

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER
FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 2014

Thèse n° 2014-TOU3-1701

THÈSE

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE**

Présentée et soutenue publiquement à Toulouse par

Anne VERGNE

Le 4 Avril 2014

PLACE DES *HELCOCOCCUS* EN CLINIQUE HUMAINE

Revue sur une série de 42 patients du CH de Cahors,

CHU de Toulouse et CHU de Caen :

**Données cliniques, méthode d'identification
et sensibilité aux antibiotiques**

DIRECTEUR DE THÈSE : Monsieur le Docteur Alain LE COUSTUMIER

JURY

PRÉSIDENTE : Madame le Professeur Nicole MARTY

ASSESEURS : Monsieur le Professeur Vincent CATTOIR

Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN

Monsieur le Professeur Patrice MASSIP

MEMBRE INVITÉ : Monsieur le Docteur Alain LE COUSTUMIER

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Nicole MARTY,

Vous avez bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Soyez assurée de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Alain LE COUSTUMIER,

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Votre savoir, votre compétence et votre rigueur sont pour moi une source d'admiration et de respect. Travailler avec vous a été une expérience des plus enrichissantes. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Vincent CATTOIR,

Je suis ravie d'avoir eu l'opportunité de collaborer avec vous. Je tiens à vous remercier pour votre implication au cours de ce travail, ainsi que pour votre relecture et vos suggestions. Je suis très honorée de votre participation à ce jury et particulièrement de votre venue à Toulouse.

A Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN,

Vous avez accepté d'emblée de participer à ce jury. Je vous en suis extrêmement reconnaissante.

A Monsieur le Professeur Patrice MASSIP,

Vous avez accepté avec enthousiasme de participer à ce jury. C'est pour moi un honneur de vous compter parmi mes juges et ainsi de pouvoir bénéficier des compétences d'un infectiologue de renom.

Au Professeur Claire Poyart, au Docteur Caroline Joubrel et à toute l'équipe technique du CNR-Strep, pour m'avoir si aimablement accueillie au sein de leur service.

Au Docteur François Guérin et Michel Auzou du laboratoire associé au CNR Résistance aux Antibiotiques du CHU de Caen pour leur très grande collaboration à ce travail.

*Au Professeur Jean-Philippe Lavigne pour avoir accepté avec enthousiasme de tester nos souches d'*Helcococcus* sur son modèle d'étude de virulence.*

Au Docteur Damien Dubois pour l'envoi des souches de Toulouse et pour avoir ressorti les dossiers des patients correspondants.

A toute l'équipe du laboratoire du CH de Cahors, biologistes et techniciens, pour votre accueil chaleureux, votre disponibilité tout au long de mon stage et pour tout ce que vous m'avez appris. Un Merci à Claire pour sa relecture.

TABLE DES MATIÈRES

- LISTE DES ABRÉVIATIONS..... 1**
- INTRODUCTION..... 3**
- PARTIE I : GÉNÉRALITÉS 4**
- 1. HISTORIQUE 5
- 2. TAXONOMIE ET PHYLOGÉNÉTIQUE 6
- 3. CARACTÈRES PHÉNOTYPIQUES 9
 - 3.1. *Helcococcus kunzii* 9
 - 3.1.1. Morphologie en microscopie optique 9
 - 3.1.2. Culture..... 9
 - 3.1.3. Caractères biochimiques 10
 - 3.2. *Helcococcus ovis* 11
 - 3.2.1. Morphologie en microscopie optique 11
 - 3.2.2. Culture..... 11
 - 3.2.3. Caractères biochimiques 11
 - 3.3. *Helcococcus sueciensis*..... 11
 - 3.3.1. Morphologie en microscopie optique 11
 - 3.3.2. Culture..... 12
 - 3.3.3. Caractères biochimiques 12
 - 3.4. *Helcococcus pyogenica* 12
 - 3.4.1. Morphologie en microscopie optique 12
 - 3.4.2. Culture..... 12
 - 3.4.3. Caractères biochimiques 12
 - 3.5. *Helcococcus seattlensis*..... 13
 - 3.5.1. Morphologie en microscopie optique 13
 - 3.5.2. Culture..... 13
 - 3.5.3. Caractères biochimiques 13
- 4. CAPACITÉS DES SYSTÈMES COMMERCIAUX DE ROUTINE À IDENTIFIER LES *HELCOCOCCUS*..... 16
 - 4.1. Galeries manuelles 16
 - 4.2. Galeries automatisées 19

| | | |
|--------|--|----|
| 4.3. | Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF | 19 |
| 5. | HELCOCOCCUS DANS LA LITTÉRATURE | 20 |
| 5.1. | Réservoir de germes et écologie microbienne | 20 |
| 5.2. | Revue des cas publiés d' <i>Helcococcus kunzii</i> | 21 |
| 5.3. | Revue des cas publiés d' <i>Helcococcus ovis</i> | 25 |
| 5.4. | <i>Helcococcus sueciensis</i> | 26 |
| 5.5. | <i>Helcococcus pyogenica</i> | 26 |
| 5.6. | <i>Helcococcus seattlensis</i> | 26 |
| 6. | SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES PUBLIÉES | 27 |
| 6.1. | <i>Helcococcus kunzii</i> | 27 |
| 6.2. | <i>Helcococcus ovis</i> | 30 |
| 6.3. | <i>Helcococcus sueciensis</i> | 31 |
| 6.4. | <i>Helcococcus pyogenica</i> | 31 |
| 6.5. | <i>Helcococcus seattlensis</i> | 32 |
| | PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES | 33 |
| 1. | SOUCHES UTILISÉES | 34 |
| 2. | DONNÉES CLINIQUES | 36 |
| 3. | IDENTIFICATION..... | 37 |
| 3.1. | Automate Vitek 2 (bioMérieux) | 38 |
| 3.2. | Spectrométrie de masse | 38 |
| 3.3. | Identification moléculaire | 41 |
| 4. | ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES | 44 |
| 4.1. | Détermination des CMI | 44 |
| 4.2. | Recherche de gènes de résistance..... | 45 |
| 4.2.1. | Résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines | 45 |
| 4.2.2. | Résistance aux tétracyclines | 47 |
| 5. | ÉTUDE <i>IN VIVO</i> DU POTENTIEL DE VIRULENCE SUR <i>CAENORHABDITIS</i> <i>ELEGANS</i> | 49 |
| | PARTIE III : RÉSULTATS | 50 |
| 1. | ORIGINE DES PRÉLÈVEMENTS..... | 51 |
| 1.1. | Sites d'isolement..... | 56 |
| 1.2. | Modalités et types de prélèvements..... | 56 |
| 1.3. | Types de plaies..... | 57 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 1.4. | Incidence dans les plaies diabétiques..... | 58 |
| 1.5. | Abondance des colonies..... | 58 |
| 2. | DONNÉES DÉMOGRAPHIQUES..... | 59 |
| 3. | COMORBIDITÉS..... | 60 |
| 4. | IDENTIFICATION D' <i>H. KUNZII</i> | 62 |
| 4.1. | Identification phénotypique..... | 62 |
| 4.1.1. | Aspect des colonies et coloration de Gram..... | 62 |
| 4.1.2. | Identification par l'automate Vitek 2 (bioMérieux)..... | 66 |
| 4.1.3. | Identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF..... | 68 |
| 4.2. | Identification moléculaire..... | 68 |
| 5. | MANIFESTATIONS CLINIQUES..... | 68 |
| 6. | MARQUEURS BIOLOGIQUES D'INFLAMMATION..... | 74 |
| 7. | ORGANISMES CONCOMITANTS..... | 75 |
| 8. | SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES..... | 78 |
| 8.1. | CMI obtenues..... | 78 |
| 8.2. | Gènes de résistance aux MLS et aux tétracyclines..... | 81 |
| 9. | PRISE EN CHARGE ET ÉVOLUTION DES PATIENTS..... | 83 |
| 9.1. | Antibiothérapie prescrite..... | 86 |
| 9.2. | Évolution..... | 86 |
| 10. | MODÈLE D'ÉTUDE DE VIRULENCE : <i>C. ELEGANS</i> | 87 |
| | PARTIE IV : DISCUSSION | 88 |
| 1. | ÉCOLOGIE D' <i>HELCOCOCCUS KUNZII</i> | 89 |
| 2. | CARACTÈRES D'IDENTIFICATION..... | 93 |
| 3. | POUVOIR PATHOGÈNE..... | 95 |
| 4. | SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES ET GÈNES DE RÉSISTANCE..... | 99 |
| | CONCLUSION | 103 |
| | BIBLIOGRAPHIE | 105 |
| | ANNEXE : tableaux récapitulatifs données clinico-biologiques..... | 112 |
| | LISTE DES TABLEAUX | 115 |
| | LISTE DES FIGURES | 117 |
| | ABSTRACT | 119 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **ANC** : Gélose Columbia à l'acide nalidixique et à la colistine additionnée de 5 % de sang de mouton
- **AOMI** : Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs
- **ARNr 16S** : ARN ribosomique 16S
- **BHI** : *Brain-Heart Infusion* (bouillon cœur-cervelle)
- **BMR** : Bactérie Multi-Résistante
- **CAP**: Gélose Columbia à la colistine et à l'aztréonam additionnée de 5 % de sang de mouton
- **CH** : Centre Hospitalier
- **CHU** : Centre Hospitalier Universitaire
- **CLED** : Gélose *cystine-lactose-electrolyte-deficient*
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **CNR** : Centre National de Référence
- **erm** : *Erythromycin ribosome methylase*
- **EUCAST** : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- **COS** : Gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton
- **HTA** : Hypertension artérielle
- **IDSA** : *Infectious Diseases Society of America*
- **IWGDF** : *International Working Group on the Diabetic Foot*
- **LAP** : Leucine Aminopeptidase
- **MALDI-TOF** : *Matrix-Associated Laser Desorption / Ionisation, Time Of Flight*
- **MLS** : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines
- **PCR** : *Polymerase Chain Reaction*
- **SCN**: Staphylocoque à coagulase négative
- **PYR** : Pyrrolidonylarylamidase
- **Sod** : Superoxyde dismutase
- **Spilf** : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
- **UFC** : Unités Formant des Colonies
- **UHCD** : Unité d'Hospitalisation de Courte Durée

- **UGADE** : Unité de Gériatrie Aiguë Diabétologie Endocrinologie
- **UMIT** : Unité de Maladies Infectieuses et Tropicales

INTRODUCTION

Le genre *Helcococcus* a été décrit pour la première fois en 1993 par Collins et coll. à partir d'une espèce unique, *Helcococcus kunzii* (1). Ce cocci à Gram positif, catalase négative et anaérobie facultatif partage beaucoup de caractères phénotypiques avec *Aerococcus viridans*. Jusqu'en 2010, *H. kunzii* n'était décrit (rarement) que chez l'Homme, isolé la plupart du temps à partir de plaies localisées « sous le genou » et associé à d'autres bactéries. Récemment, il a également été isolé en clinique vétérinaire au niveau de prélèvements génito-urinaires. Il est resté longtemps méconnu et sa prévalence est certainement très largement sous-estimée, car il donne des colonies de petites tailles au sein de cultures mixtes contenant des germes à croissance rapide. De plus, son identification précise à l'aide des tests biochimiques commerciaux a longtemps été difficile. Ainsi, son rôle pathogène propre est actuellement difficile à préciser.

Quatre nouvelles espèces ont été décrites depuis : *Helcococcus ovis* en 1999 (2), *Helcococcus sueciensis* (3) et *Helcococcus pyogenica* (4) en 2004, puis dernièrement en 2013, *Helcococcus seattlensis* (5).

Dans ce travail, nous faisons l'état des données actuelles sur les souches d'*Helcococcus* isolées en pathologie humaine à travers une revue complète de la littérature et nous réalisons une étude rétrospective portant sur 46 isolats cliniques d'*H. kunzii* (27 souches du CH de Cahors, 11 souches du CHU de Toulouse et 8 souches du CHU de Caen). Nous avons bénéficié du support du CNR Résistance aux Antibiotiques du CHU de Caen (Pr. Vincent Cattoir) et du CNR des Streptocoques (Pr. Claire Poyart). Cette série est la plus importante sur le sujet. Le but est :

- de comparer les différentes méthodes d'identification,
- de déterminer la sensibilité aux principaux antibiotiques et de rechercher les gènes de résistance à certains antibiotiques,
- d'évaluer la signification clinique et le potentiel de virulence.

PARTIE I
GÉNÉRALITÉS

1. HISTORIQUE

En 1993, Collins et coll. (1) ont publié les résultats d'une étude portant sur neuf souches de cocci à Gram positif, catalase négative, anaérobies facultatifs, présentant des ressemblances phénotypiques avec *Aerococcus viridans*. Ces bactéries étaient isolées chez l'Homme au niveau de plaies des membres inférieurs (7/9 souches) ou d'abcès du sein (2/9 souches). L'étude de la séquence des gènes *rrs* codant pour l'ARNr 16S a montré qu'il s'agissait d'un groupe distinct au sein de la famille des *Streptococcaceae*. Les auteurs ont proposé la création d'un nouveau genre et d'une nouvelle espèce, *Helcococcus kunzii*.

En 1999, le séquençage des gènes *rrs* a permis à Collins et coll. (2) de placer dans le genre *Helcococcus* deux souches bactériennes isolées chez le mouton. Ces souches étaient phylogénétiquement apparentées à *H. kunzii* mais elles s'en distinguaient par leurs caractères phénotypiques, ce qui a conduit à décrire une nouvelle espèce au sein du genre, *Helcococcus ovis*.

En 2004, de nouveau le séquençage du gène encodant l'ARNr 16S a permis à Collins et coll. (3) l'individualisation d'une nouvelle espèce, *Helcococcus sueciensis*. La taxonomie de cette troisième espèce a été validée à partir d'une unique souche isolée au niveau d'une plaie chez une patiente suédoise.

Egalement en 2004, Panackal et coll. (4) ont décrit une quatrième espèce retrouvée en culture pure sur deux prélèvements distincts au niveau d'une prothèse de genou infectée chez une patiente caucasienne, « *Helcococcus pyogenica* ». Mais en 2013, cette espèce n'a pas encore été acceptée au sein de la taxonomie internationale du genre *Helcococcus* (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

Dernièrement en 2013, Chow et coll. (5) ont décrit une cinquième espèce, *Helcococcus seattlensis*, à partir d'une unique souche isolée dans une hémoculture chez un patient présentant un urosepsis. (4)

2. TAXONOMIE ET PHYLOGÉNÉTIQUE

Comme c'est le cas pour de nombreux taxons récemment décrits au sein de la famille des *Streptococcaceae*, la définition du genre *Helcococcus* et de ses quatre espèces repose avant tout sur l'étude de la proximité des séquences des gènes *rrs* codant pour l'ARNr 16S (Figure 1) et le profil électrophorétique des protéines cellulaires (Figure 2).

La souche type de :

- *H. kunzii* est la souche DSM 10548 déposée par Collins en 1993,
- *H. ovis* est la souche DSM 21504 déposée par Collins en 1999,
- *H. sueciensis* est la souche DSM 17243 déposée par Collins en 2004.

http://www.dsmz.de/?id=329&tx_mnogosearch_pi1%5Bq%5D=helcococcus

Figure 1 : Dendrogramme montrant les relations entre les *Helcococcus* et les espèces proches. Cet arbre a été construit à partir de l'alignement des séquences des gènes *rrs* (ARNr 16S) (1327 nucléotides). (3)

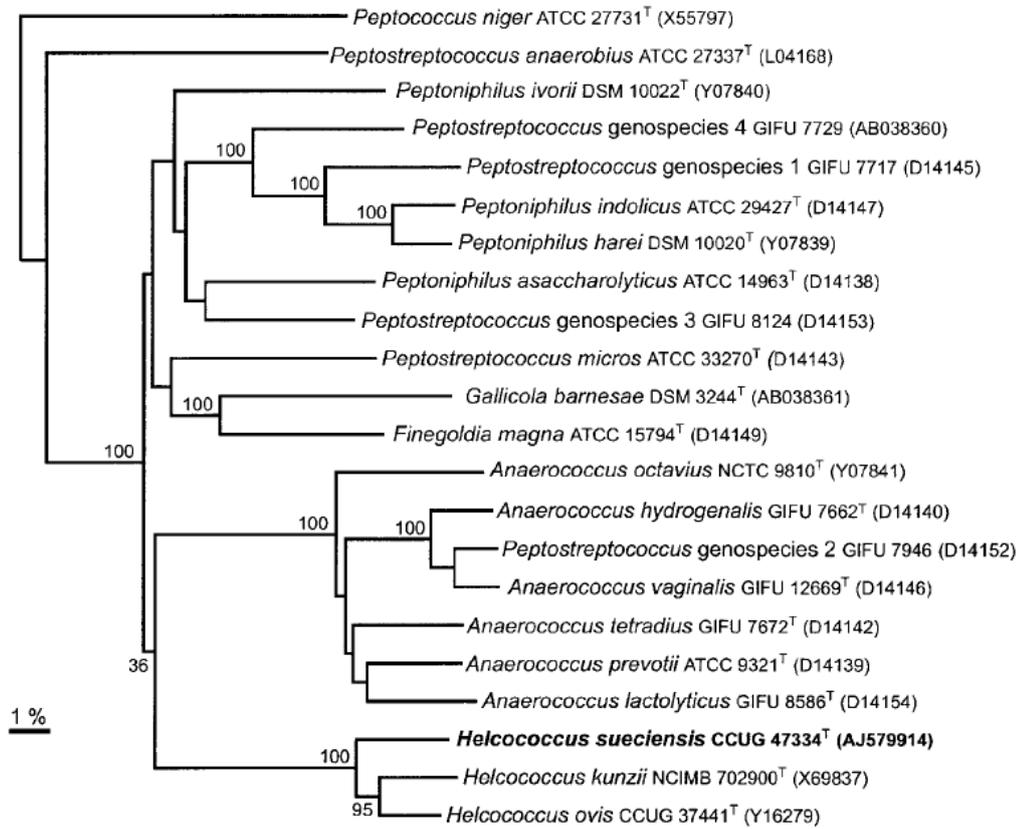
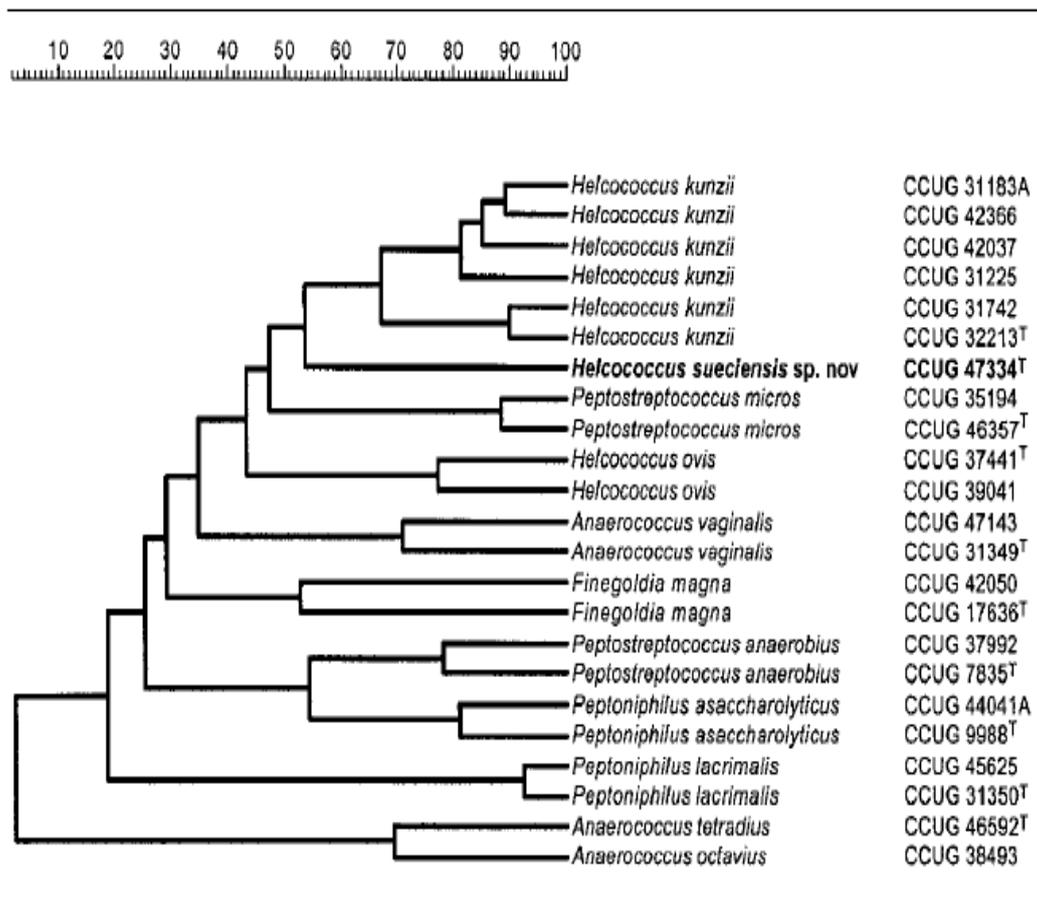


Figure 2 : Dendrogramme construit à partir de la comparaison des profils électrophorétiques des protéines cellulaires de *H. sueciensis*, *H. kunzii*, *H. ovis* et de micro-organismes apparentés. (3)



3. CARACTÈRES PHÉNOTYPIQUES

3.1. *Helcococcus kunzii*

3.1.1. Morphologie en microscopie optique

À la coloration de Gram, les *H. kunzii* sont des cocci à Gram positif, pléomorphes, se décolorant facilement, certains étant très gros, se présentant de manière isolée, en diplocoques, ou en amas irréguliers du fait de leurs divisions successives selon deux plans perpendiculaires (voir photo page 65). Ils sont immobiles et non sporulés.

