.

Quant à *S. pasteurii*, il fut décrit pour la première fois en 1993 chez l'Homme et l'animal (72). De très rares cas d'infections humaines ont été décrits dans la littérature, d'une part parce que son isolement est rare et d'autre part parce qu'il est souvent considéré comme contaminant. *S. pasteurii* a été reporté comme responsable de bactériémies principalement chez des patients dans un contexte d'immunodépression cancéreuse (69,73). En revanche, et comme pour la souche isolée dans notre laboratoire, ce germe n'a pas été identifié comme potentiellement responsable d'IOA, mais seulement comme contaminant (67). Il serait ainsi intéressant de voir si ces deux espèces ont été isolées de façon plus fréquente depuis le changement de technique d'identification au laboratoire. Les données obtenues en 2015 ne semblent pas aller dans ce sens.

6 Efficacité *in vitro* des antibiotiques sur *S. capitis* et *S. caprae* dans un modèle de biofilm

Ce travail nous a permis de mettre en évidence une forte proportion de porteurs de matériel (prothèse ou autres) chez les patients infectés à *S. capitis* ou *S. caprae*. Ces matériels sont de très bons supports d'adhésion pour de nombreuses bactéries (dont celles du genre *Staphylococcus*) qui vont s'organiser sous forme de biofilm. En partant de ces constatations, il nous a paru intéressant de tenter d'approfondir nos connaissances sur l'effet de certains antibiotiques sur un biofilm formé par des souches de SCN. Après avoir déterminé la CMI et la CMB (en milieu liquide) des germes étudiés vis à vis de la minocycline, de la clindamycine, de l'ofloxacine et de la rifampicine en milieu planctonique, nous utiliserons un modèle de formation de biofilm pour tester l'activité *in vitro* sur bactéries sessiles de ces antibiotiques.

6.1 Matériel et méthode

6.1.1 Sélection des souches et des antibiotiques

6.1.1.1 *Choix des souches*

La première étape de ce travail est de sélectionner les souches d'intérêt, c'est à dire celles responsables d'IOA sur matériel. Une étude préliminaire ayant pour objectif de valider le modèle de biofilm *in vitro* a été réalisée sur 4 souches, 2 *S. caprae* et 2 *S. capitis* sélectionnées sur la base des critères que nous avons utilisés précédemment:

- présence de matériel
- majorité de prélèvements positifs à *S. capitis* ou *S. caprae*
- peu de prélèvements positifs à d'autres germes
- examen anatomopathologique en faveur d'une infection (si disponible)

Notre choix s'est porté sur ces deux espèces de staphylocoques car la bibliographie en matière de biofilm est limitée, surtout dans le cadre des IOA, contrairement à celle sur *S. lugdunensis* (74). Cui et al. (15) mettent en avant 2 sous-types différents de *S. capitis* avec des capacités de formation de biofilm différentes, ces souches étant extraites de bactériémies néonatales. Pour 4 souches de *S. caprae* isolées chez des patients avec infection sur matériel orthopédique, Allignet et al. (11) décrivent des facteurs d'adhésion et

de production de matrice exopolysaccharidique similaires à ceux rencontrés chez *S. epidermidis*.

Enfin, les manipulations que nous allons décrire sont réalisées manuellement pour la plupart, sont fastidieuses et n'autorisent donc pas un nombre trop important de souches à tester. L'objectif de ce travail était de valider le modèle de biofilm utilisé afin de l'utiliser de manière prospective dans des cas avérés d'IOA à *S. caprae* et *S. capitis*. Le tableau XVI résume les caractéristiques des patients infectés par les souches sélectionnées.

Tableau XVI : Origine des souches sélectionnées pour une évaluation sur le biofilm

N°	N°MOLIS	Germe	Patient	Origine	Matériel	Pvt+/ pvt tot.	Autres germes
1	A143012722	<i>S. capitis</i>	M	genou	oui	6/6	3/6
17	A141342312	<i>S. capitis</i>	M	jambe	oui	3/5	1/5
33	A140064202	<i>S. caprae</i>	M	genou	oui	3/3	0/3
36	A133400689	<i>S. caprae</i>	F	jambe	oui	5/5	0/5

Pvt = prélèvement ; tot. = total ; M = masculin ; F = féminin

6.1.1.2 Choix des antibiotiques

L'aptitude à former du biofilm par les staphylocoques rentre en compte dans la stratégie thérapeutique car elle entraîne une perte de sensibilité à de nombreux antibiotiques (75), indépendante des résistances naturelles ou acquises. Cependant, certains antibiotiques sont considérés comme ayant une bonne activité sur le biofilm, notamment la rifampicine qui est considérée comme la meilleure molécule anti-biofilm. D'autres antibiotiques ont aussi cette propriété, c'est le cas de la ciprofloxacine, de la vancomycine (76), ainsi que de la daptomycine (77).

De plus, les associations de molécules sont obligatoires dans le traitement des IOA afin d'éviter la sélection de populations résistantes. La rifampicine, introduite dans un second temps, sert de base à cette association lors du relais par voie orale que ce soit pour un staphylocoque sensible ou résistant à la méticilline. Selon les recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (29) et les antibiogrammes des différents germes, elle peut être associée à une quinolone (ofloxacine, ciprofloxacine ou lévofloxacine), à la clindamycine, à l'acide fusidique, au cotrimoxazole ou à une cycline (tétracycline ou minocycline). Le choix préférentiel est la combinaison rifampicine – fluoroquinolone, surtout s'il y a présence de matériel, comme le suggère certaines études (78),(79). Néanmoins il y a au final peu de données issues d'essais randomisés chez

l'Homme, ce sont le plus souvent des études sur des séries de cas avec les biais potentiels qu'elles peuvent avoir ou des études *in vitro*.

En pratique locale au CHU de Toulouse, la minocycline est régulièrement prescrite dans le traitement des IOA en relais *per os*, pour des staphylocoques méti-S ou méti-R. Son indication est principalement en association à la rifampicine et en cas de contre-indication aux fluoroquinolones ou si aucun autre antibiotique n'est disponible (données de l'antibiogramme). Elle a une très bonne activité anti-staphylococcique avec un faible taux de résistance, une excellente biodisponibilité et semble représenter une bonne alternative de traitement pour des infections diverses à SARM (80). Sa CMI est globalement meilleure que la doxycycline mais elle est moins bien tolérée. Certaines études ont été menées sur l'association minocycline – rifampicine dans le cadre de la prévention des infections sur cathéters, avec succès (81), (82), suggérant un effet anti-biofilm. D'autres études, mais peu nombreuses, ont mis en évidence l'efficacité de la minocycline seule ou en association contre des souches de SARM organisées en biofilm (83), mais cette activité est valable sur des biofilms récemment formés (84). En revanche la littérature scientifique est pauvre en ce qui concerne l'effet anti-biofilm dans les IOA sur matériel prothétique.

Dans cette optique, notre choix était donc de tester la minocycline sur les quatre souches sélectionnées, ainsi que de tester en plus la rifampicine, clindamycine et ofloxacine sur une souche pour vérifier notre méthode vis à vis des données de la littérature. Ces antibiotiques ont été obtenus chez Sigma Aldrich[®], sous forme de poudre hydrosoluble.

6.1.2 Détermination des CMI et CMB en milieu planctonique

6.1.2.1 *Concentrations minimales inhibitrices*

Elle représente la plus petite concentration permettant d'inhiber la croissance bactérienne visible après 18 h d'incubation à 37°C. Les valeurs de CMI des 4 souches choisies ont déjà été rendues par une méthode automatisée (Vitek2[®], Biomérieux France). Cependant, la méthode par dilution en milieu planctonique est plus précise.

Les souches utilisées ont été repiquées sur gélose au sang et incubées 24 h. Une ou plusieurs colonie(s) est (sont) mise(s) en suspension dans 10 mL d'eau distillée stérile de sorte qu'il y ait un inoculum de départ de 10⁷ bactéries, ce qui correspond à une transmission de la lumière de 60-65% mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Le milieu utilisé est du Mueller Hinton (MH) sous forme de poudre, préparé dans de l'eau distillée stérile et autoclavé. Les antibiotiques sont pesés à l'aide d'une balance de précision (au dixième de milligramme) puis solubilisés dans 5 mL d'eau distillée stérile afin d'obtenir une concentration de base de 64 µg/mL pour la clindamycine, la minocycline et l'ofloxacine et de

32 µg/mL pour la rifampicine. Ces concentrations permettent de réaliser des dilutions de raison 2 et de couvrir une large plage de CMI.