3.1.2. Culture

Il s'agit de bactéries anaérobies facultatives. Incapables de synthétiser de la porphyrine, leur croissance nécessite donc de l'hème (1,6).

Elles poussent bien sur des bases diverses de gélose au sang de cheval ou de mouton : Brucella, Trypticase soja, Columbia, Schaedler, chocolat (6–12).

Dans notre expérience, elles poussent également bien sur des milieux au sang rendus sélectifs par des mélanges d'antibiotiques généralement utilisés pour les streptocoques (ex : ANC, CAP).

Elles poussent très mal voire pas du tout sur gélose ou en bouillon BHI (1).

Les colonies sont grisâtres de la taille d'une tête d'épingle, non hémolytiques (sur gélose au sang de cheval et de mouton) après 24 heures d'incubation à 37°C. Après 48 heures d'incubation, les colonies deviennent légèrement alpha-hémolytiques (sur sang de cheval et de mouton). Il n'a pas été observé de différence de pousse lors d'incubation sous atmosphère aérobie, anaérobie ou sous 5 % de CO₂. (1,6,7,10) (voir photo page 65)

Dans sa première publication, Collins (1) remarquait que les souches étaient lipophiles : stimulation de la croissance sur milieu BHI supplémenté en Tween 80 (0,1 %) ou en sérum de cheval (1 %). Chagla et coll. en 1998 (6) constataient aussi

la nature lipophile d'*H. kunzii*. En 2003, Riegel et Lepargneur (9) n'ont pas retrouvé ce caractère sur une souche isolée dans un abcès post-chirurgical du pied.

D'après Haas et coll., les colonies d'*H. kunzii* sont masquées par les bactéries à croissance rapide (ex : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) sur gélose au sang (13). Ainsi, l'utilisation de milieux sélectifs (gélose BHI supplémentée en Tween 80, colistine et novobiocine) faciliterait l'isolement de ce germe sur des prélèvements de plaies contenant une flore mixte (8,13).

Par ailleurs, les souches d'*H. kunzii* décrites par Sridhar (14) et Chow (5) présentaient un satellitisme autour de la souche de *S. aureus* ATCC 25923. À noter que pour une souche incluse dans cette étude, un satellitisme autour d'une souche de staphylocoque à coagulase négative a également été observé (Figure 15 ; page : 65)

3.1.3. Caractères biochimiques

Les *Helcococcus* font partie des rares cocci à Gram positif, en amas et catalase négative (avec *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Gemella*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*). (15,16)

H. kunzii est phénotypiquement proche d'*A. viridans*. Il s'en distingue par une alpha-hémolyse plus discrète qui apparaît au-delà de 24 heures d'incubation, une croissance équivalente quelle que soit l'atmosphère d'incubation (*A. viridans* pousse mieux sous 5 % CO₂), une croissance variable sur milieu contenant 6,5 % de NaCl, sa nature lipophile et l'absence d'hydrolyse de l'hippurate (1,9).

Il se différencie également des autres cocci à Gram positif en amas catalase négative par l'absence de production de leucine aminopeptidase (LAP). (1,6,11) (Tableau 1 et Tableau 2, page 14)

3.2. Helcococcus ovis

3.2.1. Morphologie en microscopie optique

Il s'agit de cocci à Gram positif (taille non précisée), légèrement ovoïdes se présentant de manière isolée, en diplocoques ou en courtes chainettes (différence avec *H. kunzii*). (2)

3.2.2. Culture

Il est anaérobie facultatif et pousse sur des bases diverses de gélose au sang de mouton ou de cheval (Trypticase soja, Columbia) en aérobiose, sous 5 % de CO₂ ou en anaérobiose (2,17,18).

Après 24 heures d'incubation, les colonies sont de la taille d'une tête d'épingle et non hémolytiques, une légère alpha-hémolyse apparaît après 72 heures d'incubation (17).

Un satellitisme autour de *S. aureus* et une dépendance au pyridoxal sont observés pour la majorité des souches (19). D'où la nécessité d'être coincubé avec *S. aureus* ou cultivé en milieu supplémenté en pyridoxal pour une croissance adéquate (ex : gélose Columbia additionnée de 10 % de sang de mouton et de 0,002 % de chlorhydrate de pyridoxal). Cependant, après plusieurs subcultures, les souches perdent ces caractères. (2,17,19,20)

3.2.3. Caractères biochimiques

Les caractères d'*H. ovis* sont mentionnés dans le Tableau 2, page 15.

3.3. Helcococcus sueciensis

3.3.1. Morphologie en microscopie optique

Il s'agit d'un cocci à Gram positif (taille non précisée) se présentant de manière isolée, en diplocoques ou en courtes chainettes. Il est immobile et non sporulé. (3)

3.3.2. Culture

Il est anaérobie facultatif. A la différence de *H. kunzii*, il pousse mieux sous atmosphère anaérobie.

Il donne des colonies grises de la taille d'une tête d'épingle et non hémolytiques après 48 heures d'incubation sur gélose Columbia enrichie avec 5 % de sang de cheval. (3)

3.3.3. Caractères biochimiques

Les caractères d'*H. sueciensis* sont mentionnés dans le Tableau 2, page 15.

3.4. Helcococcus pyogenica

3.4.1. Morphologie en microscopie optique

Il s'agit de cocci à Gram positif qui se décolorent facilement (les auteurs ne donnent pas plus de précisions). (4)

3.4.2. Culture

Il est anaérobie facultatif, et comme *H. sueciensis*, il pousse mieux en anaérobiose qu'en aérobiose. Les colonies sont grisâtres de la taille d'une tête d'épingle en 2 à 4 jours et non hémolytiques.

H. pyogenica présente des ressemblances phénotypiques avec *Pediococcus*. Ils sont tous les deux PYR négative, LAP positive, n'hydrolysent pas l'esculine et présentent une résistance de bas niveau à la vancomycine (CMI vancomycine de *H. pyogenica* : 8 µg/mL). (4)

3.4.3. Caractères biochimiques

Les caractères d'*H. pyogenica* sont mentionnés dans le Tableau 2, page 15.

3.5. Helcococcus seattlensis

3.5.1. Morphologie en microscopie optique

D'aspect comparable à *H. kunzii*, il s'agit de cocci à Gram positif, de taille variable et se présentant de manière isolée ou en amas irréguliers. Ils sont immobiles et non sporulés. (5)

3.5.2. Culture

Il pousse mieux sur gélose chocolat que sur gélose Columbia au sang. Par contre, il pousse de façon similaire quelle que soit l'atmosphère d'incubation.

Les colonies sont grisâtres, de la taille d'une tête d'épingle et non hémolytiques après 48 heures d'incubation à 35°C.

Un satellitisme autour de *S. aureus* (souche ATCC 25923) a été observé sur gélose au sang de mouton (colonies plus grosses à proximité de *S. aureus*) et de façon encore plus nette sur gélose Mueller-Hinton (pousse seulement à proximité de *S. aureus*). (5)

3.5.3. Caractères biochimiques

Les caractères d'*H. seattlensis* sont mentionnés dans le Tableau 2, page 15.

Tableau 1 : Caractères phénotypiques utilisés pour différencier entre eux les cocci à Gram positif, catalase négative. (15,16,21)

| | Hémolyse | Vanco | Gaz | PYR | LAP | 6,5 % NaCl | 10°C | 45°C | Mobilité |
|----------------------|------------------------|-------|-----|-----|-----|------------|------|------|----------|
| <i>H. kunzii</i> | n(24h)/α(48h) | S | - | + | - | V | - | - | - |
| <i>A. viridans</i> | α | S | - | + | - | + | - | - | - |
| <i>A. urinae</i> | α | S | - | - | + | + | - | V | - |
| <i>A. sanguicola</i> | α | S | - | + | + | + | nd | nd | - |
| Tétrades, amas | <i>Gemella</i> | α/n | S | - | + | V | - | - | - |
| | <i>Alloiococcus</i> | n | S | - | + | + | - | - | - |
| | <i>Pediococcus</i> | α | R | - | - | + | V | + | - |
| | <i>Tetragenococcus</i> | α | S | - | - | + | + | + | - |
| | <i>Streptococcus</i> | α/β/n | S | - | - | + | V | - | V |
| | <i>Enterococcus</i> | α/n | S/R | - | + | + | + | + | V |
| | <i>Lactococcus</i> | α/n | S | - | + | + | V | + | V |
| Chaînes | <i>Vagococcus</i> | α/n | S | - | + | + | + | + | - |
| | <i>Leuconostoc</i> | α/n | R | + | - | - | V | + | + |
| | <i>Globicatella</i> | α | S | - | + | - | + | - | - |
| | <i>Abiotrophia</i> | α/n | S | - | + | + | - | - | V |

Vanco : sensibilité à la vancomycine ; Gaz : production de gaz à partir du glucose ; PYR : pyrrolidonylarylamidase ; LAP : leucine aminopeptidase ; NaCl : croissance dans un bouillon contenant 6,5 % de NaCl ; 10°C et 45°C : croissance à 10°C ou 45°C ; V : réaction variable (11 à 89% de positifs) ; nd : non déterminé ; S : sensible ; R : résistant ;

Tableau 2 : Caractères phénotypiques des 5 espèces d'*Helcococcus* (1–5)

| | <i>H. kunzii</i> (homme) | <i>H. ovis</i> (animal) | <i>H. sueciensis</i> (homme) | <i>H. pyogenica</i> (homme) | <i>H. seattlensis</i> (homme) |
|--|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| α-hémolyse | - (24h)/+(48h) | - (24h)/+(72h) | - | - | - |
| Catalase | - | - | - | - | - |
| Oxydase | - | - | - | - | - |
| PYR | + | - | - | - | - |
| LAP | - | + | + | + | - |
| Croissance avec 6,5 % de NaCl (7j) | V | nd | nd | - | nd |
| Croissance à 10°C | - | nd | nd | nd | nd |
| Croissance à 45°C | - | nd | nd | nd | nd |
| Production de gaz à partir du glucose | - | - | nd | nd | nd |
| Acidification du lactose | + | - | + | nd | - |
| Acidification du tréhalose | + | - | + | nd | - |
| Phosphatase alcaline | - | V | + | nd | nd |
| β-glucosidase (=hydrolyse de l'esculine) | + | - | - | - | nd |
| β-glucuronidase | - | + | - | nd | + |
| N-Acétyle-β-glucosaminidase | + | - | + | nd | nd |
| Voges-Prauskauer (=production d'acétoïne) | - | - | - | nd | nd |
| Nitrate reductase | - | - | - | nd | nd |
| Hydrolyse de l'hippurate | - | - | - | nd | nd |
| Sensibilité vancomycine | S | S | nd | R | S |
| Satellitisme <i>S. aureus</i> / dépendance au pyridoxal | V | + | V | nd | + |

PYR : pyrrolidonylarylamidase ; LAP : leucine aminopeptidase ; V : caractère variable ; nd : non documenté

4. CAPACITÉS DES SYSTÈMES COMMERCIAUX DE ROUTINE À IDENTIFIER LES *HELCOCOCCUS*

L'aspect des colonies en culture, la coloration de Gram ainsi que la catalase permettent une première orientation diagnostique. En microbiologie de routine, l'identification précise peut s'effectuer ensuite avec des galeries d'identification ou à l'heure actuelle avec des systèmes de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Les galeries miniaturisées reposent sur des tests enzymatiques et des tests d'acidification ou d'utilisation des sucres. L'identification des streptocoques et genres apparentés peut se faire à l'aide de différents systèmes commerciaux.

4.1. Galeries manuelles

Ce sont par exemple les galeries API 20 Strep et Rapid ID 32 Strep (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) rendant un résultat en 4 à 24 heures.

Ces galeries, n'ayant *pas H. kunzii* dans leurs bases de données, ne sont pas capables d'identifier ce germe :

- Sur une galerie API 20 Strep (Tableau 3), le profil numérique obtenu habituellement est 4100413, ce qui correspond à un profil douteux d'*A. viridans*. (1,6,7,11–13)
- De même, la galerie Rapid ID 32 Strep v.2.0 (Tableau 4) rend *A. viridans* avec un profil inacceptable, code : 60014141050. (9)

Tableau 3 : Caractères obtenus avec une API 20 Strep (bioMérieux) pour *H. kunzii* et *H. ovis* (1,6,7,11–13,17)

| | <i>H. kunzii</i> (code : 4100413) | <i>H. ovis</i> (code : 0440000) |
|------|--------------------------------------|------------------------------------|
| VP | - | - |
| HIP | - | - |
| ESC | + | - |
| PYRA | + | - |
| αGAL | - | - |
| βGUR | - | + |
| βGAL | - | - |
| PAL | - | - |
| LAP | - | + |
| ADH | - | - |
| RIB | - | - |
| ARA | - | - |
| MAN | - | - |
| SOR | - | - |
| LAC | + | - |
| TRE | + | - |
| INU | - | - |
| RAF | - | - |
| AMD | + | - |
| GLYG | + | - |

VP : Voges-Proskauer (=production d'acétoïne); HIP : hydrolyse de l'hippurate; ESC : hydrolyse de l'esculine (=β-glucosidase); PYRA : pyrrolidonyl arylamidase; αGAL : α-galactosidase; βGUR : β-glucuronidase; βGAL : β-galactosidase; PAL : phosphatase alcaline; LAP : leucine amino-peptidase; ADH : arginine dihydrolase; RIB : acidification du ribose; ARA : acidification de l'arabinose; MAN : acidification du mannitol; SOR : acidification du sorbitol; LAC : acidification du lactose; TRE : acidification du tréhalose; INU : acidification de l'inuline; RAF : acidification du raffinose; AMD : acidification de l'amidon; GLYG : acidification du glycogène.

Tableau 4 : Caractères obtenus avec une galerie Rapid ID 32 Strep (bioMérieux) pour *H. kunzii*, *H. ovis* et *H. sueciensis* (3,9,19)

| | <i>H. kunzii</i> (code : 60014141050) | <i>H. ovis</i> | <i>H. sueciensis</i> (code : 44034201000) |
|------|--|----------------|--|
| ADH | - | - | - |
| βGLU | + | - | - |
| βGAR | + | + | + |
| βGUR | - | V | - |
| αGAL | - | - | - |
| PAL | - | V | + |
| RIB | - | - | - |
| MAN | - | - | - |
| SOR | - | - | - |
| LAC | + | V | + |
| TRE | - | V | + |
| RAF | - | - | - |
| SAC | - | - | - |
| LARA | - | - | - |
| DARL | - | - | - |
| CDEX | - | + | - |
| VP | - | - | - |
| APPA | - | - | - |
| βGAL | + | - | + |
| PyrA | + | - | - |
| βNAG | - | - | + |
| GTA | - | - | - |
| HIP | - | - | - |
| GLYG | - | - | - |
| PUL | + | V | - |
| MAL | + | + | + |
| MEL | - | - | - |
| MLZ | - | - | - |
| MBDG | + | - | - |
| TAG | - | - | - |
| βMAN | + | - | - |
| URE | - | - | - |

ADH : arginine dihydrolase ; βGLU : β-glucosidase, βGAR : β-galactosidase avec résorufine-βD-galactopyranoside comme réactif; βGUR : β-glucuronidase ; αGAL : α-galactosidase ; PAL : phosphatase alcaline ; RIB : acidification du ribose ; MAN : acidification du mannitol ; SOR : acidification du sorbitol ; LAC : acidification du lactose ; TRE : acidification du tréhalose ; RAF : acidification du raffinose ; SAC : acidification du saccharose ; LARA : acidification du L-arabinose ; DARL : acidification du D-arabitol ; CDEX : acidification de la cyclodextrine ; VP : Voges-Proskauer (production d'acétoïne) ; APPA : alanyl-phenylalanyl-proline arylamidase ; βGAL : β-galactosidase avec 2-naphtyl-βD-galactopyranoside comme réactif, PyrA : acide pyroglutamique arylamidase ; βNAG : N-acétyl-β-glucosaminidase ; GTA : glycyl-tryptophane-arylamidase ; HIP : hydrolyse de l'hippurate ; GLYG : acidification du glycogène ; PUL : acidification du pullulane ; MAL : acidification du maltose ; MEL : acidification du mélibiose ; MBDG : acidification du méthyl-βD-glucopyranoside ; TAG : acidification du tagatose ; βMAN : β-mannosidase ; URE : uréase.

4.2. Galeries automatisées

Ce sont par exemple les cartes des automates Vitek 2 (bioMérieux) et Phoenix (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France).

- Le système Vitek 2 avec une carte fluorométrique ne parvenait pas à identifier *H. kunzii* (22). Par contre, avec une carte colorimétrique, cet automate identifie correctement ce germe (10,22,23). La souche d'*H. kunzii* étudiée par Lemaître en 2008 avait été identifiée avec 99 % de probabilité sur la carte ID GP (version : non précisée). Elle était notamment positive pour les caractères suivants : leucine arylamidase, alanine arylamidase, pyrrolidonyl arylamidase, β -galactosidase, D-mannose et β -galactopyranosidase (10).
- Les systèmes BD Phoenix et BBL Crystal (Becton Dickinson) identifieraient également de façon adéquate ce germe d'après McNicholas (24) et Moore (25).

4.3. Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Dans la littérature, seule une souche d'*H. kunzii* a été analysée en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF avec le système Vitek MS (bioMérieux) (version non donnée). Elle a été correctement identifiée au niveau de l'espèce (degré de confiance : 99,9 %). (14)

Aucune des souches publiées n'a été analysée avec le système Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics).

5. HELCOCOCCUS DANS LA LITTÉRATURE

5.1. Réservoir de germes et écologie microbienne

En 1997, Haas et coll. (13) ont publié une importante étude portant sur la colonisation de la peau par *H. kunzii*.

Ils ont prélevé à l'aide d'un écouvillon les membres supérieurs (mains ou avant-bras) et les pieds (espaces inter-orteils et/ou plantes du pied) d'un groupe de 120 patients avec des « problèmes podologiques » (sic) (60 diabétiques et 60 non diabétiques) et d'un groupe témoin (50 volontaires sains sans problème podologique).

L'échantillon recueilli était ensemencé sur un milieu sélectif (gélose BHI enrichie de Tween 80, novobiocine et colistine) inhibant la pousse de *Pseudomonas aeruginosa*, de *S. aureus* et de la majorité des entérobactéries et staphylocoques à coagulase négative.

Lors de cette étude, les auteurs ont co-inoculé chacune des 13 souches d'*H. kunzii* isolées (10^4 UFC) avec 10^6 UFC de *S. aureus* et 10^6 UFC d'*E. coli* sur une gélose au sang. Seules les colonies de *S. aureus* et d'*E. coli* étaient observables dans 12 de ces 13 expérimentations. Ils en ont déduit que la recherche d'*H. kunzii* à partir de prélèvements polymicrobiens sur un milieu non sélectif manquait de sensibilité et de fiabilité.

Concernant les écouvillonnages cutanés, les auteurs ont obtenu les résultats suivants :

- Dans le groupe de 120 patients avec des problèmes podologiques, *H. kunzii* a été isolé chez 12 patients (10 %) et, fait remarquable, uniquement sur l'écouvillon prélevé au niveau du pied, jamais sur le prélèvement du membre supérieur.
 - $\frac{1}{3}$ étaient issus du groupe non-diabétique (4 isolats)
 - $\frac{2}{3}$ étaient issus du groupe diabétique (8 isolats).
- Dans le groupe de 50 volontaires sains, seul un individu (2 %) était porteur (retrouvé au niveau de la main et du pied).