Les plans des plaques de 96 cupules sont les suivants (12 puits de longueur, 8 de largeur) :

AB1 32 µg/mL	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	T-	T+
AB1' 32 µg/mL	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	T-	T+
AB2 32 µg/mL	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	T-	T+
AB2' 32 µg/mL	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	T-	T+
etc...											

Figure 16 : Schéma de la plaque pour détermination des CMI sur souches planctoniques

Plaque a : 100 µL de bouillon MH dans toutes les cupules + 100 µL de la solution mère d'antibiotique (soit une dilution au demi) dans la colonne 1. Prendre 100 µL de la cupule 1 pour la mettre dans la cupule 2 et ainsi de suite = dilution de raison 2 jusqu'à la colonne 10 (jeter le dernier volume).

Colonne 11 : T- = témoin négatif avec seulement le MH = test de non contamination

Colonne 12 : T+ = témoin positif avec MH + bactéries = test de vérification de croissance

AB1 : antibiotique 1, chacun est testé en double (AB1') pour vérifier les valeurs de CMI

Plaque b : 100 µL de la solution de départ à 10^7 bactéries dans chaque cupule, sauf colonne 11 (T-).

La « plaque a » est ensuiteensemencée à partir de la « plaque b » à l'aide d'un ensementeur automatique multipoint (inoculum bactérien calibré ~ 1,5 µL) dont chaque point est stérilisé par flambage à l'éthanol. La « plaque a » est incubée 24 heures à 37°C. La lecture de la CMI se fait au niveau de la première cupule limpide de chaque ligne. La colonne 12 (T+) doit être trouble, et la colonne 11 (T-) limpide.

6.1.2.2 Concentrations minimales bactéricides

C'est la plus petite concentration permettant de tuer 99,9% des bactéries après 18 h d'incubation à 37°C. Après la lecture des CMI, la « plaque a » est repiquée sur une gélose

carrée (milieu MH) à l'aide de l'ensemencement multipoint, puis les géloses sont incubées 24 heures de plus à 37°C. La CMB correspond à la plus petite concentration avec absence de croissance bactérienne, c'est à dire au premier spot sur gélose où il n'y a pas (ou peu) de colonies bactériennes visibles.

6.1.3 Détermination de l'activité antibiotique sur un modèle de biofilm

6.1.3.1 Pré requis

Ce protocole tient compte de travaux préliminaires (thèse A. Alasri, 1991) qui ont consisté en la mise en œuvre de biofilms à staphylocoques (*S. aureus* et SCN) dans des conditions se rapprochant du contexte *in vivo*. Nous devons citer de façon préalable certains résultats de ces travaux qui nous ont permis de réaliser notre étude.

Les souches de référence *S. aureus* et *S. epidermidis* n'ont pas de croissance planctonique en « bouillon biofilm » (ou BB, voir la composition en Annexe 4). Par contre, dans ce même milieu, la croissance sous forme de biofilm est très rapide et la saturation du nombre de cellules adhérentes intervient dès 24 h, ce qui autorise le renouvellement du « BB » à cette période, et non pas avant pour la souche de SCN. Le BB est un milieu pauvre, qui favorise la phase d'adhésion et l'organisation des colonies bactériennes en biofilm. Son renouvellement a pour but d'éliminer le maximum de cellules persistantes ou relarguées sous forme planctonique pour ne travailler que sur celles sous forme biofilm.

Choix de la concentration d'antibiotique utilisée : c'est un point important de l'étude car elle doit tenir compte de nombreux facteurs qui sont pour autant difficilement appréciables *in vitro*. En effet les différentes variables sont la concentration sérique de l'antibiotique, sa concentration au niveau de l'os et du site infectieux, sa diffusion dans le biofilm, les conditions d'oxygénation, ses propriétés pharmacocinétiques (par voie orale)...Pour apprécier cela nous pouvons utiliser le quotient inhibiteur tissulaire, qui représente le rapport entre la concentration sérique et la CMI (ce rapport doit être élevé), le tout multiplié par le ratio os/sang qui va représenter le pourcentage d'antibiotique qui atteint l'os :

$$Q_iT = \frac{C \text{ sérique}}{CMI} \times \text{ratio os/sang}$$

Appliqué au genre staphylocoque et pour la minocycline:

$$Q_iT = \frac{3,2}{0,5} \times 0,3 = 1,92$$

-CMI minocycline vis à vis des staphylocoques spp. : sensible si \leq à 0,5 mg/L (CA-SFM EUCAST 2014)

-Concentrations sériques pour une dose de minocycline de 200 mg par voie orale : 3,2 mg/L (Résumé des caractéristiques du produit), il faut mieux utiliser la concentration à l'équilibre.

-Ratio os/sang : bonne diffusion, minimum 30% (valeurs de 30 à 100% selon Traitement des infections osseuses sur matériel étranger, Zeller, Desplaces et Al., lettre de l'infectiologue, Dec. 2004)

Les données de la littérature manquent là aussi en ce qui concerne la minocycline et les infections ostéo-articulaires. Dans un souci d'uniformiser nos expériences et d'être reproductible, nous avons donc décidé de nous placer à une concentration de **4 fois la CMI** de chaque antibiotique vis à vis de la bactérie test, c'est à dire $4 \times 0,5 \text{ mg/L} = 2 \text{ mg/L}$, valeur proche du Q_iT (sans unités).

6.1.3.2 Protocole

L'ensemble des manipulations est réalisé sous PSM de classe II.

Jour 0 :

La préparation des souches utilisées est la même que pour la réalisation des CMI sauf que le volume total de la suspension bactérienne est de 10mL. Une gamme de dilution de raison 10 est réalisée jusqu'à 10^{-6} .

On utilise des plaques de 24 puits dans lesquels 2mL de BB sont introduits. Deux puits sont utilisés pour chaque antibiotique et pour chaque souche afin de réaliser une moyenne. Les paires de puits sont bien espacées afin de minimiser le risque de contamination. Ces puits sont ensemencés avec 100 μL de la suspension bactérienne à la dilution 10^{-2} . La quantité bactérienne en UFC/ml sera validée le lendemain grâce à l'ensemencement sur gélose de 100 μL des dilutions bactériennes à 10^{-5} et 10^{-6} . Un témoin positif (T+) est ensemencé pour chaque souche, il ne contient pas d'antibiotiques.

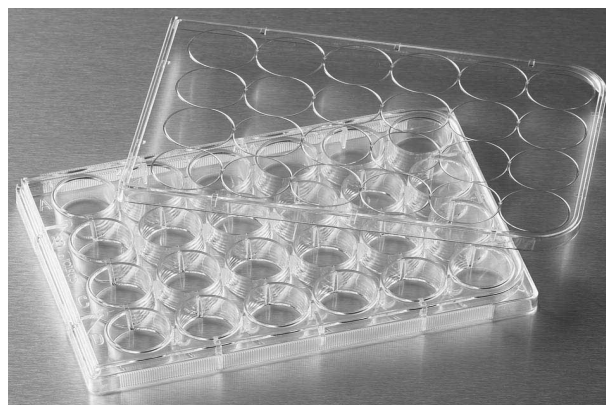


Figure 17: plaque 24 puits

Jour 1:

Le BB est renouvelé, en ayant entre temps lavé chaque puits avec de l'EDS (eau distillée stérile). **L'ajout de l'antibiotique se fait à ce moment-là, une fois le biofilm de 24 heures constitué.** On peut noter que le volume rajouté est très faible et n'influence donc que très peu le volume total et donc la concentration finale de l'antibiotique.

Calcul des quantités bactériennesensemencées à JO (comptage sur gélose à 24 heures) :

Souche N°33 : 200 colonies comptées pour 100 µL de la dilution 10^{-5} , soit $2 \cdot 10^6$ pour la dilution à 10^{-2} , soit une concentration de 10^4 UFC/mL dans le puits de départ (BB + 100 µL suspension bactérienne). En prenant le même raisonnement pour les autres souches :

Souche N°36 : 10^4 UFC/mL

Souche N°1 : $4 \cdot 10^3$ UFC/mL

Souche N°17 : $2,5 \cdot 10^3$ UFC/mL

Ce calcul a pour but de montrer que les quantités bactériennes des différentes souchesensemencées sont proches et n'est pas censé influencer le résultat final.

Jour 2:

Le BB de chaque puits est éliminé et chaque puits est rincé à l'EDS. Une spatule préalablement stérilisée est utilisée pour gratter le fond et les côtés du puits où le biofilm s'est constitué, afin de remettre tout le biofilm en suspension dans 1mL d'EDS. Ce volume est dilué de raison 2 jusqu'à la dilution 10^{-6} . Après homogénéisation, chaque dilution estensemencée par inclusion de 500µL de la suspension dans de la gélose trypticase soja au sein d'une boîte de Petri. L'incubation est de 24 h à 37°C.

Jour 3:

Le nombre de colonies bactériennes est décompté à la dilution la plus facile à lire. De manière générale on utilise la dilution permettant de compter entre 30 et 300 colonies.

6.2 Résultats

6.2.1 Résultats expérimentaux CMI/CMB

Selon le CASFM 2015 version 2 (idem que CASFM 2013 pour ces valeurs), les CMI des antibiotiques testés vis-à-vis des souches de *Staphylococcus spp.* sont les suivantes :

Clindamycine : Sensible si $\leq 0,25$ mg/L

Minocycline : Sensible si $\leq 0,5$ mg/L

Ofloxacin : Sensible si ≤ 1 mg/L

Rifampicine : Sensible si $\leq 0,06$ mg/L

Tableau XVII: CMI et CMB mesurées vis-à-vis de *S. capitis* et *S. caprae* :

N° et germe		CMI			
		Clindamycine	Minocycline	Ofloxacine	Rifampicine
1	<i>S. capitis</i>	< 0,0625	< 0,0625	8	16
17	<i>S. capitis</i>	0,125	< 0,0625	8	16
33	<i>S. caprae</i>	< 0,0625	< 0,0625	0,5	< 0,031
36	<i>S. caprae</i>	< 0,0625	0,125	0,5	< 0,031
		CMB			
		Clindamycine	Minocycline	Ofloxacine	Rifampicine
1	<i>S. capitis</i>	< 0,0625	0,125	32	>16
17	<i>S. capitis</i>	0,125	0,125	8	16
33	<i>S. caprae</i>	0,125	< 0,0625	0,5	< 0,031
36	<i>S. caprae</i>	0,25	0,5	1	< 0,031

CMI et CMB en µg/ml ; < : aucune pousse = valeur de CMI/CMB très basse ; sensible ; résistant

Les valeurs du *Tableau XVII* ont été déterminées en double avec le même résultat. Toutes les souches sont sensibles à la clindamycine et la minocycline, les souches de *S. caprae* (33 et 36) sont en plus sensibles à l'ofloxacine et la rifampicine.

Ces CMI avaient été réalisées au laboratoire de Bactériologie par Vitek2. La clindamycine était interprétée grâce à la lincomycine, et seule la tétracycline était testée d'office, la minocycline étant testée sur demande. À ce titre, toutes les CMI mesurées étaient comparables entre la technique Vitek2 et les CMI en milieu liquide pour les souches n°1, 17 et 33. Pour la souche n° 36, l'antibiogramme avait été réalisé par diffusion et donc non comparable.

6.2.2 Effet anti-biofilm

L'effet anti-biofilm est apprécié par la diminution du nombre de bactéries adhérees suite à l'ajout de l'antibiotique par rapport au témoin positif. Nous rappelons que cet effet anti-biofilm recherché est évalué sur du biofilm déjà formé depuis 24h. Afin d'être plus représentatif, toutes les expériences (hormis pour le témoin positif) ont été réalisées deux fois (série 1 et série 2).

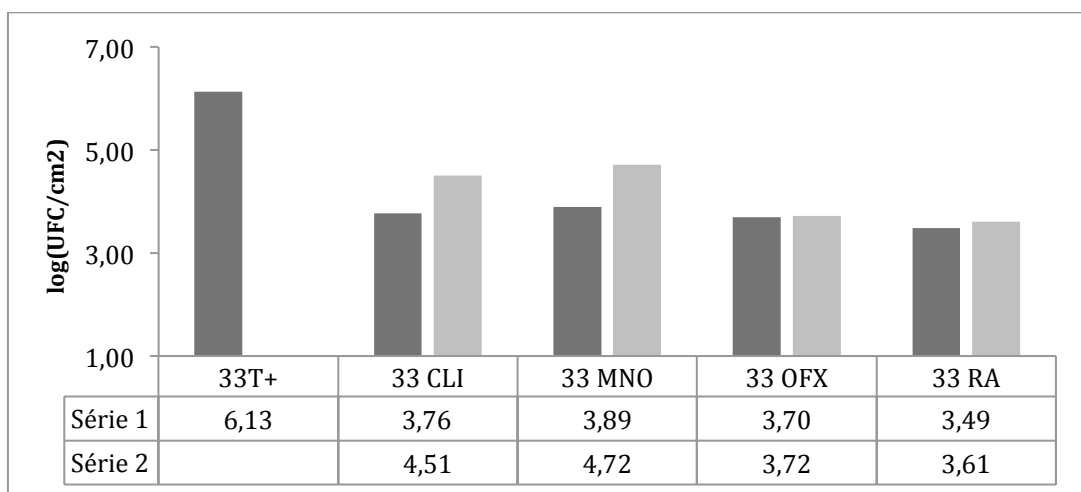
Le nombre de bactéries adhérees (**B** ou biomasse bactérienne fixée), exprimé en UFC/cm², est calculé de la façon suivante :

$$B = \frac{N}{V.F.S}$$

N : nombre de colonies décomptées ; *F* : facteur de dilution (selon dilution à laquelle les bactéries sont comptées sur gélose) ; *V* : volume ensemencé (0,5ml) ; *S* : surface du puits occupée par 2ml de milieu liquide (7,08 cm²)

La souche n°33 de *S. caprae*, sensible à tous les antibiotiques testés, a été utilisée pour vérifier l'effet anti-biofilm des différents antibiotiques. Cette expérience permet de valider la méthode utilisée, connaissant notamment l'effet anti-biofilm de la rifampicine qui sert de témoin.

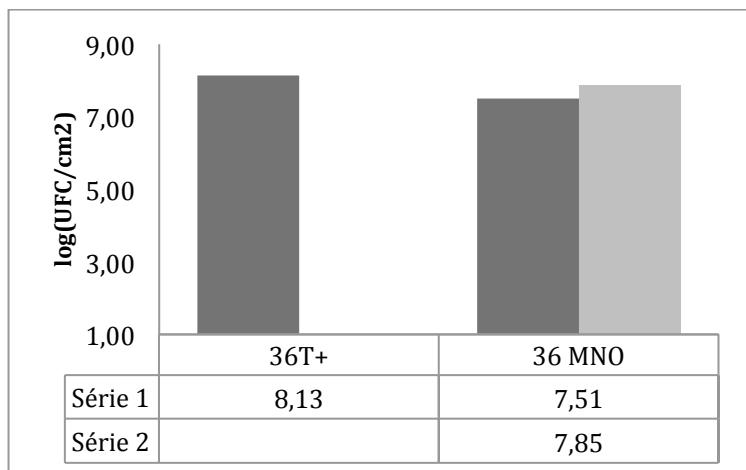
La Figure 18 montre une diminution moyenne de 2 logs, 1,8 logs, 2,4 logs et 2,6 logs respectivement pour la clindamycine, la minocycline, l'ofloxacine et la rifampicine. Le nombre de bactéries adhérees est exprimé en log décimal. Nous observons une diminution du nombre de colonies adhérees suite à l'ajout des quatre antibiotiques dans des proportions proches, avec un effet qui semble un peu plus important pour la rifampicine. Ainsi, ce travail préliminaire nous autorise à utiliser ce modèle pour la suite de nos expériences.



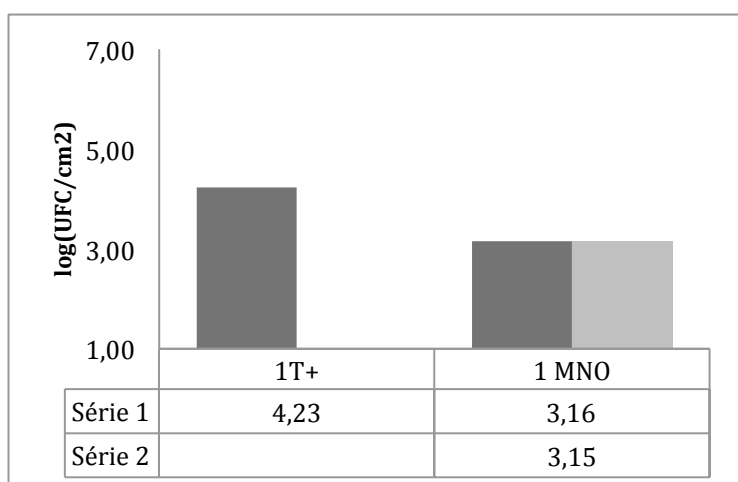
CLI = clindamycine ; MNO = minocycline ; OFX = ofloxacine ; RA = rifampicine

Figure 18 : Effet anti-biofilm des antibiotiques sur la souche n°33 de S. caprae

Nous nous sommes concentrés sur la minocycline et l'avons testée sur les deux souches de *S. capitis* (n°1 et 17) et sur l'autre souche de *S. caprae* (n°36). Les résultats sont présentés Figure 19



L'effet antibiotique de la minocycline sur la souche n°36 de *S. caprae* est plus limité (diminution de 0,45 log). Plusieurs explications peuvent être avancées : souche productrice de plus de biofilm (8 log détectés pour le biofilm témoin, versus 6 log dans le cas du biofilm témoin de la souche n°33), faible action de l'antibiotique (reproductibilité des résultats entre les deux séries d'essais).