En 2010, dans une étude longitudinale portant sur la colonisation des ulcères veineux chez 176 patients prélevés chaque semaine pendant 12 semaines, Moore et coll. (25) ont isolé *H. kunzii* dans 20 % des prélèvements initiaux et dans 22 % des prélèvements réalisés sur toute la durée de leur étude. Il s'agissait du quatrième germe le plus fréquemment retrouvé après *S. aureus* (56 % des prélèvements initiaux), *Corynebacterium striatum* (53 %) et *P. aeruginosa* (34 %).

Les ulcères étaient prélevés par écouvillonnage, puis ensemencés sur divers milieux de culture (gélose au sang, gélose CLED, gélose Sabouraud, gélose sélective pour *P. aeruginosa*, gélose pour les anaérobies fastidieux avec et sans néomycine). Les souches d'*H. kunzii* ont été identifiées avec le kit BBL Crystal (Becton Dickinson).

Ce taux remarquable n'a été retrouvé dans aucune autre étude portant sur la flore bactérienne des ulcères veineux.

5.2. Revue des cas publiés d'*Helcococcus kunzii*

Depuis sa découverte il y a 20 ans, 22 cas humains ont été décrits dans la littérature. (Tableau 5 et Tableau 6)

En 1995, Caliendo et coll (8) ont rapporté une série de dix cas. Le plus souvent *H. kunzii* était retrouvé chez des patients diabétiques et/ou hypertendus (terrain vasculaire) au niveau de plaies des extrémités inférieures. Dans aucun cas, il n'a été isolé en culture pure et de ce fait il était difficile de lui attribuer un rôle pathogène évident.

Par la suite, *H. kunzii* a été rapporté responsable d'infections diverses, de l'infection cutanée superficielle à l'infection invasive mettant en jeu le pronostic vital :

- Infections de kystes sébacés de l'épaule (1997) (7) et du sein (1998) (6)
- Abscesses nécrotiques du pied deux mois après une chirurgie pour fracture du cinquième métatarsien chez une jeune femme sans comorbidité (2003) (9)
- Choc septique chez un toxicomane intra-veineux avec un ulcère suppuré et les marques des sites d'injection sur une cuisse (2005) (11)

- Empyème thoracique chez un toxicomane intra-veineux alcoolo-tabagique (2005) (11)
- Phlegmon plantaire chez un patient artéritique (2008) (10)
- Infection d'une prothèse de genou chez un patient sans comorbidité (2011) (12)
- Infection d'un dispositif cardiaque implantable (2011) (24)
- Nécrose extensive avec érosion de l'artère tibiale antérieure et hémorragie cataclysmique chez un patient avec un ulcère de la jambe traité par pression négative. (2013) (26)
- Abscess cérébral chez un patient diabétique avec un cholestéatome. (2013) (14)
- Infection de plaies d'origine traumatique (orteil et cuisse). (2013) (5)

En 2010, Grattarola et coll. (23) ont publié le premier cas non humain d'*H. kunzii*. Il a été isolé, en culture pure, à partir des urines d'une truie atteinte d'une cystite purulente.

En 2013, Locatelli et coll. (27) dans une étude portant sur les micro-organismes retrouvés durant les métrites puerpérales chez les bovins, ont isolé *Helcococcus* chez 6/112 vaches (*H. kunzii* : 5 cas ; *H. ovis* : 1 cas). *H. kunzii* était isolé en culture pure dans un seul cas.

Tableau 5 : Revue des cas humains d'*Helcococcus kunzii* dans la littérature (cas 1 à 10)

| Cas | Référence | Age(années) /Sexe | Terrain | Site | Autres bactéries isolées | Présentation clinique | Antibiothérapie | Devenir | Identification | Milieu de culture |
|-----|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|---|----------------------------------|-----------------|------------|----------------|-----------------------------------|
| 1 | | 96/F | Hypertension | Membre inférieur G | SCN | Brèche cutanée avec cellulite | Pénicilline | Guéri | | |
| 2 | | 57/F | Diabète | Sein D | Flore anaérobie mixte | Abcès sein | Céphalosporine | Guéri | | |
| 3 | | 87/F | Diabète | Membre inférieur D | <i>S. aureus</i> , entérocoques | Ulcères avec cellulite | Céphalosporine | Guéri | | |
| 4 | | 67/F | Diabète, hypertension | Gros orteil D | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , flore anaérobie mixte | Ampoule purulente avec cellulite | nd | Guéri | | |
| 5 | Caliendo, 1995 (8) | 59/M | Diabète, hypertension | Membre inférieur D | <i>S. aureus</i> , <i>Providencia rettgeri</i> | Ulcère avec cellulite | nd | Guéri | ARNr16S | gélose Brucella au sang de cheval |
| 6 | | 59/M | Coronaropathie | Membre inférieur D | SCN | Ulcère avec cellulite | Ciprofloxacine | Guéri | | |
| 7 | | 18/M | Aucun | Gros orteil D | <i>S. aureus</i> | Chondrosarcome | nd | Amputation | | |
| 8 | | 35/M | Aucun | Tibia G | <i>S. aureus</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i> | Ostéomyélite chronique | nd | Inconnu | | |
| 9 | | 48/M | Ethylisme | Membre inférieur G | <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> | Ulcère chronique | nd | Inconnu | | |
| 10 | | 69/F | Hypertension | Visage | <i>S. aureus</i> | Kyste sébacé infecté | nd | Guéri | | |

F : féminin ; M : masculin ; D : droit ; G : gauche ; nd : non documenté ; SCN : staphylocoque à coagulase négative ; **En gras : isolats hors membres inférieurs**

Tableau 6 : Revue des cas humains d'*Helcococcus kunzii* dans la littérature (cas 11 à 20)

| Cas | Référence | Age(années) /Sexe | Terrain | Site | Autres bactéries isolées | Présentation clinique | Antibiothérapie | Devenir | Identification | Gélose |
|-----|------------------------|-------------------|--|---|---|---|--|---------|----------------|--|
| 11 | Peel, 1997 (7) | 36/M | Hypertension, obésité, hypercholestérolémie | Epaule D | Aucune | Kyste sébacé infecté avec cellulite | Flucloxacilline 15j | Guéri | ARNr16S | Sang de cheval et chocolat |
| 12 | Chagla, 1998 (6) | 57/F | Aucun | Sein G | Aucune | Kyste sébacé infecté | Céphalexine 5j | Guéri | ARNr16S | Trypticase Soja au sang de mouton et chocolat |
| 13 | Riegel, 2003 (9) | 36/F | Aucun | 5 ^{ème} orteil D (2 prélèvements + à 1 semaine d'intervalle) Aucune sur 2 nd prélèvement | <i>Staphylococcus simulans</i> (<10 colonies sur 1er prélèvement) | Nécrose purulente autour cicatrice (chirurgie sur fracture du 5 ^e métatarsien 2 mois avant) | Pristinamycine, rifampicine | Guéri | ARNr16S | Gélose au sang |
| 14 | Woo, 2005(11) | 41/M | Toxicoman IV | Hémocultures (2 séries +) | Aucune | Choc septique | Cloxacilline, pénicilline G 3 semaines | Guéri | ARNr16S | Sang de mouton |
| 15 | | 55/M | Toxicoman IV, éthylisme | Liquide pleural | Aucune | Empyème thoracique | Amoxicilline-ac.clavulanique 8 semaines | Guéri | ARNr16S | Sang de mouton |
| 16 | Lemaître, 2008 (10) | 79/M | Hypertension, AOMI, Amputation 3 ^o orteil D 4 mois avant | 2 prélèvements profonds per-opérateurs | <i>K. oxycota</i> , <i>B. fragilis</i> | Phlegmon plantaire | nd | nd | ARNr16S | Columbia au sang de cheval |
| 17 | Perez-Jorge, 2011 (12) | 39/M | Aucun | Genou D (prélèvements per-opérateurs) | Aucune | Infection prothèse totale de genou | Clindamycine, rifampicine | Guéri | ARNr16S | Trypticase soja au sang de mouton, chocolat, Schaedler au sang de mouton |
| 18 | McNicholas, 2011 (24) | 75/M | nd | Dispositif cardiaque implantable (biopsie tissu) | Aucune | Infection dispositif cardiaque implantable avec cellulite | Amoxicilline, rifampicine 4 semaines | Guéri | ARNr16S | nd |
| 19 | Stanger, 2013 (26) | 86/M | Ulcère chronique jambe G (ostéomyélite chronique tibia et carcinome épidermoïde) | Ulcère jambe G | Flore anaérobie mixte, flore commensale cutanée | Ulcère infecté avec nécrose extensive et hémorragie cataclysmique suite à perforation artère tibiale antérieure | Céfuroxime, métronidazole | Guéri | nd | nd |
| 20 | Sridhar, 2013 (14) | 83/M | Diabète, cholestéatome, Hypertension | Abcès cérébral | Aucun | Convulsion fébrile | Ceftriaxone, métronidazole, Vancomycine 12 semaines Amikacine instillation locale | Guéri | ARNr16S | Sang de cheval avec strie <i>S. aureus</i> |
| 21 | Chow, 2013 (5) | 25/M | Plaie post-traumatique | Orteil | <i>S. aureus</i> | Abcès d'un orteil | Cotrimoxazole, céfalexine | nd | ARNr16S | Columbia au sang |
| 22 | | 68/M | Coronaropathie | Cuisse | <i>S. aureus</i> | Infection plaie de la cuisse | Vancomycine, céfalexine | nd | ARNr16S | Columbia au sang |

F : féminin ; M : masculin ; D : droit ; G : gauche ; nd : non documenté ; AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs ; **En gras : isolats hors membres inférieurs**

5.3. Revue des cas publiés d'*Helcococcus ovis*

En 2013, aucune souche n'a été isolée chez l'Homme. On retrouve cette espèce chez une grande variété d'herbivores (moutons, chèvres, chevaux, bovins). Il est le plus souvent retrouvé sur des prélèvements d'organes au cours de nécropsie, et semble être responsable de broncho-pneumopathies purulentes et d'endocardites valvulaires. (2,17,18,20,28)

Tableau 7 : Revue des cas d'*Helcococcus ovis* dans la littérature

| Cas | Référence | Hôte | Site | Autres bactéries isolées | Diagnostic |
|-----|-----------------------|--------|---|---------------------------------|---|
| 1 | Collins, 1999 (2) | Mouton | Poumon, foie, rate (prélèvements <i>post-mortem</i>) | <i>Arcanobacterium pyogenes</i> | nd |
| 2 | | Brebis | Lait | <i>Staphylococcus sp.</i> | Mammite |
| 3 | Post, 2003 (28) | Veau | Végétation valvulaire cardiaque, foie, poumon (prélèvement <i>post-mortem</i>) | <i>E. coli</i> | Endocardite, nécrose hépato-cellulaire, broncho pneumopathie avec hémorragies intra-alvéolaires, hémorragies digestives |
| 4 | Rothschild, 2004 (17) | Cheval | Abcès pulmonaire, lavage trans-trachéal | Aucune | Abcès pulmonaire (plaie pénétrante 9 ^{ème} espace inter-costal quelques mois avant) |
| 5 | Zhang, 2009 (20) | Agneau | Poumon (prélèvement <i>post mortem</i>) | Aucune | Pleurésie, broncho-pneumopathie |
| 6 | Garcia, 2012 (18) | Chèvre | Poumon (prélèvement <i>post mortem</i>) | <i>Staphylococcus sp.</i> | Bronchopneumopathie purulente, multiples abcès pulmonaires |
| 7 | Locatelli, 2013 (27) | Vache | Utérus | <i>E. coli</i> | Métrite puerpérale |

nd : non documenté

D'après une étude portant sur la prévalence d'*H. ovis* dans les endocardites valvulaires chez 55 bovins, il serait le 2^{ème} germe le plus souvent impliqué, après *Arcanobacterium pyogenes*. En effet, *H. ovis* était isolé dans 18/55 (soit un tiers) des échantillons prélevés au cours de nécropsie, dont 16 souches en cultures pures et abondantes. Les échantillons étaient ensemencés sur une gélose Columbia au sang de mouton sur laquelle était faite une strie de *S. aureus*. Chaque souche a été confirmée par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. (19)

5.4. Helcoccoccus sueciensis

En 2004, Collins et coll. (3) ont décrit sur la base des analyses phénotypiques et moléculaires, une nouvelle espèce au sein du genre *Helcoccoccus* : *H. sueciensis*. Cette bactérie, isolée au niveau d'une plaie chez une patiente suédoise de 83 ans, a été adressée à l'Université de Göteborg (Suède) pour identification. Aucune autre donnée clinique n'a été communiquée.

En 2013, Chow et coll. (5) ont isolé deux autres souches d'*H. sueciensis* :

- dans une hémoculture chez un patient avec un cancer du colon et une cardiopathie ischémique,
- au niveau d'une plaie axillaire tumorale (carcinome épidermoïde).

5.5. Helcoccoccus pyogenica

En 2004, Panackal et coll. (4) ont publié un cas d'infection de prothèse de genou, chez une femme de 73 ans, due à un micro-organisme jusqu'alors inconnu et génétiquement proche du genre *Helcoccoccus*, qu'ils ont nommé « *Helcoccoccus pyogenica* ». Il a été isolé en culture pure sur deux prélèvements intra-articulaires à un mois d'intervalle.

5.6. Helcoccoccus seattlensis

En 2013, Chow et coll. ont décrit une nouvelle espèce au sein du genre *Helcoccoccus*, sur la base du séquençage du gène *rrs*, *H. seattlensis*. Cette souche a été isolée dans une hémoculture chez un patient diabétique, hypertendu et insuffisant cardiaque, qui présentait un tableau d'urosepsis.

6. SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES PUBLIÉES

6.1. *Helcococcus kunzii*

L'ensemble des données recueillies sont synthétisées dans le Tableau 8 et le Tableau 9.

- **β-lactamines**

Toutes les souches étudiées dans la littérature étaient sensibles aux β-lactamines testées. (5–12,24)

- **Fluoroquinolones**

Seule la ciprofloxacine a été testée. Les dix souches étudiées par Caliendo (8) avaient des CMI comprises entre 2 et 4 µg/mL (CMI déterminées par E-test). La souche de Perez-Jorge (12) isolée au niveau d'une prothèse de genou était sensible (par diffusion) à cet antibiotique.

- **Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS)**

L'érythromycine a été testée sur 7 souches (5,6,9,11,12) : 6 étaient résistantes, dont 2 avec une CMI > 256 µg/mL. Les gènes de résistance aux MLS ont été recherchés pour l'une de ces 2 souches (11) : les auteurs signalaient que la souche étudiée portait un gène *erm* dont la séquence nucléotidique était à 100% identique à celle du gène *ermTR*, sous-classe du gène *erm(A)* décrit pour la première fois en 1998 chez *Streptococcus pyogenes* (29).

- **Aminosides**

Quatre souches (des 5 souches étudiées) étaient résistantes à la gentamicine. (5,9,10,12)

- **Rifampicine**

Les trois souches étudiées étaient sensibles. (9,12,24)

- **Glycopeptides**

La vancomycine a été testée sur 19 souches, toutes étaient sensibles. (5–12)

- **Tétracycline**

Les 3 souches étudiées étaient sensibles. (5,9)

- **Linézolide**

Une souche (des 3 souches étudiées) était de sensibilité intermédiaire au linézolide (CMI = 4 µg/mL). (5,12)

- **Cotrimoxazole**

Deux souches (des 3 souches étudiées) étaient résistantes au cotrimoxazole (CMI > 4/76 µg/mL). (5,12)

Tableau 8 : Sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Helcococcus kunzii* de la littérature. (CMI en µg/mL)

| Cas | Référence | Péni G | Ampi | Amox | Flucloxa | Céfaz | Céfotax | Cipro | Erythro | Clinda | Pristina | Genta | Rifam | Vanco | Tétra | Liné | Cotri |
|---------------------|-----------------|-------------|----------|----------|----------|-------|------------|---------------|------------|----------|----------|--------|-----------|------------|---------|-------|-----------|
| 1 à 10 ^a | Caliendo, 1995 | S (≤ 0,094) | | | | | | I / R (2 - 4) | | | | | | S (≤ 0,75) | | | |
| 11 ^b | Peel, 1997 | S (≤ 0,094) | | | S (0,5) | | | | | | | | | S (≤ 0,75) | | | |
| 12 ^c | Chagla, 1998 | S (0,25) | S (0,25) | | | | | | R (> 2) | S (0,12) | | | | S | | | |
| 13 ^d | Riegel, 2003 | S (0,064) | | S (0,25) | | | S (0,5) | | R | | S | R | S | S | S | | |
| 14 ^e | Woo, 2005 | S (0,064) | | | | | S (0,25) | | R (> 256*) | S (0,5) | | | | S (0,5) | | | |
| 15 ^e | | S (0,032) | | | | | S (0,032) | | S (0,25) | S (0,25) | | | | S (0,5) | | | |
| 16 ^f | Lemaître, 2008 | S | S | | | | | | | | | | S | S | | | |
| 17 ^g | Perez, 2011 | | S | | | S | | S | R | S | | R | S | S | | S | S |
| 18 ^h | McNicholas 2011 | S (0,008) | | | | | | | | | | | S (0,032) | | | | |
| 20 ⁱ | Sridhar, 2013 | S (0,003) | | | | | S (0,016) | | | | | R (32) | | S (0,25) | | | |
| 21 ^j | Chow, 2013 | S (0,25) | | | | | S (< 0,12) | | R (1) | S (0,5) | | R (16) | | S (< 0,5) | S (< 1) | I (4) | R (>4/76) |
| 22 ^j | | S (< 0,03) | | | | | S (< 0,12) | | R (> 256) | S (0,5) | | R (8) | | S (< 0,5) | S (< 1) | S (2) | R (>4/76) |

Péni G : pénicilline G ; Ampic : ampicilline ; Amox : amoxicilline ; Flucloxa : flucloxacilline ; Céfaz : céfazoline ; Céfotax : céfotaxime ; Ciprof : ciprofloxacine ; Erythro : érythromycine ; Clinda : clindamycine ; Pristi : pristinamycine ; Genta : gentamicine ; Rifam : rifampicine ; Vanco : vancomycine ; Tétra : tétracycline ; Liné : linézolide ; Cotri : cotrimoxazole.

^a : CMI déterminées par E-test sur Brucella agar+5% sang de cheval ; ^b : CMI déterminées par E-test sur Brucella agar+5% sang de cheval ; ^c : CMI déterminées par dilution en milieu gélosé Mueller-Hinton+5% sang de mouton ; ^d : CMI déterminées par E-test ; ^e : CMI déterminées par microdilution en milieu liquide ; ^f : Sensibilité déterminée par diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton+5% sang de mouton ; ^g : Sensibilité déterminée par diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton+5% sang de mouton ; ^h : Modalités de détermination des CMI non renseignées ; ⁱ : CMI déterminées par E-test sur milieu gélosé Mueller-Hinton au sang ; ^j : CMI déterminées par microdilution avec le panel streptocoques (STP6F) (TREK Diagnostic Systems).

* présence du gène *ermTR*

NB : la sensibilité aux antibiotiques de la souche de Stanger et coll (cas n°19) n'est pas mentionnée.

Tableau 9 : Sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Helcococcus kunzii* de la littérature (tableau de synthèse)

| | Nombre de souches testées | S | R |
|-----------------|---------------------------|----|-----|
| Pénicilline G | 20 | 20 | 0 |
| Ampicilline | 3 | 3 | 0 |
| Amoxicilline | 1 | 1 | 0 |
| Flucloxacilline | 1 | 1 | 0 |
| Céfazoline | 1 | 1 | 0 |
| Céfotaxime | 6 | 6 | 0 |
| Ciprofloxacine | 11 | 1 | 10* |
| Erythromycine | 7 | 1 | 6 |
| Clindamycine | 6 | 6 | 0 |
| Pristinamycine | 1 | 1 | 0 |
| Gentamicine | 6 | 1 | 5 |
| Rifampicine | 3 | 3 | 0 |
| Vancomycine | 20 | 20 | 0 |
| Tétracycline | 3 | 3 | 0 |
| Linézolide | 3 | 2 | 1 |
| Cotrimoxazole | 3 | 1 | 2 |

S : sensible ; R : résistant

*: CMI E-test : de 2 à 4 µg/mL selon les souches (Caliendo, 1995)

6.2. *Helcococcus ovis*

Bilk et coll. (30) ont étudié en 2010 la sensibilité aux antibiotiques et l'expression de gènes de résistance aux MLS [*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *mef(A/E)*] et tétracyclines [*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*] de 29 souches bovines d'*H. ovis*. Les CMI ont été déterminées par microdilution en milieu liquide en utilisant le bouillon Mueller-Hinton additionné de sang de cheval lysé (3 %) et de pyridoxal HCl (0,001 %).