L'effet antibiotique de la minocycline sur les souches n°1 et 17 de *S. capitis* est marqué avec une diminution moyenne de 1,1 log et de 1,2 log respectivement. Les valeurs des deux séries sont quasiment identiques.

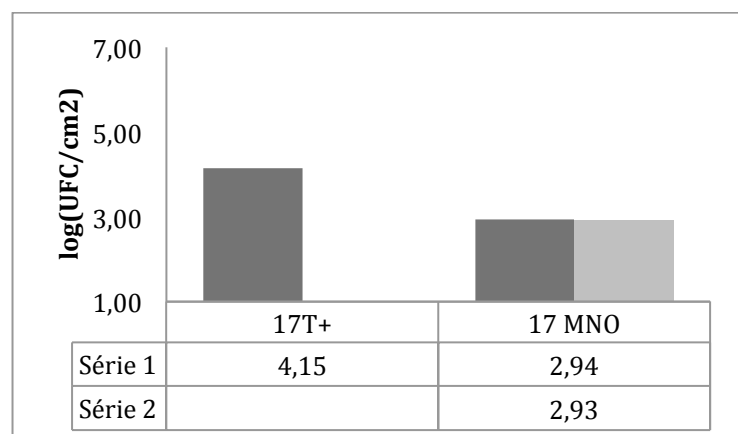


Figure 19 : Effet anti-biofilm de la minocycline (MNO) sur les souches de *S. caprae* et de *S. capitis*

Les valeurs du témoin positif représentent le nombre de bactéries adhérees sans ajout d'antibiotique c'est-à-dire la capacité de la souche à s'organiser en biofilm. La même quantité bactérienne a été inoculée dans chaque puits et toutes les souches utilisées correspondent à une pré-culture de 24h en avance. Les deux souches de *S. capitis* semblent produire moins de biofilm que les souches de *S. caprae*. En effet les valeurs des témoins

positifs sont plus élevées pour *S. caprae* que pour *S. capitis* pour des inocula de départ proches (8,13 log et 6,13 log UFC/cm² versus 4,15 log et 4,23 log UFC/cm² respectivement).

6.3 Discussion

Les résultats de notre étude permettent de mettre en évidence :

- Une capacité plus faible de formation de biofilm des deux souches de *S. capitis* par rapport à *S. caprae*. Dans le cas de *S. capitis* la quantité de bactéries présentes dans le biofilm est de même niveau que l'inoculum semblant démontrer une faible capacité à adhérer et/ou à proliférer sous forme sessile. Des essais avec prolongation du temps d'incubation devraient être réalisés afin de confirmer ce point.
- Une capacité à former un biofilm importante pour les souches de *S. caprae*, avec cependant des niveaux de colonisation différents entre les deux souches (6 et 8 log).
- Une activité plus faible des antibiotiques testés sur bactéries en biofilm par rapport aux bactéries planctoniques. En effet, même en traitant le biofilm par des concentrations = 4 x CMI, on note une diminution du niveau de colonisation, mais la bactéricidie ne correspond qu'à 99% (2 log) (souche de *S. caprae* n°33)
- Une activité anti-biofilm de la minocycline. Cette activité se révèle cependant variable induisant une réduction de 90% (1 log) - 99% (2 log), voire seulement 0.45 log dans le cas de la souche de *S. caprae* n° 36. Il est à noter que cette souche est celle qui présentait la valeur de CMB la plus élevée (0,5 mg/L). Par opposition, la souche de *S. caprae* n°33, présentait des valeurs de CMI/CMB très basses (< 0,0625 mg/L), ce qui pourrait expliquer la différence d'activité observée sur biofilm.

Nous avons montré une sensibilité importante à la tétracycline des souches de *S. lugdunensis*, *S. caprae* et *S. capitis* isolées de prélèvements ostéo-articulaires. La sensibilité à la minocycline est d'autant plus grande que certaines souches classées intermédiaires ou résistantes à la tétracycline étaient sensibles à la minocycline. L'effet anti-biofilm suggéré dans cette étude représente un argument microbiologique important pour l'utilisation de cette molécule dans le traitement des IOA.

Les résultats de Molina-Manso *et al.* sur *S. aureus* et *S. epidermidis* confirment la perte d'activité de différents antibiotiques vis-à-vis des bactéries en biofilm, avec des concentrations bactéricides souvent non détectables (85). Ceci indique un point très important qui est l'absence d'éradication totale des cellules du biofilm et pourrait expliquer les échecs thérapeutiques et les récives. Cela repose l'intérêt des associations d'antibiotiques dans le traitement des IOA.

Tableau XVIII : Concentrations efficaces sur biofilm (CMEB) d'après (85)

Antibiotiques	<i>S. aureus</i> (17)		<i>S. epidermidis</i> (15)	
	CMEB90	% R (Eucast)	CMEB90	% R (Eucast)
Rifampicine	> 64	16,7	> 64	6,3
Vancomycine	> 1024	5,6	> 1024	0
Tigécycline	512	0	512	0
Clindamycine	> 1024	11,1	> 1024	31,3
SXT	> 1024	5,6	> 1024	37,5
Cirpofloxacine	> 1024	66,7	> 1024	37,5
Cloxacilline	> 1024	66,7	> 1024	62,5
Daptomycine	> 1024	0	> 1024	0
Fosfomycine	> 1024	5,6	> 1024	0

Notre expérience comporte néanmoins certaines limites. En effet, l'effet anti-biofilm *in vitro* suggéré dans ce travail a été obtenu seulement dans une atmosphère aérobie avec une concentration donnée d'antibiotique (quatre fois la CMI) et sur un biofilm constitué de 24 h. De nombreux éléments influencent *in vivo* l'efficacité de l'antibiotique au niveau de l'os : sa diffusion osseuse et donc sa concentration réelle au niveau du site infectieux, la présence d'un séquestre, la vascularisation, les conditions d'oxygénation locales plus ou moins aéro-anaérobies ainsi que la concentration en calcium (86,87).

Le traitement des IOA repose souvent sur l'association de plusieurs molécules, nous n'avons pas réalisé de manipulations en ce sens. Cependant, si l'on prend pour exemple la minocycline et la rifampicine, ces deux molécules ont montré séparément un effet anti-biofilm conséquent. Nous pourrions vérifier un éventuel effet cumulatif en ajoutant les deux antibiotiques dans les mêmes puits réactionnels.

Les souches que nous avons utilisées ont été incriminées dans une IOA. Nous aurions pu aussi effectuer en parallèle la même manipulation avec des souches considérées comme contaminants pour voir si l'on observe une différence d'efficacité. En effet, toutes les souches au sein d'une même espèce n'ont pas la même aptitude à produire du biofilm. Toutes les souches de *S. caprae* ne produisent pas de slime et quand elles en produisent, la quantité est variable. De plus, cette capacité ne semble pas être préférentielle des « souches cliniques » isolées de prélèvements humains ou des « souches environnementales » ou de celles isolées chez l'animal (11). *S. caprae*, comme la majorité des SCN, possède assez peu de facteurs de virulence, cependant la capacité d'adhésion aux tissus et la possibilité de former du biofilm sur de nombreuses surfaces inertes poussent à le considérer en pathologie

humaine (11,66). Ces deux propriétés sont sous la gouvernance de plusieurs gènes : le gène *altC* code pour une autolysine qui permet de se lier à un support (fibronectine), et l'opéron *ica* est impliqué dans la formation du biofilm. Alors que pour *S. epidermidis* l'opéron *ica* est plus représenté pour les souches isolées d'IOA ou de cathéters par rapport aux souches isolées de la flore cutanée saine, pour *S. caprae* cet opéron est détecté dans tous les isolats qu'ils soient d'origine humaine ou animale sans lien apparent avec la production de biofilm (11,66,88). De plus, l'opéron *ica* de *S. caprae* contient des gènes étroitement liés (68% de similarité) avec ceux de *S. aureus* et *S. epidermidis* (*icaA*, *icaB*, *icaC* et *icaD*) (89). Cette observation suggère que d'autres gènes sont possiblement impliqués dans la genèse du biofilm ou que l'opéron *ica* est régulé (gène *icaR*) selon des conditions environnementales spécifiques (température, concentration en nutriments...). La question de l'aptitude à former du biofilm dans des proportions variables et donc de l'utilité de molécules anti-biofilm peut se poser alors à toutes les espèces de SCN et *S. aureus*.

D'après nos résultats, *S. capitis* semble produire moins de biofilm ; ceci peut être expliqué de deux manières. En premier lieu et contrairement à *S. epidermidis*, la production de biofilm de *S. capitis* nécessite des conditions expérimentales spécifiques (osmolarité augmentée). Deuxièmement, la sous espèce *urealyticus* produit plus de biofilm que la sous espèce *capitis* (15). La sous espèce *urealyticus* est aussi associée à un profil de résistance plus élevé ce qui lui confère un avantage sélectif sur l'autre sous espèce.

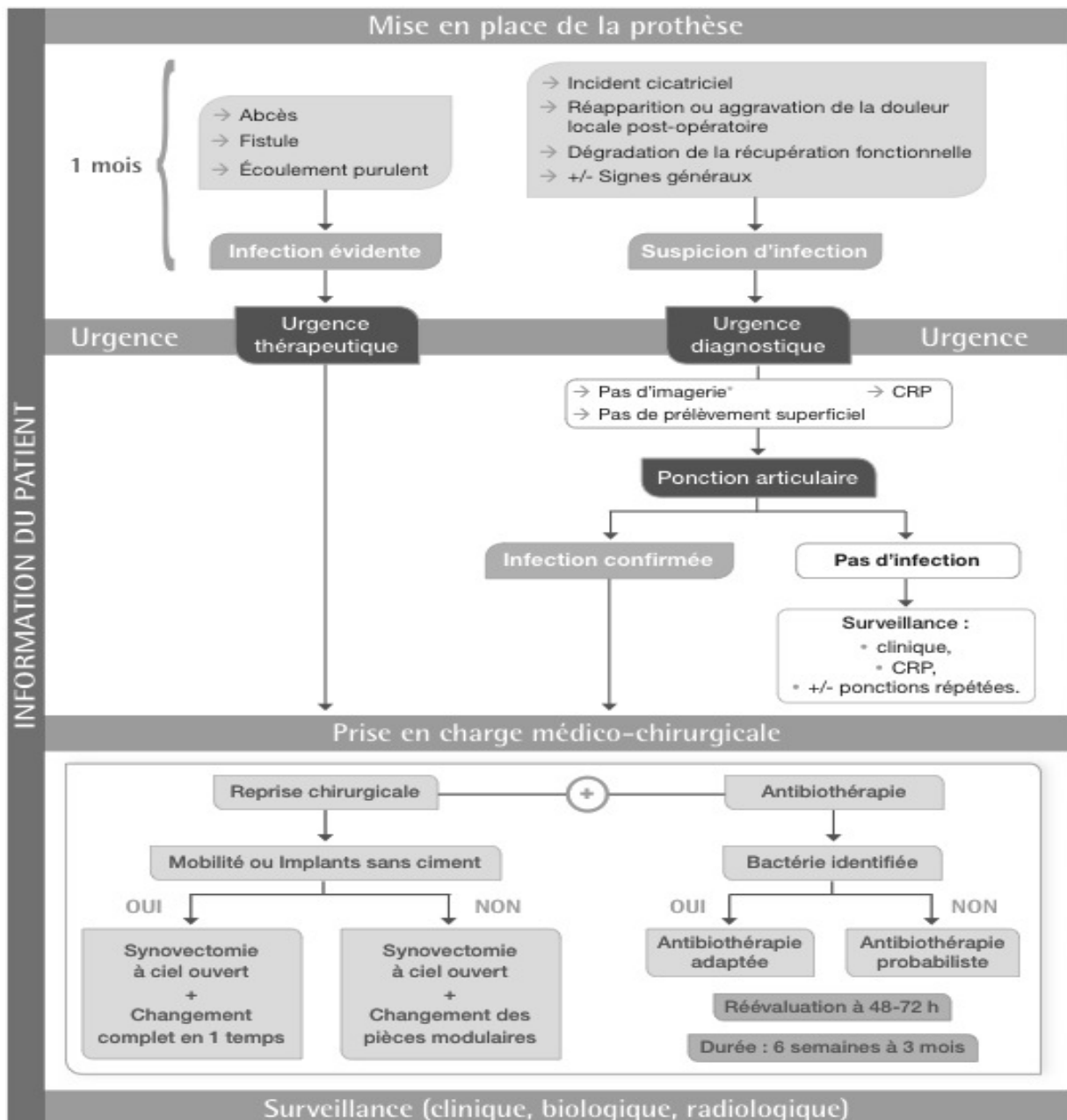
La production de biofilm représente un facteur de virulence important. Bien que cette production soit hétérogène suivant les espèces et les conditions environnementales, elle est associée à la persistance de colonies bactériennes, des infections récurrentes et une plus grande résistance aux antibiotiques. L'activité anti-biofilm d'une molécule est donc nécessaire dans le traitement des infections sur matériel étranger comme les IOA, et la minocycline pourrait être considérée comme un antibiotique potentiellement actif *in vitro*, voire efficace *in vivo* lors d'associations.

7 Conclusion

Les IOA sont des infections dont le diagnostic et le traitement peuvent s'avérer délicats, notamment en présence de matériel. La prise en charge doit s'appuyer sur la coopération entre plusieurs disciplines. Si la microbiologie revêt une part importante dans le diagnostic, la culture bactérienne et l'interprétation des résultats peuvent être difficiles, surtout lors d'infections chroniques où les bactéries tendent à modifier leur métabolisme et/ou s'organiser sous forme de biofilm. La spectrométrie de masse MALDI-TOF représente un apport important pour l'identification fiable et rapide des bactéries, notamment pour les SCN. *S. capitis*, *S. caprae* et *S. lugdunensis* sont des micro-organismes à prendre en compte dans les IOA et il serait peut être utile de poursuivre notre étude sur plus long terme, en étendant possiblement nos investigations à d'autres SCN. L'aptitude de ces staphylocoques à s'organiser sous forme de biofilm complexifie la prise en charge anti-infectieuse des IOA sur matériel prothétique. Il serait intéressant de réaliser des travaux supplémentaires concernant l'activité anti-biofilm de la minocycline sur un plus grand nombre de souches, et sur différentes espèces de staphylocoques. Aussi, une étude prospective sur l'évolution au long cours des patients traités par minocycline, seule ou en association, nous apporterait d'autres précisions quant à l'efficacité et la tolérance de cet antibiotique par rapport à d'autres molécules utilisées.

8 Annexes

Annexe 1 : Recommandations HAS (2014) pour le diagnostic et la prise en charge de l'infection de PTH ou PTG dans le mois suivant l'implantation :



Annexe 2 : Exemple d'algorithme de décision pour la prise en charge aigue ou chronique d'IOA sur prothèse

selon Peel TN, Buising KL, Choong PFM. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: Curr Opin Infect Dis. 2012 :

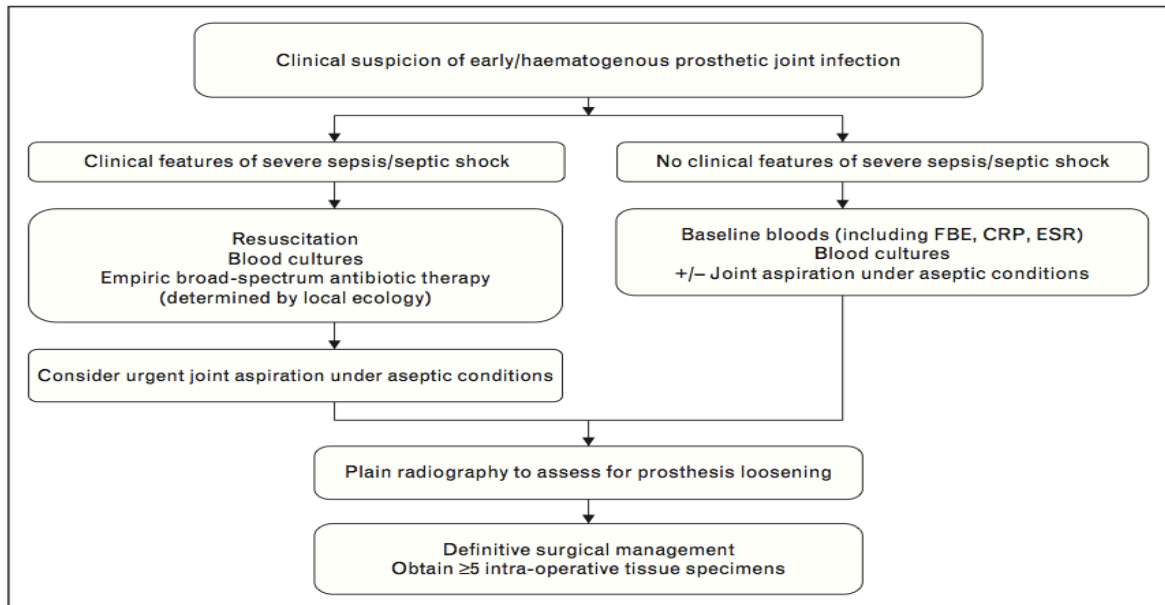


FIGURE 1. Diagnostic algorithm for early/haematogenous prosthetic joint infection [7,18,19*,20]. CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate ; FBE, full blood examination.