Les CMI obtenues sont synthétisées dans le Tableau 10.

- Aucune souche n'était résistante aux β-lactamines.
- Trois souches (10 %) avaient une CMI à l'érythromycine ≥ 8 µg/mL, dont le mécanisme n'a pu être élucidé que chez une seule souche qui portait le gène *erm(B)*.

- 24 souches (83 %) avaient une CMI à la tétracycline $\geq 8 \mu\text{g/mL}$, 21 d'entre elles portaient le gène *tet(M)* seul et 2 souches portaient à la fois le gène *tet(M)* et *tet(L)*.

Cette étude montre que la résistance aux macrolides et aux tétracyclines est fréquente chez *H. ovis*. Ceci permet de rappeler que la moitié des antibiotiques utilisés en clinique vétérinaire sont des tétracyclines. Les macrolides et synergistines (dont la virginiamycine qui a été utilisé comme facteur de croissance) sont également très utilisés.

Tableau 10 : Distribution des CMI de 29 souches bovines d'*Helcococcus ovis* (30)

| Antimicrobial agent | MIC ^a ($\mu\text{g/ml}$), no. of isolates | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|------|------|------|------|-----|---|---|---|---|----|----|----|-----|
| | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 |
| Penicillin G | 3 | 4 | 0 | 9 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | – | – |
| Ampicillin | – | 0 | 2 | 5 | 11 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | – |
| Amoxicillin-clavulanic acid ^b | – | 0 | 1 | 6 | 15 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | – |
| Cephalothin | – | – | 3 | 8 | 14 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Erythromycin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 8 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | – | – |
| Clindamycin | – | 0 | 3 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | – |
| Tetracycline | – | – | – | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 17 | 2 | 0 |

^a Read \leq for the lowest concentration given; Read \geq for the highest concentration given.

^b Given MICs are referred to the amoxicillin-component.

6.3. *Helcococcus sueciensis*

Chow et coll. ont étudié la sensibilité des 2 souches qu'ils ont isolées (5). Elles étaient :

- sensibles aux β -lactamines, à la tétracycline et à la vancomycine
- résistantes à la gentamicine et au cotrimoxazole.
- une des 2 souches présentait une résistance de haut niveau à l'érythromycine et à la clindamycine (CMI > 256 $\mu\text{g/mL}$), l'autre était sensible à ces 2 molécules.

6.4. *Helcococcus pyogenica*

Fait remarquable dans le genre *Helcococcus* et chez la plupart des autres cocci à Gram positif, il est résistant à la vancomycine. Panackal et coll. (4) trouvaient

la CMI de la vancomycine à 8 µg/mL. Par contre, il était sensible aux pénicillines et aux fluoroquinolones.

6.5. Helcococcus seattlensis

Chow et coll. ont étudié la sensibilité aux antibiotiques de cette nouvelle espèce qu'ils ont décrite à partir d'une unique souche. (5)

Elle était sensible aux β-lactamines, à la gentamicine, à la vancomycine, aux macrolides et à la tétracycline. Elle était résistante aux fluoroquinolones et au cotrimoxazole.

PARTIE II
MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. SOUCHES UTILISÉES

Nous avons mené une étude rétrospective sur 46 souches cliniques d'*H. kunzii* isolées chez 42 patients :

- 27 souches isolées au laboratoire du CH de Cahors entre février 2008 et août 2013. Il s'agissait d'une série continue, comprenant entre autres :
 - deux souches isolées à quatre jours d'intervalle chez un même patient à partir d'un écouvillonnage d'un mal perforant plantaire et du liquide de drainage du trajet fistuleux.
 - trois souches isolées à quelques mois d'intervalle chez un même patient au niveau de son mal perforant plantaire.

- 11 souches isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Toulouse (Pr. Nicole Marty) entre avril 2009 et mars 2013, dont :
 - deux souches isolées chez un même patient au niveau d'un mal perforant plantaire à deux semaines d'intervalle

- 8 souches que nous a confiées le laboratoire associé au CNR Résistance aux Antibiotiques au CHU de Caen (Pr. Vincent Cattoir), avec qui nous avons collaboré. Parmi ces 8 souches, il y avait 3 souches isolées au CHU de Caen, 4 souches suisses (Dr. Reto Lienhard) et une souche du CH d'Alençon. Nous avons également travaillé sur la souche de référence DSM 10548 que nous a transmis le laboratoire associé au CNR Résistance aux Antibiotiques.

Le Tableau 11 reprend les souches utilisées dans notre étude et leur exploitation.

Tableau 11 : Listes des souches d'*Helcococcus kunzii* utilisées dans cette étude

| Origine | Données cliniques | Identification | | | Sensibilité aux antibiotiques | | Clonalité (CNR Antibio Caen) | Virulence sur <i>Caenorhabditis elegans</i> (CHU Nîmes) |
|-----------------------|-------------------|---------------------|---|--|--|---|------------------------------|---|
| | | Vitek 2 (CH Cahors) | MALDI-TOF Bruker Daltonics (CNR Antibio Caen) | ARNr 16S / <i>sodA</i> (CNR Strep et CNR Antibio Caen) | CMI par microdilution (CNR Antibio Caen) | Gènes de résistance aux MLS et tétracyclines (CNR Antibio Caen) | | |
| CH Cahors | X | X | X | X | X | X | X | X |
| CHU Toulouse | X | X | X | | X | X | | X |
| CH Caen ¹ | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Souche-type DSM 10548 | | X | X | | X | X | | |

¹: 3 souches isolées au CHU de Caen, 4 souches isolées en Suisse (Dr. Reto Lienhard) , une souche isolée au CH d'Alençon

2. DONNÉES CLINIQUES

Les renseignements démographiques et cliniques ont été colligés à partir de l'analyse rétrospective des dossiers : l'âge, le sexe, le service d'hospitalisation, le site d'isolement, le terrain sous-jacent, l'état podologique, la nature de la plaie, la présence de signes cliniques et biologiques d'infection, les autres micro-organismes isolés dans le prélèvement, le traitement entrepris et l'évolution.

Il faut signaler la difficulté de ce recueil : l'étude rétrospective et certains dossiers cliniques peu renseignés expliquent le manque d'exhaustivité de certaines données.

Nous avons classé les plaies en fonction de la sévérité de l'infection en utilisant les critères de la Conférence de Consensus International sur le Pied Diabétique. (31)

Tableau 12 : Classification de l'infection des plaies du pied selon le Consensus International sur le Pied Diabétique (31)

| | |
|----------------|---|
| Grade 1 | Pas de symptôme, ni de signe d'infection |
| Grade 2 | Atteinte cutanée uniquement (sans atteinte des tissus sous-cutanés, ni systémique) avec au moins deux des signes suivants : <ul style="list-style-type: none">- chaleur locale- érythème > 0,5-2 cm autour de l'ulcère- sensibilité locale ou douleur- tuméfaction locale ou induration- décharge purulente (sécrétion épaisse, opaque à blanchâtre ou sanguinolente) Les autres causes de réaction inflammatoire de la peau doivent être éliminées (par exemple : traumatisme, goutte, pied de Charcot aigu, fracture, thrombose, stase veineuse) |
| Grade 3 | <ul style="list-style-type: none">• Érythème > 2 cm et une des constatations décrites ci-dessus ou <ul style="list-style-type: none">• Infection atteignant les structures au-delà de la peau et du tissu sous-cutané, comme un abcès profond, une lymphangite, une ostéite, une arthrite septique ou une fasciite Il ne doit pas y avoir de réponse inflammatoire systémique (Cf. grade 4) |
| Grade 4 | Quelle que soit l'infection locale, si présence de signes systémiques manifestées par <u>au moins deux des caractéristiques suivantes</u> : <ul style="list-style-type: none">- température > 39 °C ou < 36 °C- fréquence cardiaque > 90 battements/min- fréquence respiratoire > 20 cycles/min- PaCO₂ < 32 mmHg- leucocytes > 12 000 ou < 4 000 /mm³- 10 % de formes leucocytaires immatures |

Le grade 1 correspond à une plaie colonisée. Il s'agit d'un phénomène physiologique lié à la présence de micro-organismes réplicatifs et peu virulents dans la plaie, provenant de la flore cutanée commensale ou d'une flore transitoire (endogène ou de l'environnement). Il n'y a pas de réponse inflammatoire de l'hôte.

Les grades 2-3-4 correspondent à une infection : présence de micro-organismes réplicatifs et virulents dans la plaie entraînant une réponse inflammatoire et des dommages tissulaires.

À noter que la distinction entre une plaie colonisée (grade 1) et une infection débutante (grade 2) n'est pas toujours évidente...

(http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-mai/desc-mai2011-pied-diab.pdf)

Les prélèvements ne sont indiqués qu'à partir du grade 2, quand il y a des signes cliniques d'infection et qu'une antibiothérapie est envisagée. (31)

En effet, le diagnostic d'infection d'une plaie est clinique et non bactériologique. Le prélèvement (sous réserve qu'il soit de bonne qualité après une préparation optimale de la plaie) sert à mettre en évidence les bactéries responsables de l'infection et permet ainsi d'entreprendre une antibiothérapie adaptée.

3. IDENTIFICATION

Historiquement, quelques souches (non incluses dans cette étude) ont été identifiées au CH de Cahors à partir des caractères déterminés sur les galeries API 20 Strep et Rapid ID 32 Strep, puis confirmées par le CNR-Strep par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Ces souches ont été transférées chez bioMérieux et ont servi à compléter la base de données Vitek 2, ce qui a permis par la suite une identification plus aisée.

Trois techniques différentes ont été utilisées pour identifier les souches incluses dans cette étude :

3.1. Automate Vitek 2 (bioMérieux)

L'identification phénotypique par l'automate Vitek 2 (bioMérieux) est basée sur l'étude de 43 caractères biochimiques : étude de la fermentation de divers sucres, recherche d'activités enzymatiques par hydrolyse de substrats et recherche de résistances à des inhibiteurs.

Au cours de l'étude, les souches conservées de Cahors, les souches qui nous ont été transmises depuis Caen et depuis Toulouse ont été identifiées à l'aide de la carte ID-GP du Vitek 2 afin de recueillir les caractères biochimiques rendus par cet automate. (Vitek 2 version 05.04, carte ID-GP lots n° 242275640, n° 242281810 et n° 242289842)

NB : La plupart des souches avaient été identifiées par le Vitek 2 au moment de l'isolement, mais les caractères biochimiques obtenus n'avaient pas été conservés pour toutes les souches et la galerie d'identification a été modifiée entre-temps.

3.2. Spectrométrie de masse

Introduite plus récemment, la spectrométrie de masse permet une identification rapide des bactéries, par analyse de leurs protéines ribosomales et de leurs protéines associées aux membranes. Malgré le coût de l'appareillage, cette technique est en plein essor du fait de ses nombreux avantages : simplicité d'utilisation, rapidité et fiabilité du rendu des résultats. Les spectromètres de masse utilisés pour l'identification bactérienne sont de type MALDI-TOF :

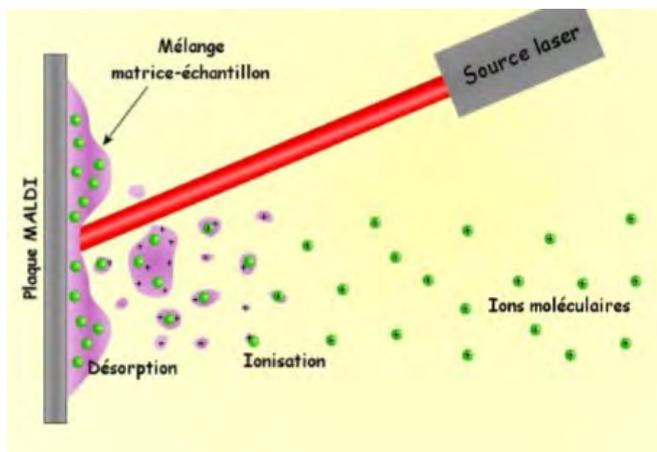
- MALDI (= *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*), désignant la technique d'ionisation. ([Figure 3](#))
- TOF (= *Time-Of-Flight*), correspondant à la mesure du temps que mettent les différents ions pour atteindre le détecteur. Les molécules sont séparées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). ([Figure 4](#))

Des colonies isolées sont déposées sur une plaque d'analyse appelée cible, puis après séchage, une matrice constituée de molécules cristallisées et d'un solvant est ajoutée. Le spot contenant le mélange matrice/échantillon est séché à l'air. Le

solvant va s'évaporer et il ne restera plus que la matrice cristallisée et l'analyte. Un laser UV est alors pulsé en direction de la cible. La matrice, en absorbant l'énergie du laser, se vaporise, libère les peptides (= désorption) et transfère ses protons aux peptides qui deviennent chargés positivement (= ionisation), (Figure 3). Les substances ionisées sont accélérées électrostatiquement sur une courte distance, et entrent dans le tube de vol à une vitesse dépendant du rapport masse/charge. Un détecteur compte les ions, et enfin un système informatique traite le signal. Le résultat obtenu est un ensemble de pics, appelé spectre de masse, représentant les rapports m/z des ions détectés et l'intensité relative de ces ions (Figure 5). Ce spectre de masse (= profil protéique) est comparé aux spectres de référence contenus dans la base de données de l'appareil. (32,33)

Deux appareils sont actuellement commercialisés en France, un par Bruker Daltonics (Microflex LT) et l'autre par bioMérieux (Vitek MS).

Figure 3 : Principe d'ionisation pour la technique MALDI (33)



L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet)

Figure 4 : Technique temps de vol (34)

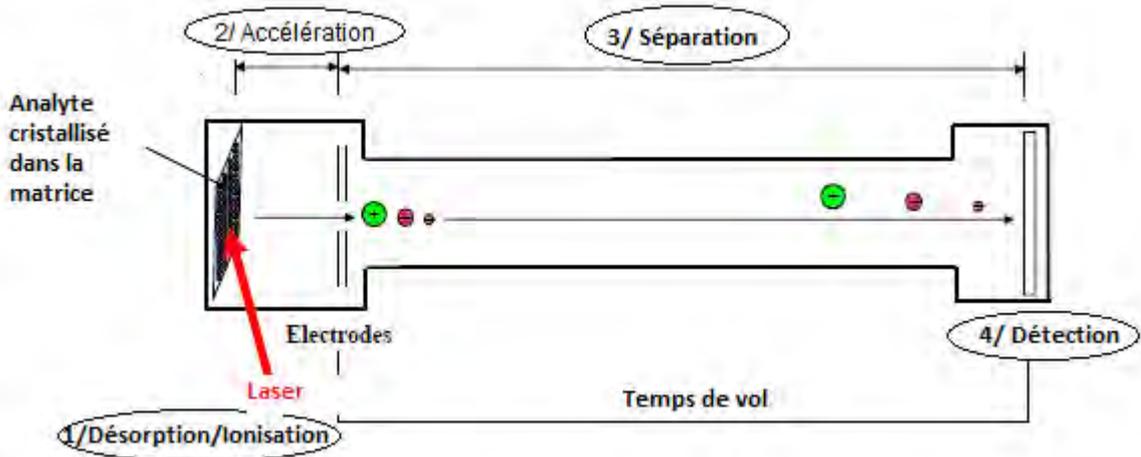
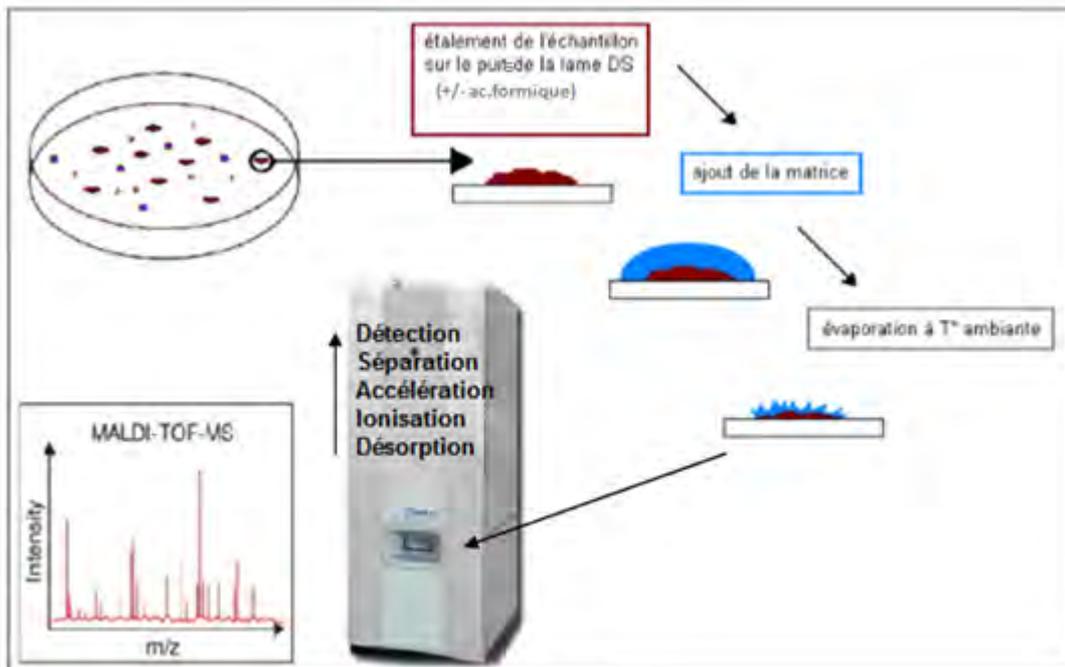


Figure 5 : Schéma de préparation de l'échantillon (33)



L'ensemble des souches incluses dans cette étude (à l'exception des souches qui n'avaient pas été conservées) et la souche de référence DSM 10548 ont été analysées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur le système Microflex LT de Bruker Daltonics (logiciel Biotyper v.3.0). Chacune des 41 souches analysées a été testée à 2 reprises sur ce système.

3.3. Identification moléculaire

Chaque souche isolée au laboratoire du CH de Cahors et identifiée « *H. kunzii* » par l'automate Vitek 2 était envoyée au CNR-Strep qui réalisait une identification génotypique par séquençage de gènes cibles. Seules 3 souches/27 n'ont pas été envoyées. Au CNR-Strep cette identification était basée sur l'amplification puis le séquençage du gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S ou du gène *sodA* codant pour la superoxyde dismutase manganèse-dépendante.

Les 8 souches du CHU de Caen ont également été identifiées par séquençage du gène *rrs* et *sodA*.

Pour les 11 souches de Toulouse, l'identification a seulement été confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

➤ Gène *rrs* (ARNr 16S)

Le gène *rrs* est un gène ubiquitaire (environ 1500 paires de bases) présent en plusieurs copies chez toutes les espèces bactériennes.

Il comporte des portions de séquences très conservées qui permettent d'utiliser des amorces universelles pour son amplification et d'autres portions de séquences, propres à un groupe de bactéries, qui permettent (le plus souvent) une identification à l'espèce après comparaison à une banque de séquences connues. (35)

Cependant, des séquences différentes d'ARNr 16S peuvent exister chez un même micro-organisme (36), ou inversement des espèces proches peuvent avoir des séquences identiques (37).

L'interprétation de ce gène peut donc être délicate, c'est pourquoi des gènes alternatifs plus spécifiques d'espèces sont parfois amplifiés et séquencés (comme le gène *sodA* pour les streptocoques). (38)

➤ **Gène sod (codant pour une superoxyde dismutase)**

Les sod sont des métallo-enzymes qui catalysent la conversion d'anions superoxydes O_2^- en molécules d'oxygène O_2 ou en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces enzymes constituent un mécanisme de défense majeur des cellules contre le stress oxydatif. Il en existe plusieurs types en fonction des ions cofacteurs contenus dans leur site actif :

- Les formes à cuivre-zinc (Cu/Zn-sod) : présentes essentiellement chez les eucaryotes.
- Les formes à manganèse (Mn-sod) : présentes dans les mitochondries des cellules eucaryotes et chez les procaryotes.
- Les formes à fer (Fe-sod) : présentes dans les chloroplastes des eucaryotes et chez les procaryotes.