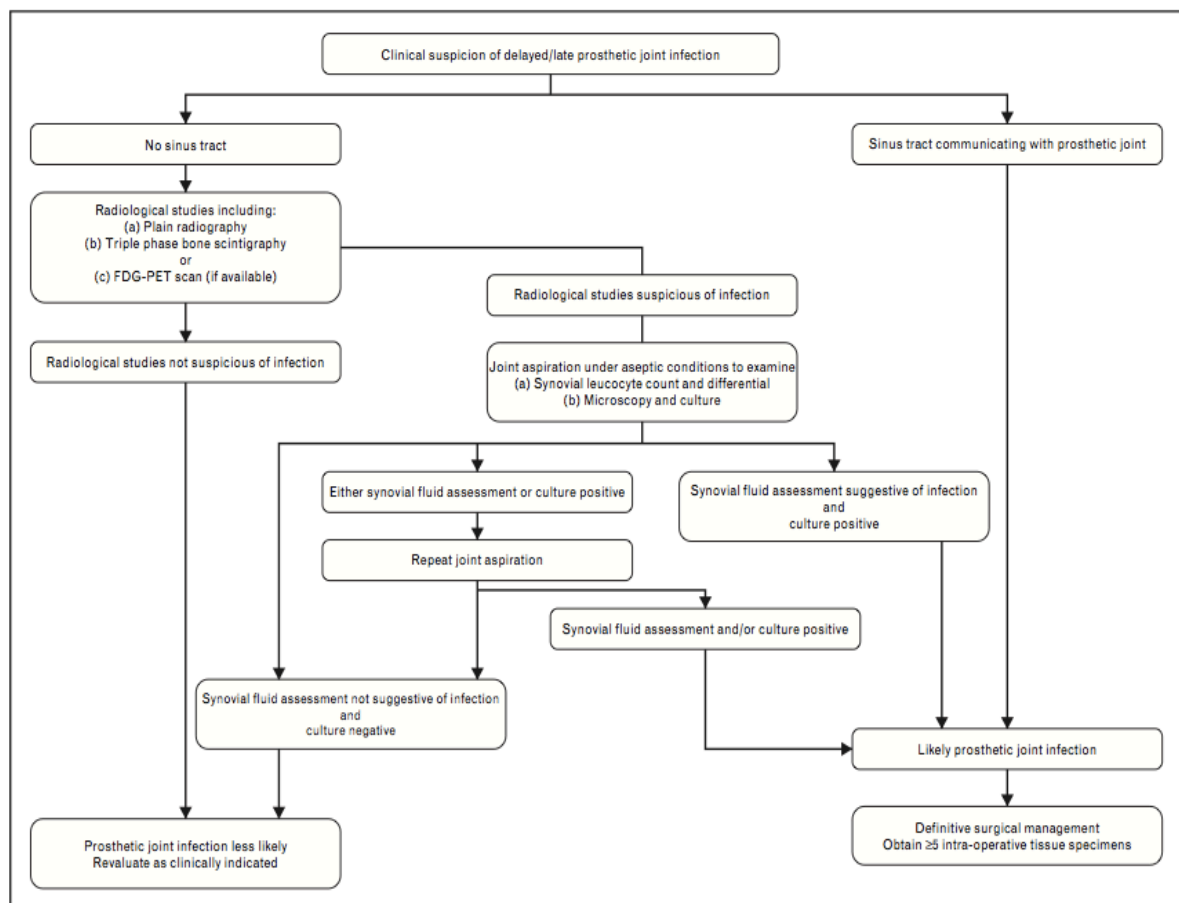


FIGURE 2. Diagnostic algorithm for delayed/late prosthetic joint infection [7,18,19*,20]. FDG, ¹⁸F-fluoro-deoxyglucose.

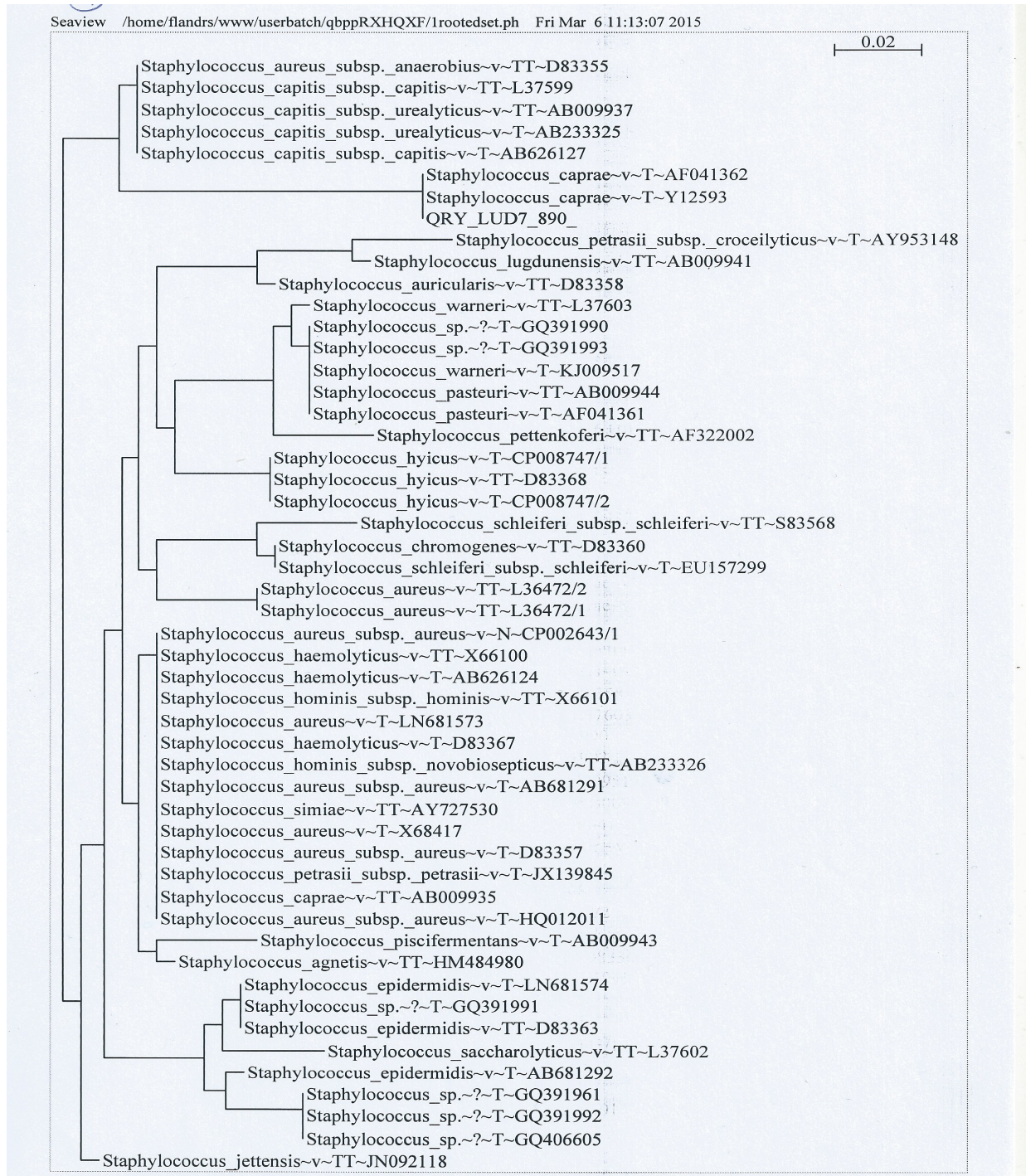
**Annexe 3: Protocole d'amplification par PCR et le séquençage du gène de l'ARN 16S
et exemple de dendrogramme:**

Extraction roche / extraction mutanolysine

Volumes (µL) pour un échantillon : Taq polymérase DFS (0,06), amorces 889 (0,3), amorces 890 (0,3), Tp 10X (1,5), dNTP (2mM)(1,5), eau distillée (9,34), ADN (2)

Volume total = 15 µL

La souche à analyser est appelée « QRY_LUD7_890 », elle se situe au même embranchement que *S. caprae*.