Pour *H. kunzii*, c'est le gène *sodA* codant pour la superoxyde dismutase manganèse-dépendante qui est séquencé. (39,40)

➤ **Modalités techniques**

L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée à l'aide du kit InstaGene Matrix (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

- Amplification du gène *rrs* (41)

Le couple d'amorces Ehs (5'- TACGGGAGGCAGCAGTGG-3') pour le brin sens et S15 (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3') pour le brin anti-sens a été utilisé.

La PCR était réalisée à l'aide du Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Roissy, France), dans un volume final de 50 μ l : 5 μ l d'ADN et 45 μ l de mélange réactionnel contenant le couple d'amorces (10 pM de chaque amorce), des dNTPs (10mM), la Taq polymérase (1U), du tampon 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl et 1,5 mM $MgCl_2$).

Le programme de PCR était le suivant : dénaturation initiale 2 minutes à 94°C ; 30 cycles d'amplification (dénaturation, 30 secondes à 94 °C ; hybridation, 30

secondes à 57°C ; élongation, 75 secondes à 72°C) ; et élongation finale, 5 minutes à 72°C.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium était réalisée sur les produits de PCR.

La mise en évidence d'une bande sur le gel témoignait de l'amplification correcte du gène.

- Amplification du gène *sodA* (40)

Le couple d'amorces SOD1 (5'-CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC-3') et SOD2 (5'-ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC-3') était utilisé pour amplifier un fragment représentant environ 85% du gène (environ 480 pb).

La PCR était réalisée à l'aide du Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Roissy, France), avec un volume final de 50 µl contenant : 250 ng d'ADN, 0,25 µM de chaque amorce, 200 µM de chaque dNTP, 1 U de Taq DNA polymérase Gold et du tampon 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl et 1,5 mM MgCl₂).

Le programme de PCR utilisé était le suivant : dénaturation initiale 3 minutes à 95°C ; 35 cycles d'amplification (dénaturation, 30 secondes à 95 °C ; hybridation, 90 secondes à 37°C ; élongation, 90 secondes à 72°C) ; et élongation finale 10 minutes à 72°C.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium était réalisée sur les produits de PCR.

La mise en évidence d'une bande à 480 bp sur le gel témoignait de l'amplification correcte du gène.

- Séquençage et comparaison des séquences

Après purification, les produits PCR étaient envoyés au centre de séquençage. Les séquences obtenues étaient comparées par alignement à une banque de séquences connues, à l'aide de logiciels en ligne :

- logiciel BIBI : Bio Informatic Bacterial Identification de l'université de Lyon (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>)

- logiciel BLAST : Basic Local Alignment Search Tool du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Ces logiciels fournissent un pourcentage d'homologie entre la séquence étudiée et celles contenues dans les banques de données. Selon certains auteurs, l'identité à l'espèce est définie pour ≥ 99 % d'homologie de séquence avec une souche de référence. La souche bactérienne peut enfin être positionnée parmi l'ensemble des espèces connues sous forme d'un arbre phylogénétique construit par un logiciel adapté.

4. ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Au moment de l'isolement des souches d'*H. kunzii*, un antibiogramme en milieu gélosé Mueller-Hinton additionné de 5% de sang de mouton (ou gélose Columbia) avec des comprimés pour antibiogramme Rosco sous 9 % de CO₂ était réalisé.

Le CNR Strep réalisait aussi un antibiogramme sur milieu Mueller-Hinton au sang avec des disques Bio-Rad sous 5-7 % de CO₂ sur les souches qui lui étaient envoyées.

Durant cette étude, le laboratoire associé au CNR Résistance aux Antibiotiques du CHU de Caen a déterminé les CMI de 19 antibiotiques pour l'ensemble des souches incluses dans cette étude, ainsi que pour la souche de référence DSM 10548.

Il a également recherché par PCR-séquençage les gènes de résistance :

- aux macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) chez les souches présentant une résistance de haut niveau à l'érythromycine,
- et aux tétracyclines en cas de résistance à cette famille.

4.1. Détermination des CMI

Les CMI ont été déterminées par microdilution en milieu liquide selon les recommandations de l'EUCAST (<http://www.eucast.org>). Un inoculum à 0,5 McFarland dans un bouillon Mueller-Hinton supplémenté en sang de cheval lysé (5

%) et β -Nicotinamide adénine dinucléotide (β -NAD 20 mg/L) était mis en contact avec des concentrations croissantes d'antibiotiques et incubé à 35°C pendant 24 heures.

La CMI de l'antibiotique était indiquée par le puit contenant la plus faible concentration qui inhibait toute croissance visible à l'œil nu.

Les antibiotiques suivants ont été testés : pénicilline G, amoxicilline, céfotaxime, imipénème, ciprofloxacine, lévofloxacine, érythromycine, clindamycine, quinupristine-dalfopristine, rifampicine, gentamicine, daptomycine, linézolide, vancomycine, teicoplanine, tétracycline, tigécycline, cotrimoxazole et colistine.

4.2. Recherche de gènes de résistance

4.2.1. Résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines

Chez les streptocoques, il existe plusieurs mécanismes de résistance acquise à cette famille d'antibiotiques qui sont par ordre de fréquence (42) :

- **Modification de la cible par méthylation ribosomale :**

Ce mécanisme est associé aux gènes *erm* (pour erythromycin ribosome methylase) porté par des plasmides ou des transposons. Ils codent pour des méthylases, qui catalysent la méthylation de l'adénine 2058 de l'ARN 23S, empêchant ainsi la fixation des antibiotiques sur leur cible bactérienne. L'adénine 2058 étant un point de liaison commun aux macrolides, lincosamides et streptogramines B, la résistance est croisée entre ces molécules et le phénotype de résistance porte le nom de MLS_B. A noter que ce phénotype de résistance peut être inductible (résistance aux macrolides à 14 ou 15 atomes) ou constitutif (résistance aux macrolides à 14, 15 ou 16 atomes, aux lincosamides et aux streptogramines B).

Plusieurs classes de gènes *erm* ont été décrites. Chaque classe de gènes est relativement spécifique d'un genre bactérien, mais non confiné à celui-ci. Ainsi, les gènes *erm(A)* et *erm(C)* sont essentiellement retrouvés chez les staphylocoques, les gènes *erm(B)* et *ermTR* [sous-classe de *erm(A)* (29)] chez les streptocoques et entérocoques.

- **Efflux de l'antibiotique :**

Chez les streptocoques, le principal système d'efflux actif est codé par le gène *mef(A)*, et affecte seulement les macrolides à 14 atomes de carbone (sauf la télithromycine qui est mauvais substrat) et à 15 atomes de carbone. La protéine Mef(A) appartient à la famille des « Major Facilitator Superfamily » (MFS), pompes d'efflux fonctionnant avec l'énergie conférée par un gradient de protons. Il se traduit par un bas niveau de résistance à ces antibiotiques (CMI de l'érythromycine généralement comprise entre 4 et 32 µg/mL), et confère le phénotype dit « M ».

- **Inactivation enzymatique :**

Cette résistance est due à la production d'enzymes capables d'inactiver les MLS. Une enzyme donnée ne va affecter que les molécules de structure apparentée, et du fait de sa spécificité ne sera pas responsable de résistance croisée entre les MLS.

- **Recherche des gènes *ermTR*, *erm(B)*, *erm(C)* et *mef(A)***

Le laboratoire associé au CNR Résistance aux Antibiotiques a recherché les gènes *ermTR*, *erm(B)*, *erm(C)* et *mef(A)* par PCR-séquençage selon les modalités décrites ci-dessous.

L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée à l'aide du réactif InstaGene Matrix (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

Les couples d'amorces mentionnés dans le Tableau 13 ont été utilisés pour l'amplification des gènes *ermTR*, *erm(B)*, *erm(C)* et *mef(A)*.

Tableau 13 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des gènes *ermTR*, *erm(B)*, *erm(C)* et *mef(A)*

| Nom de l'amorce | Séquence nucléotidique |
|-----------------|---|
| erm(TR)D | 5'- AGG TTT ATA ATG AAA CAG A -3' |
| erm(TR)R | 5'- TGA CAT AAA CCT TCA TC -3' |
| erm(B)D | 5'- GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA -3' |
| erm(B)R | 5'- AAT TTA AGT ACC GTT ACT -3' |
| erm(C)D | 5'- TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA -3' |
| erm(C)R | 5'- GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT -3' |
| mef(A)D | 5'- AGT ATC ATT CAC CAG TGC -3' |
| mef(A)R | 5'- TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG -3' |

La PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µl : 5 µl d'ADN et 45 µl de mélange réactionnel contenant le couple d'amorces (20 µM de chaque amorce), des dNTPs (10mM), la Taq polymérase (1U), du tampon 5X.

Le programme de PCR utilisé était le suivant : dénaturation initiale 5 minutes à 95°C ; 30 cycles d'amplification (dénaturation, 30 secondes à 95 °C ; hybridation, 30 secondes à une température spécifique pour chaque couple d'amorces, élongation, 30 secondes / 500 pb à 72°C) ; et élongation finale 5 minutes à 72°C.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium était réalisée sur les produits de PCR.

La purification des produits de PCR ainsi que le séquençage étaient assurés par la société GATC Biotech (Konstanz, Allemagne). Les oligonucléotides utilisés pour le séquençage étaient ceux utilisés comme amorces pour la PCR.

4.2.2. Résistance aux tétracyclines

Chez les bactéries à Gram positif, il existe deux principaux mécanismes de résistance acquis aux tétracyclines (43,44) :

- Efflux de l'antibiotique : gènes *tet(K)* et *tet(L)*
- Protection du ribosome : gènes *tet(M)* et *tet(O)*

La recherche des gènes *tet(M)*, *tet(O)* et *tet(L)* a été effectuée par PCR-séquençage selon les modalités décrites ci-dessous. (45)

Les couples d'amorces mentionnés dans le Tableau 14 ont été utilisés pour l'amplification des gènes *tet(M)*, *tet(O)* et *tet(L)*.

Tableau 14 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des gènes *tet(M)*, *tet(O)* et *tet(L)*.

| Nom de l'amorce | Séquence nucléotidique |
|-----------------|------------------------------|
| tet(M) D | 5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3' |
| tet(M) R | 5'-TGGCGTGTCTATGATGTTCCAC-3' |
| tet(O) D | 5'-ACGGARAGTTTATTGTATACC-3' |
| tet(O) R | 5'-TGGCGTATCTATAATGTTGAC-3' |
| tet(L) D | 5'-TGGTGGAAATGATAGCCCATT-3' |
| tet(L) R | 5'-CAGGAATGACAGCACGCTAA-3' |

La PCR a été réalisée dans un volume final de 20 µl, contenant 25 pM de chaque amorce, 100 µM de chaque dNTP, 1U de *ExTaq* DNA polymérase (1U), du tampon 1X et 200 ng d'ADN purifié.

Le programme de PCR utilisé était le suivant : dénaturation initiale 5 minutes à 94°C ; 25 cycles d'amplification (dénaturation, 30 secondes à 94 °C ; hybridation, 30 secondes à une température spécifique pour chaque couple d'amorces, élongation, 30 secondes à 72°C) ; et élongation finale 7 minutes à 72°C.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium était réalisée sur les produits de PCR.

La purification des produits de PCR ainsi que le séquençage étaient assurés par la société GATC Biotech (Konstanz, Allemagne). Les oligonucléotides utilisés pour le séquençage étaient ceux utilisés comme amorces pour la PCR.

5. ÉTUDE *IN VIVO* DU POTENTIEL DE VIRULENCE SUR *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Le laboratoire du Pr. Jean-Philippe Lavigne à Nîmes a étudié le potentiel de virulence des souches incluses dans cette étude sur le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Certaines bactéries entraînent des maladies chez des hôtes aussi divers que les plantes, les nématodes, les insectes et les mammifères suggérant qu'il existe des stratégies de pathogénèse microbienne communes vis-à-vis de l'hôte. Il est donc possible de recueillir des données relatives aux interactions hôte-pathogène en utilisant des modèles expérimentaux d'invertébrés.

Un des modèles les plus utilisés est le modèle *C. elegans*. Il s'agit d'un petit nématode (1 mm) hermaphrodite : il est transparent, vit normalement dans le sol, ses conditions de culture sont simples, son temps de génération est rapide (3 jours), le lignage cellulaire est constant et son génome est entièrement séquencé. Depuis une quinzaine d'années, divers modèles d'interaction micro-organisme-*C. elegans* ont été étudiés, par exemple avec *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Microbacterium nematophilum* (ce dernier découvert fortuitement est un pathogène naturel de *C. elegans*).

Malgré les avantages de ce modèle d'étude, celui-ci a ses limites. L'utilisation de *C. elegans* pour étudier des mécanismes de pathogénicité est bien sûr limitée aux micro-organismes susceptibles d'infecter ce nématode. D'autre part, chez la plupart des agents pathogènes des mammifères, la régulation des facteurs de virulence induits en réponse à un environnement spécifique, se fait de manière très stricte. Ainsi, la température est généralement un signal clé, et il est vraisemblable que beaucoup de facteurs de virulence ne peuvent s'exprimer chez le ver (qui croît à température ambiante).

La pertinence de ce modèle reste donc à vérifier dans chacune des études entreprises. (46–49)

PARTIE III
RÉSULTATS

Cette étude rétrospective a été menée sur 46 souches cliniques d'*H. kunzii* isolées chez 42 patients.

L'ensemble des données cliniques recueillies sont rapportés sous forme de tableaux.

1. ORIGINE DES PRÉLÈVEMENTS

Les Tableau 15, Tableau 16, Tableau 17 et Tableau 18 mentionnent les données démographiques et les informations relatives aux prélèvements et aux comorbidités des patients.

Tableau 15 : Données démographiques, sites de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 1 à 11)

| Patient | Age(années) /Sexe ^A | Prélèvement | | | Terrain sous-jacent ^D | Etat podologique ^E |
|---------|-----------------------------------|-------------|--|--|--|--|
| | | Date | Service ^B | Site ^C | | |
| 1 | 85/M | 21/07/2009 | UGADE (CH Cahors) | Plante pied D (en regard M4) | AOMI stade IV, Coronaropathie, carcinome urothélial stade terminal | Ulcères artériels des pieds |
| 2 | 57/M | 09/10/2008 | UGADE (CH Cahors) | Face plantaire pied D (en regard MTP 2) | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périphérique., | Mal perforant plantaire pied D, osteoarthrite 2°MTP D (8 mois avant) |
| 3 | 84/M | 22/02/2011 | HAD (CH Cahors) | Pied G (bord externe) | AOMI stade IV, Coronaropathie, AVC->hémiplegie G, HTA, surpoids, exogénose | Ulcères artériels pied G, amputation 1er orteil D (2 ans avant) |
| 4 | 68/M | 04/09/2009 | UMIT (CH Cahors) | Malléole externe D | Diabète type II insulino-dépendant, insuffisance veineuse, obésité morbide, HTA | Ulcères veineux MI depuis > 10 ans, amputations 2° et 3° orteils D |
| 5 | 79/F | 08/04/2010 | UGADE (CH Cahors) | 1er orteil D (bord externe) | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périphérique, AOMI stade IV, Coronaropathie, HTA, PPR (sous corticoïdes et novatrex) | Plaies chroniques orteils D |
| 6 | 57/M | 16/08/2012 | Consult. Cicatrisation (CH Cahors) | Face plantaire 1er rayon D | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périphérique, AOMI, obésité, Insuffisance cardiaque | Mal perforant plantaire pied D, osteoarthrite 1er rayon D (2 ans avant) |
| 7 | 79/M | 09/05/2008 | Cardiologie (CH Cahors) | 2°orteil G (face dorsale) | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périph., AOMI, Insuffisance cardiaque, exogénose | Amputation transmétatarsienne 1er rayon G (1 an avant), plaies itératives MI |
| 8 | 53/M | 25/09/2009 | Consult. Cicatrisation (CH Cahors) | Malléole interne D | Insuffisance veineuse sévère, AOMI compensée, obésité morbide, HTA | Ulcères variqueux récidivants |
| 9 | 78/M | 24/01/2013 | UGADE (CH Cahors) | Talon G | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périphérique, AOMI stade IV, obésité, Insuffisance cardiaque | Amputation 2°orteil G (2 ans avant), ostéite talon G (1 an avant) |
| 10 | 60/M | 18/10/2012 | Dialyse (CH Cahors) | 1er orteil D | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périphérique, AOMI stade IV, Coronaropathie, HTA | Mal perforant 1er orteil D depuis 1 an, amputation 2°orteil D, déformation en griffe des orteils D |
| 11 | 84/M | 20/12/2010 | Chirurgie orthopédique (CH Cahors) | 1er orteil D (plaie pulpe) | Diabète type II non insulino-dépendant, AOMI, insuffisance veineuse, HTA | Mal perforant 1er orteil D |

^A : M : Sexe masculin ; F : Sexe féminin ; ^B : UGADE : Unité Gériatrie Aigue Diabétologie Endocrinologie ; HAD : Hospitalisation A Domicile ; UMIT : Unité de Maladies Infectieuses et Tropicales ; UHCD : Unité d'Hospitalisation de Courte Durée ; ^C : D : Droit ; G : Gauche ; M : Os métatarsien ; MTP : Articulation métatarso-phalangienne ; ^D : AOMI : Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs ; AVC : Accident Vasculaire Cérébral ; HTA : Hypertension artérielle ; PPR : Pseudo-polyarthrite-rhizomélique ; ^E : MI : Membres inférieurs ; ND : Non documenté

Tableau 16 : Données démographiques, sites de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 12 à 21)

| Patient | Age(années) /Sexe ^A | Prélèvement | | | Terrain sous-jacent ^D | Etat podologique ^E |
|-----------------|-----------------------------------|-------------|---------------------------------------|---|---|---|
| | | Date | Service ^B | Site ^C | | |
| 12 | 91/M | 05/06/2012 | Chirurgie vasculaire (CH Cahors) | 2°orteil D | AOMI stade IV, Coronaropathie, HTA | ND |
| 13 | 85/M | 17/08/2012 | Urgences (CH Cahors) | Ecoulement plaie malléole interne G | Coronaropathie, HTA (pas de notion d'AOMI ni de diabète) | ND avant AVP; Plaie suturée sous-malléolaire interne G post-traumatique (AVP moto 3 jours avant) |
| 14 | 52/M | 01/03/2011 | Chirurgie viscérale (CH Cahors) | Abcès fesse D | Diabète type II non insulino-dépendant, surpoids | Bon état podologique |
| 15 | 60/F | 20/06/2010 | UHCD (CH Cahors) | Tumeur cutanée épaule G | Surpoids, HTA | ND |
| 16 | 21/F | 23/05/2008 | Consult. Cicatrisation (CH Cahors) | Face plantaire pied G (en regard tête M2, prélèvement au contact de l'os) | Troubles de la statique et de la sensibilité pied gauche suite à AVP | Plaie en regard tête M2 G depuis 1 an |
| 17 ¹ | 74/M | 08/02/2010 | UGADE (CH Cahors) | Face plantaire pied G (en regard MTP 1) | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périphérique, AOMI, HTA | Amputation des 2°,3°,4° et 5° orteils G (10 ans avant), déformation en griffe du 1er orteil G avec hyper-appui sous la MTP 1, amputation trans-tibiale D (3 ans avant) |
| | | 12/02/2010 | Bloc-opérateur | Liquide drainage du trajet fistuleux | | |
| 18 | 37/M | 18/12/2012 | Urgences (CH Cahors) | Escarre sacrée | Paraplégie | ND |
| 19 | 41/M | 18/08/2008 | UGADE (CH Cahors) | Face plantaire pied D (en regard de M3 et M4) | Diabète type II insulino-dépendant, insuffisance veineuse, obésité morbide, HTA | Mal perforant plantaire pied D |
| 20 | 69/F | 02/02/2008 | UMIT (CH Cahors) | Mollet jambe D | AOMI, Coronaropathie, AVC, HTA, polyarthrite rhumatoïde (sous arava), prothèses de genoux bilatérales | Angiodermite nécrotique jambe D depuis 4 mois |
| 21 | 57/M | 14/01/2012 | UHCD (CH Cahors) | Escarres sacrée et trochantérienne G | Diabète type II insulino-dépendant, paraplégie, exogénose | ND |

^A : M : Sexe masculin ; F : Sexe féminin ; ^B : UGADE : Unité Gériatrie Aigue Diabétologie Endocrinologie ; UMIT : Unité de Maladies Infectieuses et Tropicales ; UHCD : Unité d'Hospitalisation de Courte Durée ; ^C : D : Droit ; G : Gauche ; M : Os métatarsien ; MTP : Articulation métatarso-phalangienne ; ^D : AOMI : Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs ; AVC : Accident Vasculaire Cérébral ; HTA : Hypertension artérielle ; ^E : MI : Membres inférieurs ; ND : Non documenté

¹ : *H. kunzii* a été isolé dans 2 prélèvements au cours de la même hospitalisation à 4 jours d'intervalle. Seule la souche isolée du liquide de drainage a été conservée.

En gras : prélèvements hors membre inférieur

Tableau 17 : Données démographiques, sites de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 22 à 30)

| Patient | Age(années) /Sexe ^A | Prélèvement | | | Terrain sous-jacent ^D | Etat podologique ^E |
|-----------------|-----------------------------------|-------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| | | Date | Service ^B | Site ^C | | |
| 22 ¹ | 69/M | 06/10/2011 | UGADE (CH Cahors) | Face plantaire pied D | Diabète type II insulino-dépendant, neuropathie périphérique, pied de Charcot (côté droit), AOMI , HTA, insuffisance veineuse, coronaropathie, surpoids | Maux perforants pied D |
| | | 04/03/2012 | UGADE (CH Cahors) | Face plantaire pied D | | |
| | | 23/08/2012 | Consult. Cicatrisation (CH Cahors) | Ecoulement face plantaire pied D | | |
| 23 | 88/F | 27/01/2012 | Médecine polyvalente (CH Cahors) | Ecoulement malléole externe G | Diabète type II non insulino-dépendant, Insuffisance veineuse, surpoids, Insuffisance cardiaque | Ulcères veineux malléoles externe G |
| 24 | 102/F | 16/08/2013 | Chirurgie vasculaire (CH Cahors) | 3 ^o orteil G | HTA | ND |
| 25 | 84/M | 16/07/2009 | CH Alençon | Hémoculture | AOMI, coronaropathie, insuffisance cardiaque | Amputation d'orteils en 2008, ulcères artériels pieds D et G |
| 26 | 43/M | 16/02/2013 | Chirurgie (Suisse) | Abcès pied D | Ethylisme | Phlyctène pied 2012 |
| 27 | 55/F | 21/11/2012 | Chirurgie (Suisse) | Pieds D et G | ND | Amputation d'orteils |
| 28 | 49/M | 15/03/2013 | Chirurgie vasculaire (CHU Caen) | 5 ^o orteil D (pus profond) | Diabète, AOMI | Ulcères chroniques pieds |
| 29 | 81/M | 04/04/2013 | Dermatologie (CHU Caen) | Conduit auditif G | Carcinome épidermoïde avec envahissement du conduit auditif, radiothérapie | ND |
| 30 | 68/M | 02/04/2013 | Soins intensifs (Suisse) | Pied | Diabète, Insuffisance cardiaque sévère, éthylisme | Mal perforant |

^A : M : Sexe masculin ; F : Sexe féminin ; ^B : UGADE : Unité Gériatrie Aiguë Diabétologie Endocrinologie ; ^C : D : Droit ; G : Gauche ; M : Os métatarsien ; ^D : AOMI : Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs ;
HTA : Hypertension artérielle ; ^E : ND : Non documenté

¹ : *H. kunzii* a été isolé à 3 reprises chez le même patient à quelques mois d'intervalle.

En gras : prélèvements hors membre inférieur

Tableau 18 : Données démographiques, site de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 31 à 42)

| Patient | Age(années) /Sexe ^A | Prélèvement | | | Terrain sous-jacent ^C | Etat podologique ^D |
|-----------------|--------------------------------|-------------|--|--|--|---|
| | | Date | Service | Site ^B | | |
| 31 | 82/M | 04/2013 | Hôpital de Sion (Suisse) | Pied (biospsie osseuse) | Diabète, HTA | Amputation 5°orteil, ulcères chroniques |
| 32 | 47/F | 30/04/2013 | Chirurgie orthopédique (CHU Caen) | Hanche G (pus profond) | Tumeur desmoïde fesse gauche (opérée en 1984), récurrence crête iliaque : radiothérapie 60 Gy) -> radiodermite | ND |
| 33 ¹ | 61/M | 01/04/2009 | Hôpital de Saint-Girons (CHU Toulouse) | Pied D | AOMI, HTA, éthylisme, escarre sacrée | Amputation jambe G |
| 34 ² | 63/M | 06/07/2009 | Diabétologie (CHU Toulouse) | 1er orteil | Diabète type II, neuropathie périphérique, HTA | Mal perforant plantaire |
| | | 20/07/2009 | Bloc-opératoire | Tissu mou 1er orteil | | |
| 35 | 85/F | 09/07/2009 | Exploration vasculaire (CHU Toulouse) | 3° orteil G | AOMI stade IV, diabète type II insulino-dépendant, HTA, insuffisance cardiaque, valvulopathie, coronaropathie | Troubles trophiques orteils G |
| 36 | 52/M | 16/07/2009 | Exploration vasculaire (CHU Toulouse) | Jambe G | Maladie de Behcet, pseudo-folliculites nécrosantes, thromboses veineuses profondes et superficielles | Ulcère veineux jambe |
| 37 | 56/M | 09/10/2009 | Consultation urologie (CHU Toulouse) | Plaie de néphrectomie | Adénocarcinome rein D, néphrectomie en septembre 2009 | ND |
| 38 | 56/M | 03/04/2010 | Traumatologie (CHU Toulouse) | Abcès pied G | Goutte tophacée | ND |
| 39 | 41/F | 14/05/2011 | Chirurgie vasculaire (CHU Toulouse) | Ulcère inguinal | Adénocarcinome vulvaire -> radiothérapie, curage inguino-iliaque et résection d'une adénopathie fémorale D en janvier 2011 | ND |
| 40 | 64/M | 09/08/2011 | Diabétologie (CHU Toulouse) | Pied D | Diabète type II, HTA, insuffisance veineuse | Mal perforant plantaire |
| 41 ¹ | 64/M | 13/01/2012 | Hôpital Joseph Ducuing (CHU Toulouse) | Pied G | Pieds bots varus équien (congénital), éthylisme | Ostéite chronique du pied G |
| 42 | 63/M | 31/03/2013 | Traumatologie (CHU Toulouse) | Tissu mou 5° orteil G (x3 prélèvements : <i>H. kunzii</i> 3/3 +) | Diabète type II, neuropathie sévère, varices | Mal perforant plantaire |

^A : M : Sexe masculin ; F : Sexe féminin ; ^B : D : Droit ; G : Gauche ; ^C : AOMI : Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs ; HTA : Hypertension artérielle ; ^D : ND : Non documenté

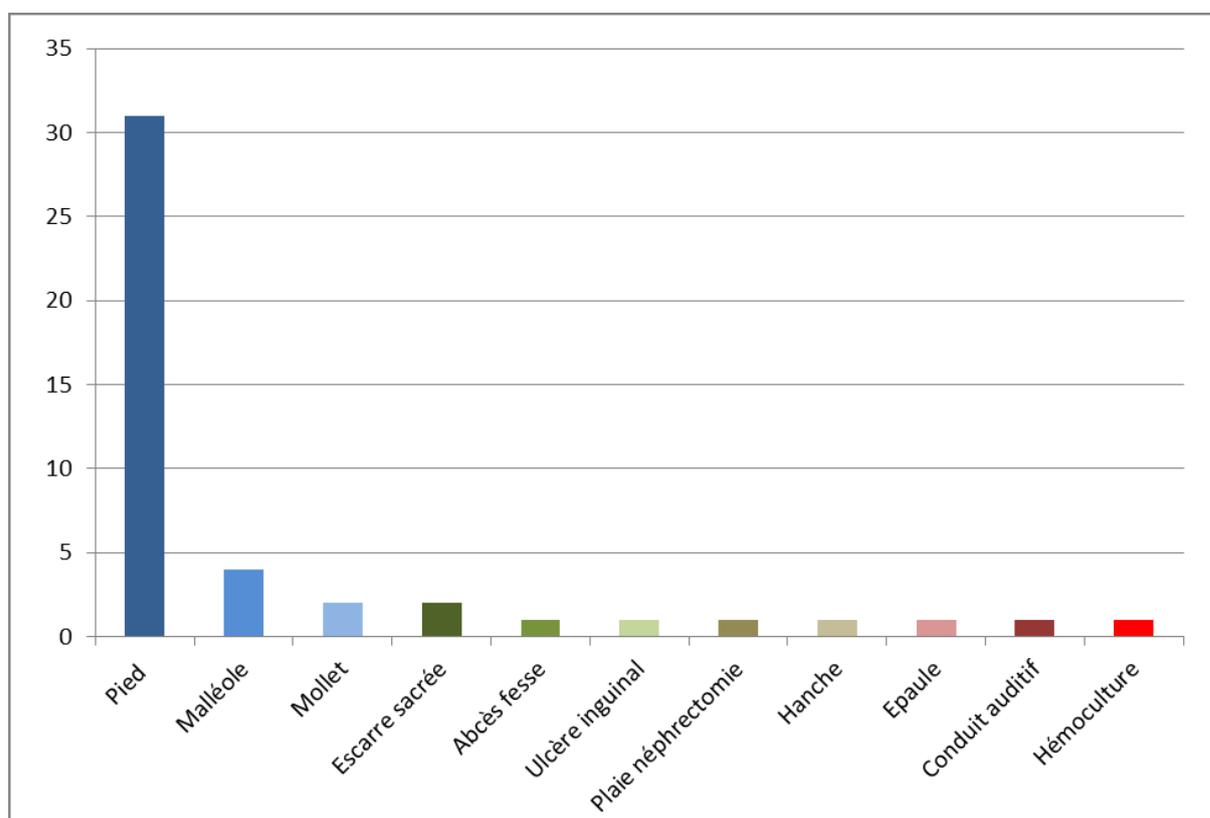
¹ : Souches envoyées au laboratoire de bactériologie du CHU de Toulouse pour identification, peu de données cliniques sont disponibles ; ² : *H. kunzii* isolé sur 2 prélèvements à 2 semaines d'intervalle, seul le premier isolat a été conservé.

En gras : prélèvements hors membre inférieur

1.1. Sites d'isolement

La plupart des souches ont été isolées à partir de prélèvements réalisés au niveau des membres inférieurs. En effet, 37 isolats (37/46, soit 80 %) ont été retrouvés en dessous du genou, voire pour le plus grand nombre au niveau des pieds (31/46, soit 67 %). Les autres sites d'isolement étaient deux escarres sacrées, un abcès de la fesse, un ulcère inguinal, une plaie de néphrectomie, un pus profond au niveau de la hanche, un mélanome ulcéré de l'épaule et un conduit auditif externe. Enfin, une seule souche (CH d'Alençon) a été isolée dans une hémoculture.

Figure 6 : Sites d'isolement des souches incluses dans l'étude



1.2. Modalités et types de prélèvements

Concernant les isolats du laboratoire du CH de Cahors, le type d'échantillon reçu n'est pas renseigné sur le système informatique et très peu de données sont notées

dans le dossier clinique sur les modalités du prélèvement. Le plus souvent, nous recevons un écouvillonnages de la plaie. Dans les services d'endocrinologie-gériatrie aiguë (UGADE), d'infectiologie (UMIT) et lors de la consultation de cicatrisation, ces prélèvements sont réalisés par des médecins expérimentés, après une préparation optimale de la plaie pour limiter la contamination de l'échantillon par la flore commensale cutanée.

De même, la plupart des souches du CHU de Toulouse ont été isolées à partir d'écouvillonnages. Seules deux souches ont été isolées au niveau de biopsies tissulaires et une souche dans un pus profond.

Parmi les trois souches de Caen, deux ont été isolées dans des pus profonds et une à partir d'un écouvillonnage du conduit auditif.

Parmi les 4 isolats suisses, l'un d'eux (retrouvé en culture pure) a été isolé à partir d'une biopsie d'os métatarsien. Les autres prélèvements étaient des écouvillonnages.

1.3. Types de plaies

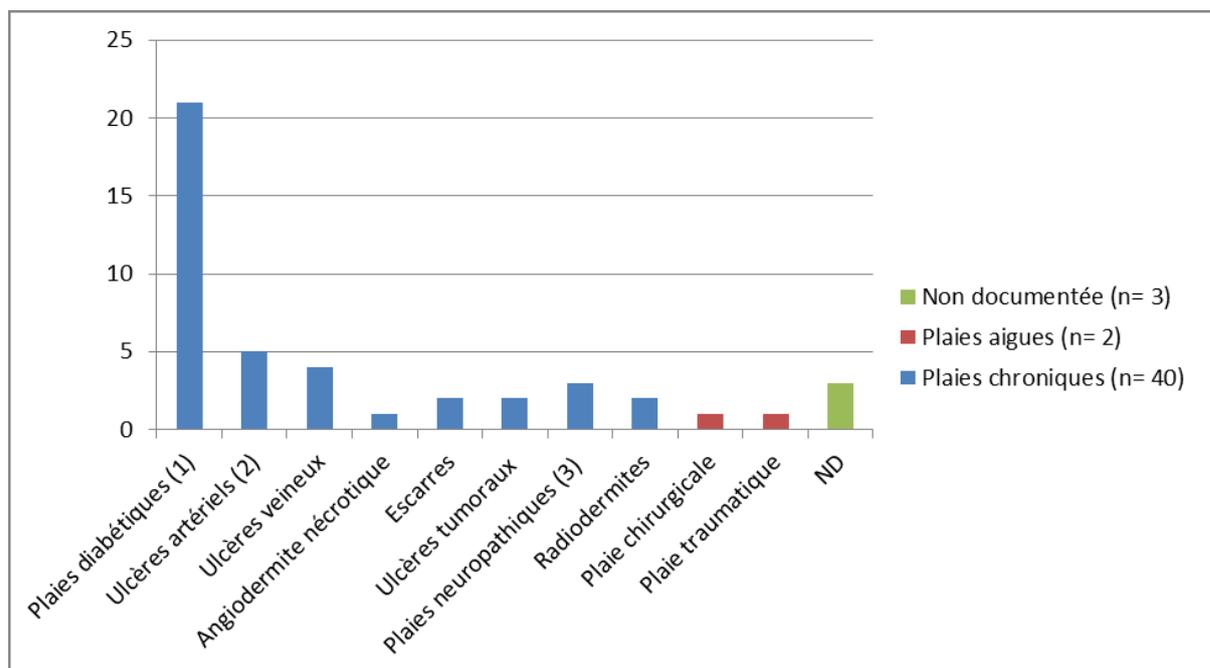
Sur 46 souches, 45 ont été isolées à partir de lésions cutanées superficielles ou profondes. L'origine de trois de ces lésions n'était pas documentée.

Parmi les souches isolées au niveau de lésions cutanées dont l'origine était connue, 40 (40/42, soit 95 %) ont été retrouvées au niveau de plaies chroniques (≥ 4 à 6 semaines d'évolution), dont 34 (34/42, soit 81 %) au niveau de plaies chroniques des membres inférieurs. Il s'agissait principalement de plaies chez le diabétique (21/42, soit 50 %) et d'ulcères vasculaires (10/42, soit 24 %).

Seules deux souches (2/42, soit 5 %) ont été isolées à partir de plaies aiguës (< 4 semaines d'évolution).

Le patient chez qui *H. kunzii* a été retrouvé dans un flacon d'hémoculture présentait des ulcères artériels au niveau des pieds.

Figure 7 : Types de plaies hébergeant *H. kunzii*



- (1) : Plaies diabétiques ischémiques et/ou neuropathiques
(2) : Ulcères artériels chez des patients non diabétiques
(3) : Plaies neuropathiques d'origine non diabétique

1.4. Incidence dans les plaies diabétiques

L'incidence d'*H. kunzii* dans les prélèvements de plaies diabétiques reçus au laboratoire du CH de Cahors entre janvier 2008 et octobre 2013 était de 1,9 % (10 prélèvements avec *H. kunzii* pour 529 prélèvements traités). Ces chiffres ont été extraits du système informatique du laboratoire¹.

1.5. Abondance des colonies

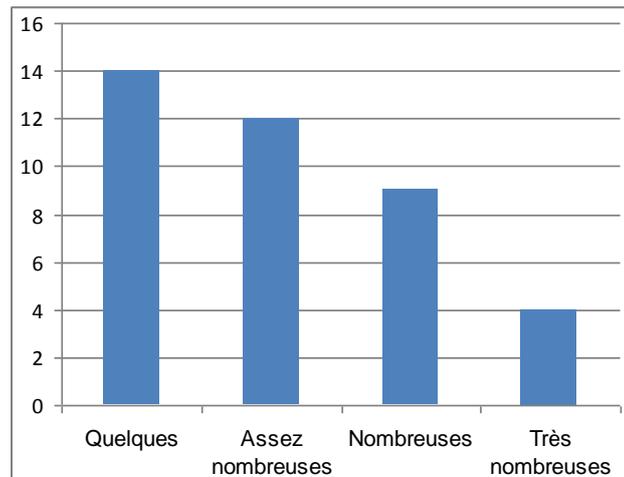
A partir des dossiers microbiologiques, nous avons recueilli l'abondance des colonies sur la géloseensemencée initialement². (Figure 8)

Cette quantification était une appréciation très sommaire du nombre de colonies.

¹ 3 souches issues de plaies diabétiques mais non enregistrées en tant que telles dans le SIL ne comptent donc pas dans ces chiffres.

² Abondance non documentée pour 7 prélèvements

Figure 8 : Quantification des colonies d'*H. kunzii*



2. DONNÉES DÉMOGRAPHIQUES

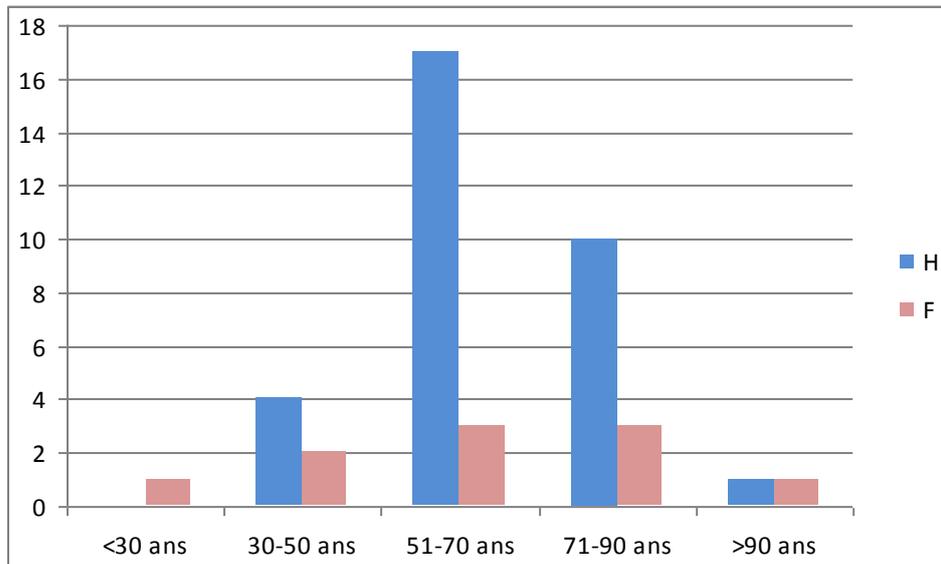
La moyenne d'âge des patients était de 66 ans. Le plus jeune était une femme de 21 ans présentant des troubles de la statique et de la sensibilité de son pied gauche suite à un accident de la voie publique. Le plus âgé était aussi une femme de 102 ans adressée pour une ischémie critique.

A noter que 35 patients (83%) avaient plus de 50 ans.