Annexe 4 : Composition du « bouillon biofilm » :

Acides aminés (Vitamin assay casamino acids, Difco®) 0,1 g/L

Extrait de levure (Difco®) 0,1 g/L

MgSO₄,2H₂O (Sigma® Aldrich) 0,2 g/L

FeSO₄,7H₂O (Sigma® Aldrich) 0,0005 g/L

Na₂HPO₄ anhydre (Sigma® Aldrich) 1,25 g/L

KH₂PO₄ (Sigma® Aldrich) 0,5 g/L

Lactose 0,025g/L

9 Bibliographie

1. Caton J, Papin P. Typologie et épidémiologie des prothèses totales de hanche en France. 2012.
2. www.ansm.santé.fr; Surveillance des dispositifs médicaux à risques: Prothèses totales de genou (PTG). 2015;
3. Oliveira A, Cunha M de LR. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes*. 2010 Oct 14;3:260.
4. www.ctcb.com/documentation.
5. Shuttleworth R, Behme RJ, McNabb A, Colby WD. Human isolates of *Staphylococcus caprae*: association with bone and joint infections. *J Clin Microbiol*. 1997;35(10):2537–41.
6. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/staph.html>.
7. <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/staphylocoque>.
8. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Lab*. 2008 Dec;2008(407):61–9.
9. Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale - Techniques usuelles. In. (Masson).
10. Chessa D, Ganau G, Spiga L, Bulla A, Mazzarello V, Campus GV, et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Virulence Strains as Causative Agents of Persistent Infections in Breast Implants. *PloS One*. 2016;11(1):e0146668.
11. Allignet J, Galdbart J-O, Morvan A, Dyke KG, Vaudaux P, Aubert S, et al. Tracking adhesion factors in *Staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material. *Microbiology*. 1999;145(8):2033–42.
12. Sampathkumar P, Osmon DR, Cockerill FR. Prosthetic joint infection due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Mayo Clin Proc*. 2000 May;75(5):511–2.
13. Shah NB, Osmon DR, Fadel H, Patel R, Kohner PC, Steckelberg JM, et al. Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1600–3.
14. Vandenesch F, Eykyn SJ, Bes M, Meugnier H, Fleurette J, Etienne J. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates isolated as human pathogens and from goat milk. *J Clin Microbiol*. 1995;33(4):888–92.
15. Cui B, Smooker PM, Rouch DA, Daley AJ, Deighton MA. Differences between two clinical *Staphylococcus capitis* subspecies as revealed by biofilm, antibiotic resistance, and pulsed-field gel electrophoresis profiling. *J Clin Microbiol*. 2013 Jan;51(1):9–14.
16. Tevell S, Hellmark B, Nilsson-Augustinsson Å, Söderquist B. *Staphylococcus*

- Capitis Isolated from Prosthetic Joint Infections. *Bone Jt J.* 2015 Dec 1;97-B(SUPP 15):64–64.
17. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318–22.
 18. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol.* 1993 Dec;75(6):499–511.
 19. von Eiff C, Heilmann C, Peters G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 1999 Dec;18(12):843–6.
 20. Busscher HJ, van der Mei HC. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog.* 2012 Jan;8(1):e1002440.
 21. Kodjikian L, Roques C, Campanac C, Doleans A, Baillif S, Pellon G, et al. Biofilms à *Staphylococcus epidermidis* à la surface des implants intraoculaires. *J Fr Ophtalmol.* 2005 Feb;28(2):224–30.
 22. Olson ME, Ruseska I, Costerton JW. Colonization of n-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive by *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomed Mater Res.* 1988 Jun;22(6):485–95.
 23. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye Lond Engl.* 1995;9 (Pt 1):102–9.
 24. Evans RP, Nelson CL, Bowen WR, Kleve MG, Hickmon SG. Visualization of bacterial glycocalyx with a scanning electron microscope. *Clin Orthop.* 1998 Feb;(347):243–9.
 25. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis.* 1990 Jul;162(1):96–102.
 26. Melter O, Radojevič B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. *Folia Microbiol (Praha).* 2010 Nov;55(6):548–58.
 27. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2010 Feb;300(2-3):193–204.
 28. Lecuire F, Gontier D, Carrere J, Giordano N, Rubini J, Basso M. [Ten-year surveillance of nosocomial surgical site infections in an orthopedic surgery department]. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot.* 2003 Oct;89(6):479–86.
 29. SPILF - Société de pathologie infectieuse de langue Française. Recommandations de pratique clinique, infections ostéoarticulaires.
 30. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Apr;27(2):302–45.
 31. HAS - Haute autorité de santé. Recommandation de bonne pratique. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation. 2014.

32. Chastanet. Infections ostéo-articulaires sur matériel d'ostéosynthèse et sur prothèse. L'imagerie médicale: sa place et ses contraintes. Service de radiologie ostéo-articulaire, CHU Lille;
33. Gomez E, Patel R. Laboratory diagnosis of prosthetic joint infection, Part I. Clin Microbiol Newsl. 2011;33(8):55–60.
34. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, Spangehl M, Erwin PJ, Murad MH, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. J Bone Joint Surg Am. 2010 Sep 1;92(11):2102–9.
35. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. J Bone Joint Surg Br. 2007 Jan;89(1):94–9.
36. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med. 2004 Oct 14;351(16):1645–54.
37. REMIC Référentiel en microbiologie Médicale, 5ème édition 2015.
38. Cuñé J, Soriano A, Martínez JC, García S, Mensa J. A superficial swab culture is useful for microbiologic diagnosis in acute prosthetic joint infections. Clin Orthop. 2009 Feb;467(2):531–5.
39. Hughes JG, Vetter EA, Patel R, Schleck CD, Harmsen S, Turgeant LT, et al. Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. J Clin Microbiol. 2001 Dec;39(12):4468–71.
40. Roberts P, Walters AJ, McMinn DJ. Diagnosing infection in hip replacements. The use of fine-needle aspiration and radiometric culture. J Bone Joint Surg Br. 1992 Mar;74(2):265–9.
41. Font-Vizcarra L, García S, Martínez-Pastor JC, Sierra JM, Soriano A. Blood Culture Flasks for Culturing Synovial Fluid in Prosthetic Joint Infections. Clin Orthop Relat Res. 2010 Aug;468(8):2238–43.
42. Sadiq S, Wootton JR, Morris CA, Northmore-Ball MD. Application of core biopsy in revision arthroplasty for deep infection. J Arthroplasty. 2005 Feb;20(2):196–201.
43. Javad Parvizi BZ. New Definition for Periprosthetic Joint Infection: From the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. Clin Orthop. 2011;469(11):2992–4.
44. Desplaces N. Diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires : les pièges à éviter. Feuilles de Biologie. 2014 Nov;(321).
45. Lass R, Giurea A, Kubista B, Hirschl AM, Graninger W, Presterl E, et al. Bacterial adherence to different components of total hip prosthesis in patients with prosthetic joint infection. Int Orthop. 2014 Aug;38(8):1597–602.
46. Holinka J, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological

- diagnostics improve pathogen detection. *J Orthop Res.* 2011 Apr;29(4):617–22.
47. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007 Aug 16;357(7):654–63.
48. Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-Sotelo J, Osmon DR, et al. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1878–84.
49. Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, Yombi J-C, Lecouvet F, Lefèvre P, et al. Amplification-Based DNA Analysis in the Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Mol Diagn JMD.* 2008 Nov;10(6):537–43.
50. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wüst J, Trampuz A. Improved Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection by Multiplex PCR of Sonication Fluid from Removed Implants. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1208–14.
51. Portillo ME, Salvadó M, Sorli L, Alier A, Martínez S, Trampuz A, et al. Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure. *J Infect.* 2012 Dec;65(6):541–8.
52. Lourtet-Hascoëtt J, Bicart-See A, Félicé MP, Giordano G, Bonnet E. Is Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR a reliable tool for fast detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Sep 1;83(1):59–62.
53. Titécat M, Senneville E, Wallet F, Dezèque H, Migaud H, Courcol R-J, et al. Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013 Oct;99(6):653–8.
54. Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PFM. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May;56(5):2386–91.
55. Tan TY, Ng SY, He J. Microbiological Characteristics, Presumptive Identification, and Antibiotic Susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol.* 2008 Jul 1;46(7):2393–5.
56. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul;26(3):547–603.
57. Carbonnelle E, Beretti J-L, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, et al. Rapid Identification of Staphylococci Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2007 Jul 1;45(7):2156–61.
58. Harris LG, El-Bouri K, Johnston S, Rees E, Frommelt L, Siemssen N, et al. Rapid

identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Int J Artif Organs*. 2010 Sep;33(9):568–74.