Sur 42 patients, 32 (soit 76 %) étaient des hommes et 10 (24 %) étaient des femmes (Figure 9), ce qui faisait un sex-ratio H/F d'environ 3. Parmi les 22 cas de la littérature, il y avait 15 hommes pour 7 femmes, soit un sex-ratio H/F d'environ 2. Mais tous ces chiffres sont à considérer avec précaution étant donné le faible nombre de cas. Le diabète et l'AOMI ayant des sex-ratios proches de 1 n'influencent pas la répartition des sexes d'*H. kunzii* (50–52). Par contre, les femmes vivent légèrement plus longtemps en meilleure santé que les hommes (63,5 ans vs 61,8 ans d'après l'Insee en 2010).

http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=98&ref_id=CMPECF02228%C2

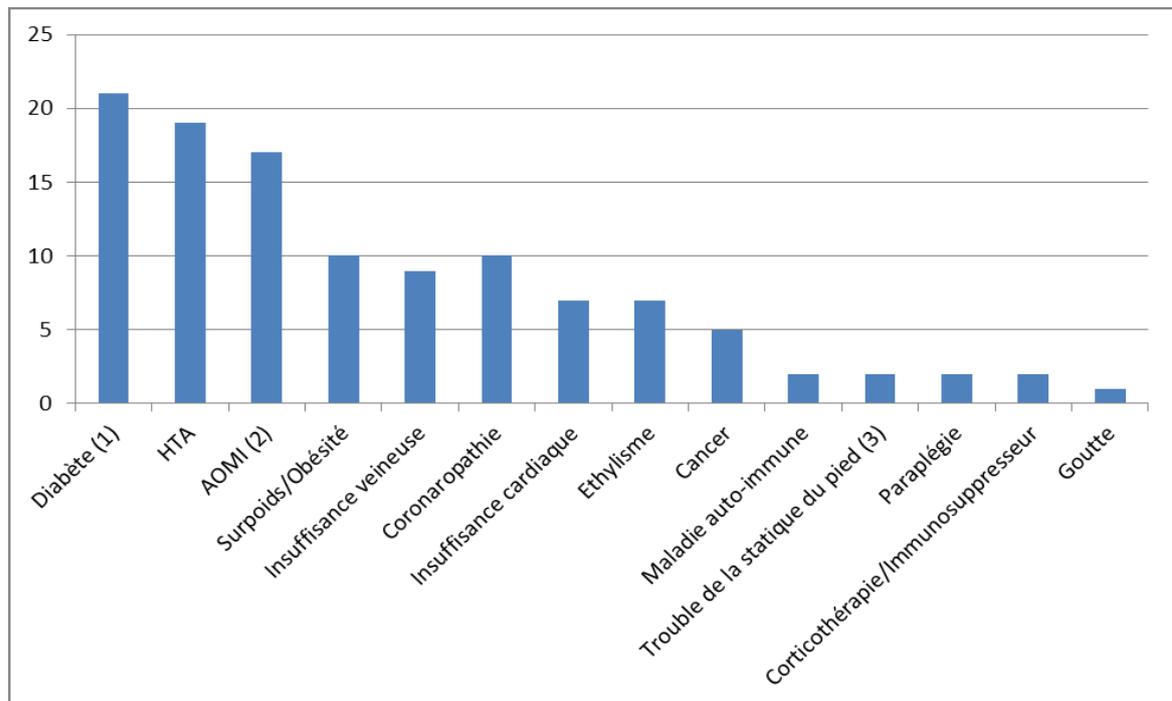
Figure 9 : Répartition par classe d'âge et par sexe des 42 patients inclus



3. COMORBIDITÉS

Tous les patients avaient au moins une comorbidité, voire souvent plusieurs (Figure 10). Les conditions sous-jacentes les plus fréquemment présentes étaient le diabète (n = 21/42, soit la moitié des patients), l'HTA (n = 19/42, soit 45 %), l'AOMI (n = 17/42, soit 40 %), le surpoids (n = 10/42, soit 24 %) et l'insuffisance veineuse chronique (n = 9/42, soit un peu plus de 20 %). S'agissant de patients aux nombreux facteurs de risques cardio-vasculaires, beaucoup souffraient d'atteintes cardiaques (coronaropathie et/ou insuffisance cardiaque). Les facteurs prédisposants plus rarement rencontrés étaient l'éthylisme, une pathologie cancéreuse, une maladie auto-immune, un trouble de la statique du pied (origine autre que diabétique), une paraplégie (alitement prolongé), un traitement immuno-suppresseur et la goutte tophacée.

Figure 10 : Comorbidités des 42 patients inclus



- (1) Parmi les 21 diabétiques, une neuropathie périphérique est mentionnée chez 10 d'entre eux ;
- (2) Parmi les 17 AOMI, 10 sont des artériopathies diabétiques ;
- (3) Trouble de la statique du pied d'origine autre que diabétique ;

➤ **Etat trophique des membres inférieurs**

Trente patients présentaient des troubles trophiques des membres inférieurs, dont 10 avec une histoire d'amputation. « Un bon état podologique » était noté dans le dossier d'un seul patient (pour qui *H. kunzii* avait été isolé dans un abcès de la fesse).

Chez 11 patients, l'état podologique n'était pas documenté (en particulier quand *H. kunzii* était isolé hors des membres inférieurs).

Tableau 19 : Tableau récapitulatif de la démographie et conditions sous-jacentes des 42 patients

| Démographie et conditions sous-jacentes | Nb de patients (%) |
|--|---------------------------|
| Sexe | |
| Homme | 32 (76%) |
| Femme | 10 (24%) |
| Age (moyenne et intervalle) | 66 (21-102) |
| Troubles trophiques des membres inférieurs | 30 (71%) |
| Conditions sous-jacentes | |
| Diabète | 21 (50%) |
| HTA | 19 (45%) |
| AOMI | 17 (40%) |
| Cardiopathie | 17 (40%) |
| Surpoids/Obésité | 10 (24%) |
| Insuffisance veineuse | 9 (21%) |
| Ethylisme | 7 (17%) |
| Cancer | 5 (12%) |
| Maladie auto-immune | 2 (5%) |
| Paraplégie | 2 (5%) |
| Corticothérapie/Immunosuppresseur | 2 (5%) |

4. IDENTIFICATION D’H. KUNZII

4.1. Identification phénotypique

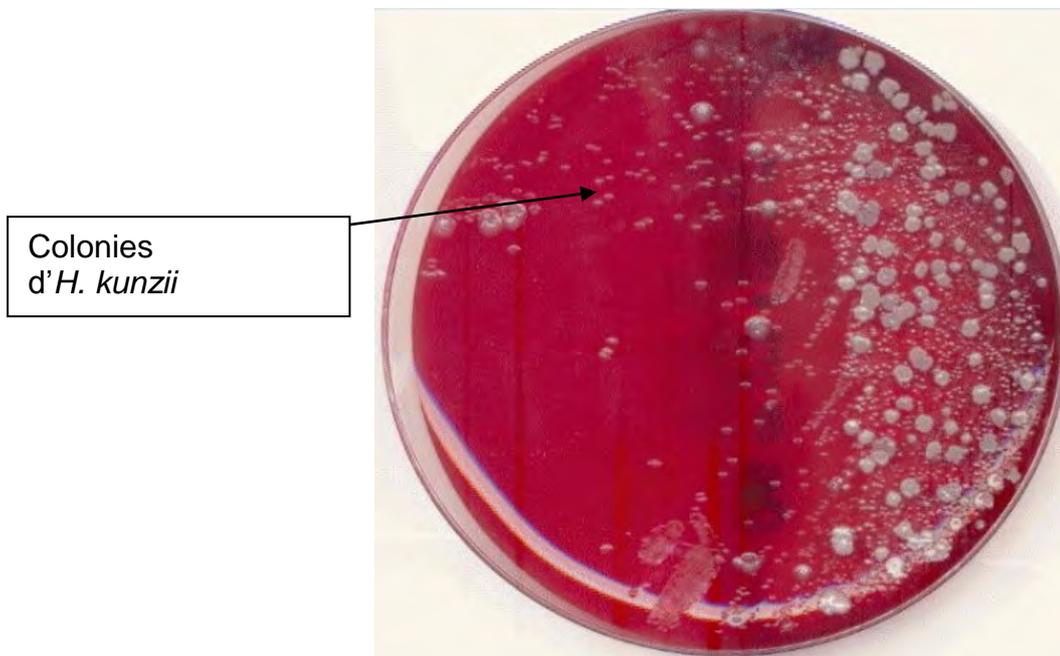
4.1.1. Aspect des colonies et coloration de Gram

Après 24 heures d’incubation sous 9 % de CO₂, les colonies sont minuscules, de la taille d’une tête d’épingle, grisâtres, non hémolytiques. Après 48 heures, les colonies deviennent un peu plus grosses (≈ 0,5 mm), légèrement alpha-hémolytiques. (Figure 16)

A la coloration de Gram, on observe de gros (voire très gros) cocci d’aspect polymorphe, à Gram positif, parfois décolorés, isolés, en diplocoques, en tétrades ou en petits amas irréguliers. (Figure 17)

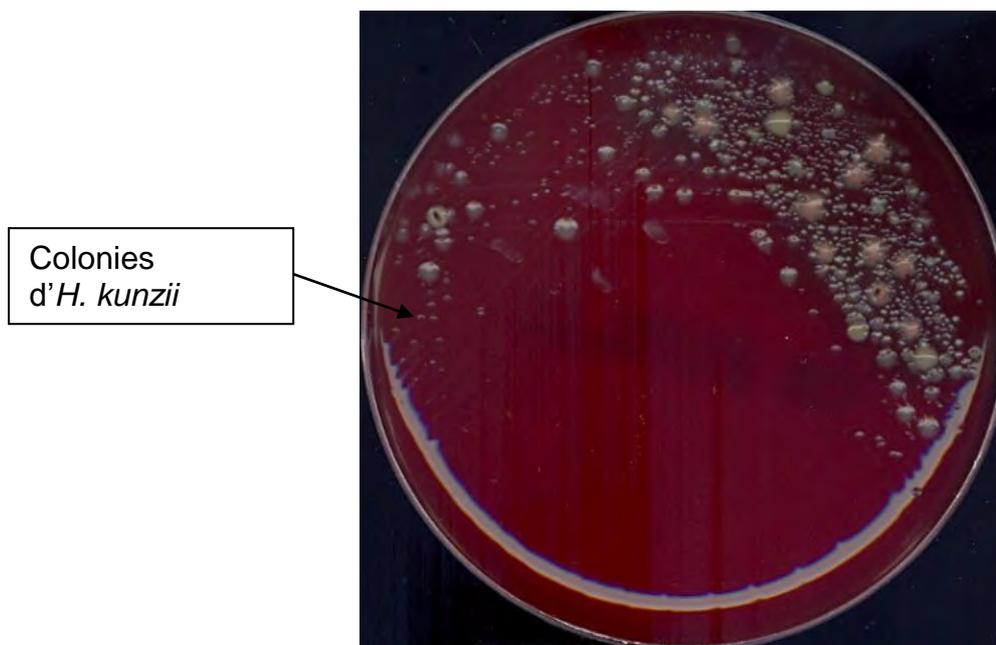
Les réactions de catalase et d’oxydase sont négatives.

Figure 11 : Gélose ANC après 72 h d'incubation, isolat du patient 8 (+ *S. aureus*, *K. oxycota*, *Enterococcus sp.*).



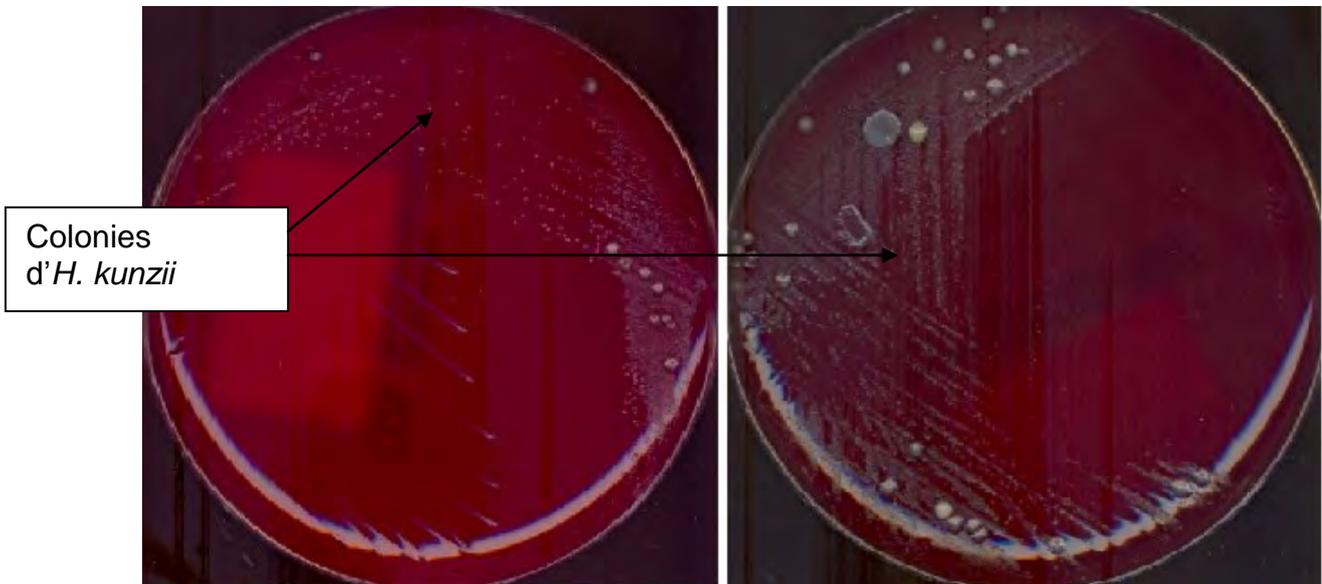
Source : CH Cahors

Figure 12 : Gélose ANC après 72 h d'incubation, isolat du patient 17 (+*Enterococcus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *K. oxycota*, *Corynebacterium sp.*)



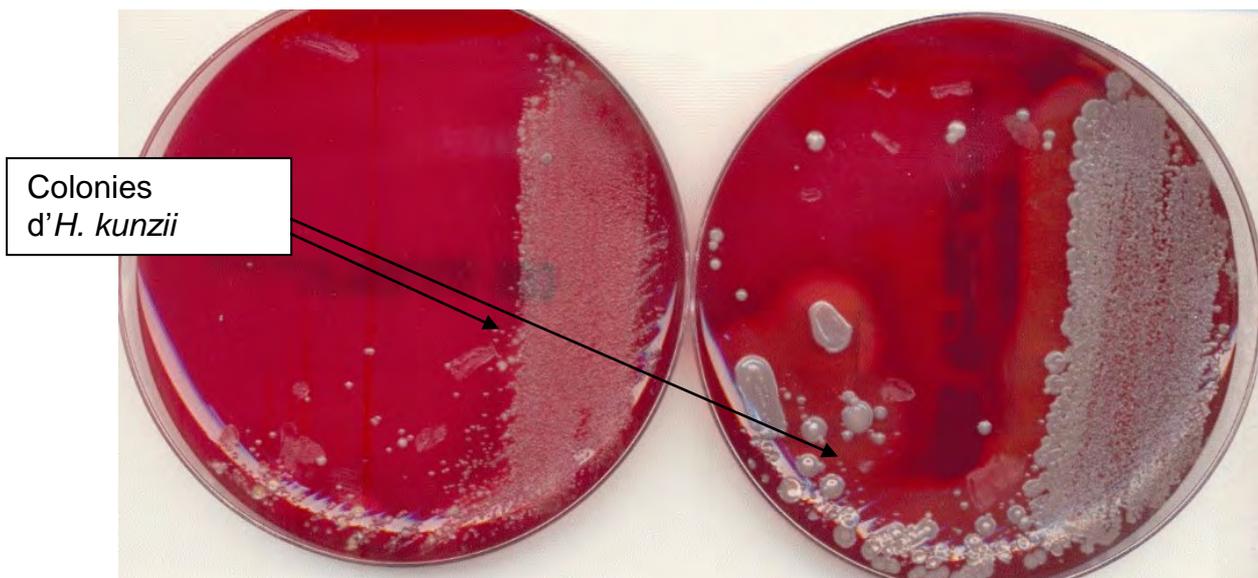
Source : CH Cahors

Figure 13 : Gélose COS après 4 jours d'incubation en anaérobiose (gauche) et en aérobiose (droite), isolat du patient 17 (+ *Enterococcus sp.*, SCN)



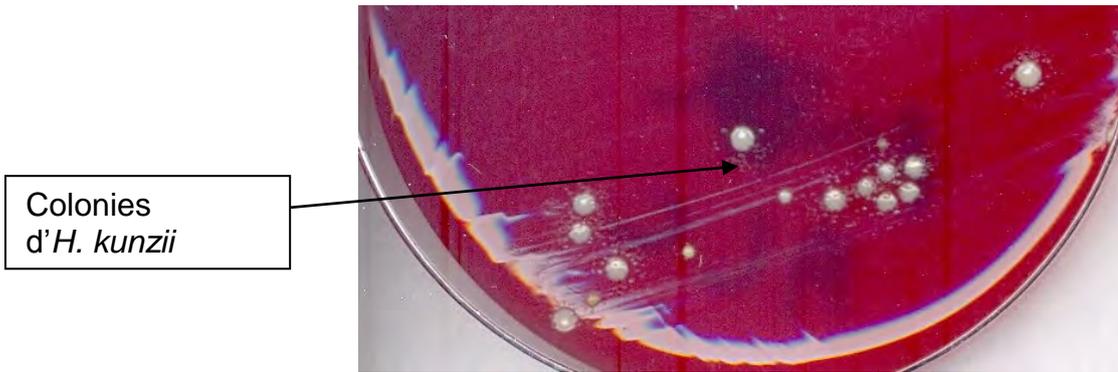
Source : CH Cahors

Figure 14 : Gélose COS après 72 h d'incubation en anaérobiose (gauche) et en aérobiose (droite), isolat du patient 4 (+ *S. aureus*)



Source : CH Cahors

Figure 15 : Gélose ANC (72 h d'incubation), satellitisme autour d'une souche de SCN (isolat du patient 13)



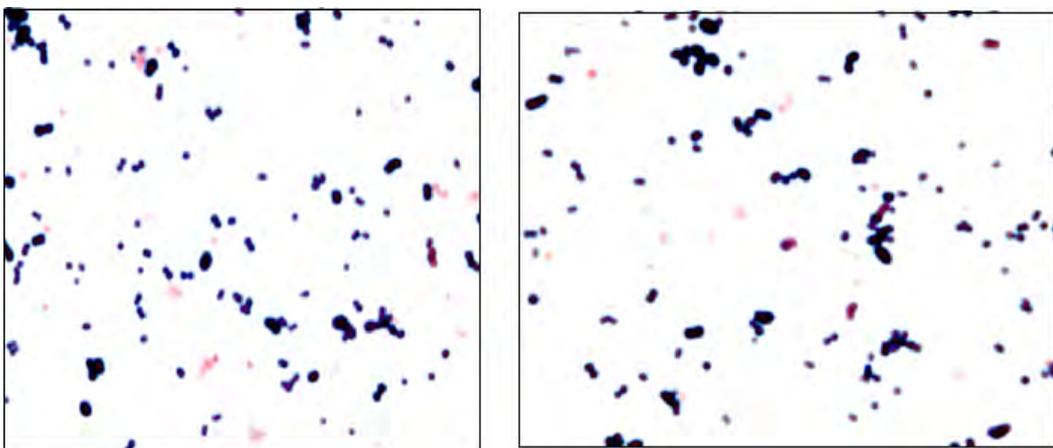
Source : CH Cahors

Figure 16 : Réisolement sur COS (48 h d'incubation), isolat du patient 20



Source : CH Cahors

Figure 17 : Coloration de Gram, isolat du patient 17 (grossissement x100)



Source : CH Cahors

4.1.2. Identification par l'automate Vitek 2 (bioMérieux)

Les caractères biochimiques de la carte ID-GP de l'automate Vitek 2 ont été recueillis pour 40 isolats, ainsi que pour la souche de référence DSM 10548.

- 39 souches (39/41, soit 95%) ont été identifiées correctement au niveau de l'espèce avec un pourcentage de probabilité entre 93% et 99%. Le profil biochimique le plus fréquemment obtenu (19/41 souches) est 020112100000000, ce qui correspond, parmi les 43 caractères étudiés, aux 5 tests suivants positifs : leucine arylamidase, alanine arylamidase, β -galactopyranosidase, β -galactosidase et L-pyrrolidonyl-arylamidase.
- 2 souches n'ont pas pu être identifiées correctement par le Vitek 2 :
 - Pour une souche, il rendait « low discrimination » et proposait « *Helcococcus kunzii* » ou « *Erysipelothrix rhusiopathiae* » avec le code 020102100000000, ce qui correspondait aux caractères suivants positifs : alanine arylamidase, β -galactopyranosidase, β -galactosidase, L-pyrrolidonyl-arylamidase. Cette souche n'exprimait pas la leucine arylamidase, un caractère habituellement positif chez *H. kunzii*. Le même profil a été obtenu lors d'un second essai.
 - La souche de référence a été identifiée « *Alloiococcus otitis* », très bonne identification, avec 95% probabilité, code 000102100000000. Le même profil a été obtenu lors d'un second essai. Les 3 caractères suivants étaient positifs : alanine arylamidase, β -galactopyranosidase, L-pyrrolidonyl-arylamidase. La souche n'exprimait pas deux caractères habituellement positifs chez les souches *H. kunzii* analysées par le Vitek 2 : la leucine arylamidase et la β -galactosidase.
A noter que dans l'article de Collins de description initiale de l'espèce *H. kunzii* (1), ces 2 caractères ne sont pas exprimés.