59. Arciola CR, Campoccia D, An YH, Baldassarri L, Pirini V, Donati ME, et al. Prevalence and antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing orthopedic implants. *Int J Artif Organs*. 2006 Apr;29(4):395–401.

60. Vandenesch F, Storrs MJ, Poitevin-Later F, Etienne J, Courvalin P, Fleurette J. Delta-like haemolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1991 Feb;62(1):65–8.

61. Vandenesch F, Projan SJ, Kreiswirth B, Etienne J, Novick RP. Agr-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1993 Jul 15;111(1):115–22.

62. van der Mee-Marquet N, Achard A, Mereghetti L, Danton A, Minier M, Quentin R. *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr;41(4):1404–9.

63. Masson E. Infections à *Staphylocoque lugdunensis* sur prothèses articulaires [Internet]. EM-Consulte. [cited 2016 Jan 24]. Available from: <http://www.em-consulte.com/article/131865/alertePM>

64. Kanda K, Suzuki E, Hiramatsu K, Oguri T, Miura H, Ezaki T, et al. Identification of a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus caprae* from a human clinical specimen. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jan;35(1):174–6.

65. Darrieutort et al. Arthrites septiques à *Staphylococcus caprae*. *Médecine Mal Infect*. 2013;43:131–5.

66. Seng P, Barbe M, Pinelli PO, Gouriet F, Drancourt M, Minebois A, et al. *Staphylococcus caprae* bone and joint infections: a re-emerging infection? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Dec;20(12):O1052–8.

67. Sivadon V, Rottman M, Chaverot S, Quincampoix J-C, Avettand V, de Mazancourt P, et al. Use of Genotypic Identification by *sodA* Sequencing in a Prospective Study To Examine the Distribution of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species among Strains Recovered during Septic Orthopedic Surgery and Evaluate Their Significance. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun 1;43(6):2952–4.

68. Trülzsch K, Rinder H, Trcek J, Bader L, Wilhelm U, Heesemann J. “*Staphylococcus pettenkoferi*,” a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Jul;43(3):175–82.

69. Morfin-Otero R, Martínez-Vázquez MA, López D, Rodríguez-Noriega E, Garza-González E. Isolation of rare coagulase-negative isolates in immunocompromised patients: *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus pettenkoferi* and *Staphylococcus pasteurii*. *Ann Clin Lab Sci*. 2012;42(2):182–5.

70. Park S, Chung H-S, Lee M. Clinical and Microbiological Characteristics of Six

Staphylococcus pettenkoferi Isolates From Blood Samples. *Ann Lab Med*. 2015;35(2):250.

71. Loïez C, Wallet F, Pischedda P, Renaux E, Senneville E, Mehdi N, et al. First case of osteomyelitis caused by “*Staphylococcus pettenkoferi*.” *J Clin Microbiol*. 2007 Mar;45(3):1069–71.
72. Chesneau O, Morvan A, Grimont F, Labischinski H, Solh N et al. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int J Syst Bacteriol*. 1993 Apr;43(2):237–44.
73. Savini V, Catavittello C, Carlino D, Bianco A, Pompilio A, Balbinot A, et al. *Staphylococcus pasteurii* bacteraemia in a patient with leukaemia. *J Clin Pathol*. 2009 Oct 1;62(10):957–8.
74. Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus lugdunensis* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Mar;51(3):888–95.
75. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond Engl*. 2001 Jul 14;358(9276):135–8.
76. Tunney MM, Ramage G, Patrick S, Nixon JR, Murphy PG, Gorman SP. Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Orthopedic Implants following Revision Hip Surgery. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Nov;42(11):3002–5.
77. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Apr 1;33(4):374–8.
78. Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezèque H, Beltrand E, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2011 Aug;53(4):334–40.
79. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA*. 1998 May 20;279(19):1537–41.
80. Ruhe JJ, Monson T, Bradsher RW, Menon A. Use of Long-Acting Tetracyclines for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: Case Series and Review of the Literature. *Clin Infect Dis*. 2005 May 15;40(10):1429–34.
81. Darouiche RO, Raad II, Heard SO, Thornby JI, Wenker OC, Gabrielli A, et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. Catheter Study Group. *N Engl J Med*. 1999 Jan 7;340(1):1–8.
82. Raad I, Darouiche R, Hachem R, Mansouri M, Bodey GP. The broad-spectrum activity and efficacy of catheters coated with minocycline and rifampin. *J Infect Dis*. 1996 Feb;173(2):418–24.

83. Wu W-S, Chen C-C, Chuang Y-C, Su B-A, Chiu Y-H, Hsu H-J, et al. Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. 2013 Apr;46(2):89–95.
84. Chopra S, Harjai K, Chhibber S. Antibiotic susceptibility of ica-positive and ica-negative MRSA in different phases of biofilm growth. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2014 [cited 2015 Sep 1]; Available from: <http://www.nature.com/ja/journal/vaop/ncurrent/full/ja201496a.html>
85. Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrena E, Cordero-Ampuero J, et al. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jun;41(6):521–3.
86. Donlan RM. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1387–92.
87. Goode C, Allen DG. Effect of calcium on moving-bed biofilm reactor biofilms. *Water Environ Res Res Publ Water Environ Fed*. 2011 Mar;83(3):220–32.
88. d'Ersu J, Aubin GG, Mercier P, Nicollet P, Bémer P, Corvec S. Characterization of *Staphylococcus caprae* Clinical Isolates Involved in Human Bone and Joint Infections, Compared with Goat Mastitis Isolates. *J Clin Microbiol*. 2016 Jan 1;54(1):106–13.
89. Allignet J, Aubert S, Dyke KGH, Solh N El. *Staphylococcus caprae* Strains Carry Determinants Known To Be Involved in Pathogenicity: a Gene Encoding an Autolysin-Binding Fibronectin and the ica Operon Involved in Biofilm Formation. *Infect Immun*. 2001 Feb 1;69(2):712–8.

***S. capitis*, *S. caprae* et *S. lugdunensis* : rôle dans les infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques**

Présentée et soutenue publiquement par : BERGON Ludovic

Directeur de thèse : GRARE Marion, MCU-PH Bactériologie

CHU Toulouse Purpan, Bâtiment Pierre Paul Riquet, vendredi 15 avril 2016

RÉSUMÉ

Les staphylocoques représentent une part importante des bactéries isolées lors d'infections ostéo-articulaires (IOA). Cependant, les données de la littérature détaillent rarement l'épidémiologie des différents staphylocoques à coagulase négative (SCN). Nous nous sommes intéressés aux IOA à *S. lugdunensis*, *S. caprae* et *S. capitis* dans les services de Traumatologie et d'Orthopédie du CHU de Toulouse durant les années 2013 et 2014. Toutes les souches ont été ré-identifiées par spectromètre de masse MALDI-TOF avec une concordance de 96% vis-à-vis des méthodes biochimiques d'identification. Un de ces 3 SCN a été isolé dans des prélèvements ostéo-articulaires pour 68 patients et ces germes ont été considérés responsables d'IOA pour 35 patients. *S. capitis* représentait l'espèce la plus résistante aux antibiotiques. La majorité des IOA survenait chez des patients avec présence de matériel prothétique. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un effet anti-biofilm de la minocycline vis à vis de souches de *S. capitis* et *S. caprae*.

***S. capitis*, *S. caprae* and *S. lugdunensis* : role in bone and joint infections and effect of the biofilm on antibiotic susceptibility**

Staphylococci represent an important part of bacteria isolated from bone and joint infections (BJIs). However, few data in the literature described the epidemiology of the different coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated in BJIs. We focused our study on *S. lugdunensis*, *S. caprae* and *S. capitis* implicated in BJIs in Traumatology and Orthopaedics Department of the Toulouse University Hospital, during the 2013-2014 period. All strains were re-identified by MALDI-TOF mass spectrometry with 96% concordant identification compared to biochemical methods. One of these 3 CoNS was isolated from BJIs samples in 68 patients and these bacteria were considered responsible for BJI in 35 patients. *S. capitis* was the species who presented most frequently antibiotics resistance. Most of BJI occurred in patients with prosthetic implant. Furthermore, we have demonstrated anti-biofilm effect of minocycline for 4 *S. capitis* and *S. caprae* strains.

MOTS-CLES : Infections ostéo-articulaires, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, biofilm, minocycline, spectromètre de masse MALDI-TOF

Discipline administrative : Diplôme d'études spécialisées de BIOLOGIE MÉDICALE

Laboratoire : Bactériologie-Hygiène CHU de Toulouse Purpan,

Institut Fédératif de Biologie (IFB) 330 Avenue de Grande Bretagne 31059 Toulouse