Le Tableau 20 synthétise les caractères biochimiques obtenus avec la carte colorimétrique ID-GP Vitek 2 (version 05.04).

Tableau 20 : Caractères Vitek 2 obtenus sur 40 souches d'*H. kunzii* et sur la souche de référence DSM 10548

| Tests carte ID-GP (Vitek 2) | | Souche de référence | Nb de souches +/40 | Résultats ¹ |
|--------------------------------------|-------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| D-amygdaline | AMY | - | 11 | V |
| Ala-Phe-Pro- arylamidase | APPA | - | 0 | - |
| Leucine arylamidase | LeuA | - | 35 | + |
| Alanine arylamidase | AlaA | + | 40 | + |
| D-ribose | dRIB | - | 0 | - |
| Novobiocin resistance | NOVO | - | 3 | - |
| D-raffinose | dRAF | - | 0 | - |
| Optochin resistance | OPTO | - | 3 | - |
| Phosphatidylinositol phospholipase C | PIPCL | - | 0 | - |
| Cyclodextrin | CDEX | - | 0 | - |
| L-proline arylamidase | ProA | - | 0 | - |
| Tyrosine arylamidase | TyrA | - | 4 | - |
| L-lactate alcalinisation | ILATk | - | 0 | - |
| Growth in 6,5% NaCl | NC6,5 | - | 0 | - |
| O/129 resistance | 0129R | - | 0 | - |
| D-xylose | dXYL | - | 0 | - |
| L-aspartate arylamidase | AspA | - | 0 | - |
| Beta-glucuronidase | BGURr | - | 0 | - |
| D-sorbitol | dSOR | - | 0 | - |
| Lactose | LAC | - | 4 | - |
| D-mannitol | dMAN | - | 0 | - |
| Silicin | SAL | - | 5 | - |
| Arginine dihydrolase 1 | ADH1 | - | 0 | - |
| Beta-galactopyranosidase | BGAR | + | 40 | + |
| Alpha-galactosidase | AGAL | - | 0 | - |
| Urease | URE | - | 0 | - |
| N-acetyl-D-glucosamine | NAG | - | 3 | - |
| D-mannose | dMNE | - | 12 | V |
| Saccharose/sucrose | SAC | - | 4 | - |
| Beta-galactosidase | BGAL | - | 39 | + |
| Alpha-mannosidase | AMAN | - | 0 | - |
| L-pyrrolidonyl-arylamidase | PyrA | + | 39 | + |
| Polymixin B resistance | POLYB | - | 0 | - |
| D-maltose | dMAL | - | 4 | - |
| Methyl-B-D-glucofuranoside | MBDG | - | 5 | - |
| D-trehalose | dTRE | - | 3 | - |
| Alpha-glucosidase | AGLU | - | 0 | - |
| Phosphatase | PHOS | - | 0 | - |
| Beta-glucuronidase | BGURr | - | 0 | - |
| D-galactose | dGAL | - | 3 | - |
| Bacitracin resistance | BACI | - | 0 | - |
| Pullulan | PUL | - | 0 | - |
| Arginine dihydrolase 2 | ADH2s | - | 0 | - |

¹ : test + ≥ 35 isolats positifs pour le test (soit ≥ 87,5 %) ; test - ≤ 5 isolats positifs pour le test (soit ≤ 12,5%) ; test Variable (V) : 6-34 isolats positifs pour le test.

4.1.3. Identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Les 41 souches analysées ont été testées à 2 reprises chacune avec le système Microflex LT de Bruker Daltonics (logiciel Biotyper v.3.0). Les 82 passages ont tous rendu une identification correcte au niveau de l'espèce, avec un score compris entre 2,01 et 2,492. Le score médian obtenu était 2,312. Pour 90% des passages, le score était >2,214.

La différence moyenne des scores obtenus lors de 2 passages successifs de chacune des 41 souches était de 0,047 (différence minimale : 0 ; différence maximale : 0,174).

4.2. Identification moléculaire

Le séquençage des gènes *rrs* (ARNr 16S) ou *sodA* a permis d'identifier de façon certaine les souches au niveau de l'espèce. Le séquençage du gène *rrs* a montré de 98 % à 100 % d'homologie avec la séquence de la souche type, selon les souches analysées. Quant au séquençage du gène *sodA*, il a montré pour tous les isolats 100 % d'homologie avec la séquence de la souche type.

5. MANIFESTATIONS CLINIQUES

Les Tableau 21, Tableau 22, Tableau 23, et Tableau 24 mentionnent les données clinico-biologiques associées à chaque isolat.

Tableau 21 : Données clinico-biologiques (patients 1 à 11)

| Patient | Présentation clinique ^A | Classification de l'infection | Grade ^B | Biologie ^C | | Abondance ^D <i>H. kunzii</i> | Co-isolats ^E |
|---------|--|-------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------|--|---|
| | | | | CRP | PNN (G/l) | | |
| 1 | Ulcère artériel en regard M4 D, fibrineux, contact osseux | Ostéite | 3 | 29 | 3.61 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-sensible (tnb), SCN (rr) |
| 2 | Récidive ostéo-arthrite MTP2 D au décours de l'arrêt de la ciprofloxacine et de la ceftazidime, (douleur, écoulement, pertuis, signes radio ostéo-arthrite chronique MTP2, épanchements contiguës) | Ostéo-arthrite | 3 | 28 | 3.23 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-sensible (anb), <i>P. aeruginosa</i> (rr) |
| 3 | Plaie bord externe pied G avec contact osseux (signes radio ostéite M5 G) | Ostéite | 3 | 55 | 6.14 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-résistant (nb), <i>Corynebacterium sp.</i> (qq) |
| 4 | Dermite ocre bilatérale, ulcères bilatéraux, très fibrineux, d'odeur nauséabonde + Cholécystite abcédée sur TDM (bactério: <i>P. vulgaris</i> , entérocoques) | Colonisation | 1 | 164 | 9.6 | ANB | <i>S. aureus</i> méti sensible (nb) |
| 5 | Plaie bord externe du 1er orteil D, nécrotique, d'allure artérielle (radio : pas d'ostéite) | Colonisation | 1 | <5 | 8.34 | ANB | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb), <i>Prevotella sp.</i> (qq), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (qq) , <i>Bacteroides sp.</i> (rr), <i>Corynebacterium sp.</i> (nb) |
| 6 | Mal perforant plantaire 1er rayon D avec berge hyperkératosique, contact osseux et écoulement sanguinolent malodorant | Ostéite | 3 | ND | ND | QQ | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb), <i>K. oxytoca</i> (anb), <i>P. vulgaris</i> (rr), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (qq), <i>Corynebacterium sp.</i> (anb) |
| 7 | Mal perforant 2° orteil G face dorsale, (pas de signe infectieux) | Colonisation | 1 | 40 | 4.8 | QQ | <i>Enterococcus sp.</i> (nb), <i>K. oxytoca</i> (anb), SCN(nb), <i>Corynebacterium sp.</i> (nb) |
| 8 | Ulcères des 4 malléoles, creusants, nécrotiques, fibrineux, douloureux, signes infectieux locaux | Infection superficielle | 2 | ND | ND | TNB | <i>S. aureus</i> méti-sensible (qq), <i>K. oxytoca</i> (anb), <i>Enterococcus sp.</i> (anb) |
| 9 | Plaie talon G, malodorante, hyperkératosique, signes infectieux locaux , pertuis, contact osseux | Ostéite | 3 | ND | ND | QQ | <i>E. coli</i> (qq), <i>K. oxytoca</i> (anb), <i>S. aureus</i> méti-sensible (anb), <i>Bacteroides sp.</i> (nb), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (nb), <i>Corynebacterium sp.</i> (anb) |
| 10 | Mal perforant 1er orteil D, signes infectieux locaux (TDM: pas d'ostéite) | Infection superficielle | 2 | ND | ND | QQ | <i>P. aeruginosa</i> (nb), SCN (nb) |
| 11 | Plaie inflammatoire de toute la pulpe du gros orteil D, contact osseux (tête P2 à nu) -> mise à plat au bloc (résection phalange, exérèse ongle, lambeau) | Ostéite | 3 | ND | ND | QQ | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb), <i>Enterococcus sp.</i> (qq), <i>E. cloacae</i> (anb), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (qq), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (nb) |

^A : D : Droit ; G : Gauche ; M : Os métatarsien ; MTP : Articulation métatarso-phalangienne ; TDM : Tomodensitométrie ; P2 : 2^{ème} phalange ; ^B : Grade d'infection des plaies des pieds selon le consensus international sur le pied diabétique (IWGDF 2003, Spilf 2007, IDSA 2007) ; ^C : PNN : Nombre de polynucléaires neutrophiles ; ND : Non déterminé ; ^D : QQ : Quelques colonies ; ANB : Assez nombreuses colonies ; NB : Nombreuses colonies ; TNB : Très nombreuses colonies ; ^E : SCN : staphylocoque à coagulase négative

Tableau 22 : Données clinico-biologiques (patients 12 à 21)

| Patient | Présentation clinique ^A | Classification de l'infection | Grade ^B | Biologie | | Abondance ^D <i>H. kunzii</i> | Co-isolats ^E |
|-----------------|---|---|--------------------|-----------|------------------------|--|---|
| | | | | CRP | PNN (G/l) ^C | | |
| 12 | Ischémie critique-> gangrène purulente du 2 ^o orteil D s'étendant vers l'avant-pied -> 7 j après : persistance de la collection purulente profonde -> amputation transmétatarsienne des 5 rayons D | Gangrène humide | 3 | 35 | 12.13 | TNB | <i>E. coli</i> (tnb), <i>Bacteroides sp</i> (nb), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (nb), <i>Acinetobacter radioresistens</i> (qq) |
| 13 | Surinfection d'une plaie suturée 72h avant : phlyctène nécrotico-hémorragique, écoulement sanguinolent, signes infectieux remontant jusqu'à mi-cuisse, fièvre (39.1) | Dermo-hypodermite nécrosante | 3 | 221 | 11.41 | ANB | <i>Bacillus cereus</i> (anb) |
| 14 | Volumineux abcès de la fesse D ("taille d'un petit melon"), très inflammatoire, sous tension, très douloureux, avec nécrose cutanée de 4cm de diamètre et cellulite | Abcès profond | NA | 277 | 18.76 | NB | <i>Porphyromonas sp.</i> (tnb), <i>Bacteroides sp</i> (rr), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (anb) |
| 15 | Volumineuse tumeur épaule G (12x13cm) évoluant depuis > 6mois, ulcéro- nécrotique, purulente, écoulement séro-sanglant-> exérèse-> mélanome nodulaire métastatique | Infection superficielle | NA | 137 | 15.3 | ND | <i>P. mirabilis</i> (nb), <i>Bacteroides sp.</i> (anb), <i>Corynebacterium sp.</i> , SCN |
| 16 | Plaie en regard tête M2 G qui est en appui anormal, hyperkératosique, non inflammatoire, TDM : pas de signe d'ostéite | Colonisation | 1 | 12 | 7.6 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-sensible (rr), <i>E. coli</i> (nb), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (nb) |
| 17 ¹ | Nécrose cutanée purulente en regard MTP 1er orteil G, trajet fistuleux, ostéo- arthrite MTP, érysipèle -> amputation transmétatarsienne des 5 rayons G | Ostéoarthrite | 3 | 182 ND | ND ND | ANB TNB (liquide de drainage) | <i>Enterococcus sp.</i> (nb), <i>Alcaligenes sp.</i> (anb), <i>K. oxycota</i> (rr), <i>Corynebacterium sp.</i> (qq) <i>Enterococcus sp</i> (rr), SCN |
| 18 | Surinfection escarre sacrée, pertuis, écoulement malodorant | Infection superficielle | NA | 23 | 14.41 | NB | <i>P. aeruginosa</i> (nb), <i>E. coli</i> (nb), <i>Actinobacillus sp.</i> (nb), SCN (nb) |
| 19 | Surinfection mal perforant plantaire en regard M3 et M4 D, pertuis avec contact osseux, érysipèle | Ostéite | 3 | 48 | 2.58 | ANB | <i>M. morgani</i> (nb), <i>P. aeruginosa</i> (nb), <i>S. aureus</i> méti-sensible(qq), <i>S. agalactiae</i> (anb), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (anb) |
| 20 | Angiodermite nécrosante active mollet D, ulcère très douloureux, fibrineux | Colonisation | 1 | 74 | 6.5 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-résistant (tnb), <i>Enterococcus sp</i> .(anb), <i>E. coli</i> (anb) |
| 21 | Sepsis sévère sur escarre trochantérienne G, communiquant avec escarre sacrée -> plaies nécrotiques, nauséabondes ; fièvre (40.5), hypotension, tachycardie | Sepsis sévère sur infection escarre sacrée | NA | 329 | 9.5 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-résistant (anb), <i>E. coli</i> (qq), <i>Corynebacterium sp.</i> (anb) Hémoculture : <i>E. coli</i> (profil identique à escarre) |

^A : D : Droit ; G : Gauche ; M : Os métatarsien ; MTP : Articulation métatarso-phalangienne ; TDM : Tomodensitométrie ; P2 : 2^{ème} phalange ; ^B : Grade d'infection des plaies des pieds selon le consensus international sur le pied diabétique (IWGDF 2003, Spilf 2007, IDSA 2007) ; NA : non applicable aux infections qui ne concernent pas le membre inférieur ^C : PNN : Nombre de polynucléaires neutrophiles ; ND : Non déterminé ; ^D : QQ : Quelques colonies ; ANB : Assez nombreuses colonies ; NB : Nombreuses colonies ; TNB : Très nombreuses colonies ; ^E : SCN : staphylocoque à coagulase négative

¹ : Isolot n°17 : *H. kunzii* a été isolé dans 2 prélèvements au cours de la même hospitalisation à 4 jours d'intervalle. Seul l'isolat du liquide de drainage a été conservé.

Tableau 23 : Données clinico-biologiques (patients 22 à 30)

| Patient | Présentation clinique ^A | Classification de l'infection | Grade ^B | Biologie | | Abondance ^D <i>H. kunzii</i> | Co-isolats ^E |
|-----------------|---|---|--------------------|----------|------------------------|--|--|
| | | | | CRP | PNN (G/l) ^C | | |
| | Mal perforant plantaire pied D, inflammatoire, avec pertuis et contact osseux (signe ostéite à la radio) | Ostéite | 3 | 172 | 7.53 | ANB | <i>S. agalactiae</i> (nb), <i>Citrobacter koseri</i> (rr), <i>Corynebacterium sp.</i> (qq) |
| 22 ¹ | Mal perforant pied D en voie de cicatrisation, mais pied de plus en plus déformé | Colonisation | 1 | 72 | 5.67 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb), <i>E. coli</i> (rr), <i>Corynebacterium sp.</i> (qq) |
| | Récidive surinfection mal perforant pied D: agrandissement de la plaie, écoulement verdâtre nauséabond, décollement sous-cutané | Infection superficielle | 2 | ND | ND | NB | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb) , <i>P. aeruginosa</i> (rr), <i>Peptostreptococcus sp.</i> (nb) |
| 23 | Erysipèle jambe G, ulcère malléole externe G, nécrotique, écoulement | Infection superficielle | 2 | 38 | 10.8 | NB | <i>Acinetobacter ursingii</i> (nb), <i>Corynebacterium sp.</i> |
| 24 | Ischémie critique : gangrène sèche 3 ^o orteil G -> angioplastie et amputation 3 ^o orteil | Colonisation | 1 | 39 | 7,63 | NB | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (qq) , <i>Citrobacter freundii</i> (qq) |
| 25 | Choc septique avec défaillance multi-organes sur infection d'ulcères des pieds | Choc septique sur infection ulcères pieds | 4 | 114 | 19 | ND | Hémoculture : <i>S. aureus</i> méti-sensible, <i>Proteus sp.</i> , <i>Providencia sp.</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| 26 | Abcès pied D, érythème chaud, douloureux | Infection superficielle | 2 | 15 | 4,5 | ANB | <i>Citrobacter koseri</i> (tnb), <i>Fusobacterium nucleatum</i> (nb), <i>Prevotella</i> (nb) |
| 27 | Ulcères nécrotiques pieds D et G (<i>H. kunzii</i> à D et G) | Infection superficielle | 2 | 30 | ND | NB | <i>S. aureus</i> , <i>E. cloacae</i> |
| 28 | Gangrène humide des 3 derniers rayons du pied D -> amputation transmétatarsienne des 3-4-5 ^o orteils | Gangrène humide | 3 | 155 | 19,49 | ND | <i>S. agalactiae</i> |
| 29 | Carcinome épidermoïde pré-tragien gauche avec envahissement du conduit auditif, rétro-auriculaire et nodules de perméation | Colonisation conduit auditif | NA | 80 | 9,19 | ND | <i>S. aureus</i> , flore anaérobie mixte |
| 30 | Sepsis sur mal perforant | Sepsis sur infection mal perforant | 4 | 290 | 23 | ANB | <i>S. aureus</i> (tnb) Hémocultures 6/8+: <i>S. aureus</i> |

^A : D : Droit ; G : Gauche ; M : Os métatarsien ; MTP : Articulation métatarso-phalangienne ; TDM : Tomodensitométrie ; P2 : 2^{ème} phalange ; ^B : Grade d'infection des plaies des pieds selon le consensus international sur le pied diabétique (IWGDF 2003, Spilf 2007, IDSA 2007) ; NA : non applicable aux infections qui ne concernent pas le membre inférieur ^C : PNN : Nombre de polynucléaires neutrophiles ; ND : Non déterminé ; ^D : QQ : Quelques colonies ; ANB : Assez nombreuses colonies ; NB : Nombreuses colonies ; TNB : Très nombreuses colonies ; ^E : SCN : staphylocoque à coagulase négative

¹ : Trois isolats chez le même patient à quelques mois d'intervalle.

Tableau 24 : Données clinico-biologiques (patients 31 à 42)

| Patient | Présentation clinique ^A | Classification de l'infection | Grade ^B | Biologie | | Abondance ^D <i>H. kunzii</i> | Co-isolats ^E |
|-----------------|---|-------------------------------|--------------------|----------|------------------------|--|--|
| | | | | CRP | PNN (G/l) ^C | | |
| 31 | Infection suite à amputation tête du M5 | Ostéite | 3 | ND | ND | TNB | Aucun |
| 32 | Arthrite septique de la hanche G et ostéite du grand trochanter | Ostéo-arthrite hanche | NA | 158 | 10,92 | ND | <i>S. aureus</i> , <i>S. dysgalactiae</i> |
| 33 ¹ | Infection ulcère artériel | Infection superficielle | 2 | ND | ND | ND | ND |
| 34 ² | Plaie face plantaire 1er orteil, contact osseux, inflammation du dos du pied, radio: ostéolyse P1 du 1er orteil | Ostéite | 3 | 100 | ND | ANB | <i>S. agalactiae</i> (tnb) |
| | Amputation le 20/07/2009 du 1er orteil | | | ND | ND | ANB | Enterococcus sp.(tnb) |
| 35 | Infection plaie 3°orteil G | Infection superficielle | 2 | ND | ND | QQ | <i>S. aureus</i> méti-résistant (anb), SCN (qq) |
| 36 | Infection ulcère veineux | Infection superficielle | 2 | ND | ND | ANB | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb), <i>Corynebacterium sp.</i> (qq) <i>Porphyromonas sp.</i> (anb) |
| 37 | Infection plaie chirurgicale | Infection superficielle | NA | ND | ND | ANB | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (anb) |
| 38 | Abcès pied G | Infection superficielle | 2 | 145 | 10 | NB | <i>S. aureus</i> méti-sensible (nb) |
| 39 | Infection d'ulcère inguinal D avec désunion de la cicatrice opératoire et 3 épisodes d'hémorragies aiguës de l'artère fémorale commune D (artérite radique) | Infection superficielle | NA | ND | ND | NB | <i>E. coli</i> (nb), <i>Streptococcus anginosus</i> (nb) |
| 40 | Infection mal perforant plantaire 1er orteil D, dermite ocre, varices | Infection superficielle | 2 | 172 | 10 | NB | <i>E. coli</i> (anb), <i>Acinetobacter sp.</i> (qq), <i>Corynebacterium sp.</i> (anb) |
| 41 ¹ | Mal perforant plantaire, contact osseux, signe infectieux locaux | Ostéite | 2 | ND | ND | ND | ND |
| 42 | Nécrose osseuse septique du 5 ° orteil G suite à une brûlure, fébricule -> amputation de l'orteil en urgence | Ostéo-arthrite MTP | 3 | 170 | 10.8 | QQ | <i>S. aureus</i> méti-sensible (anb) |

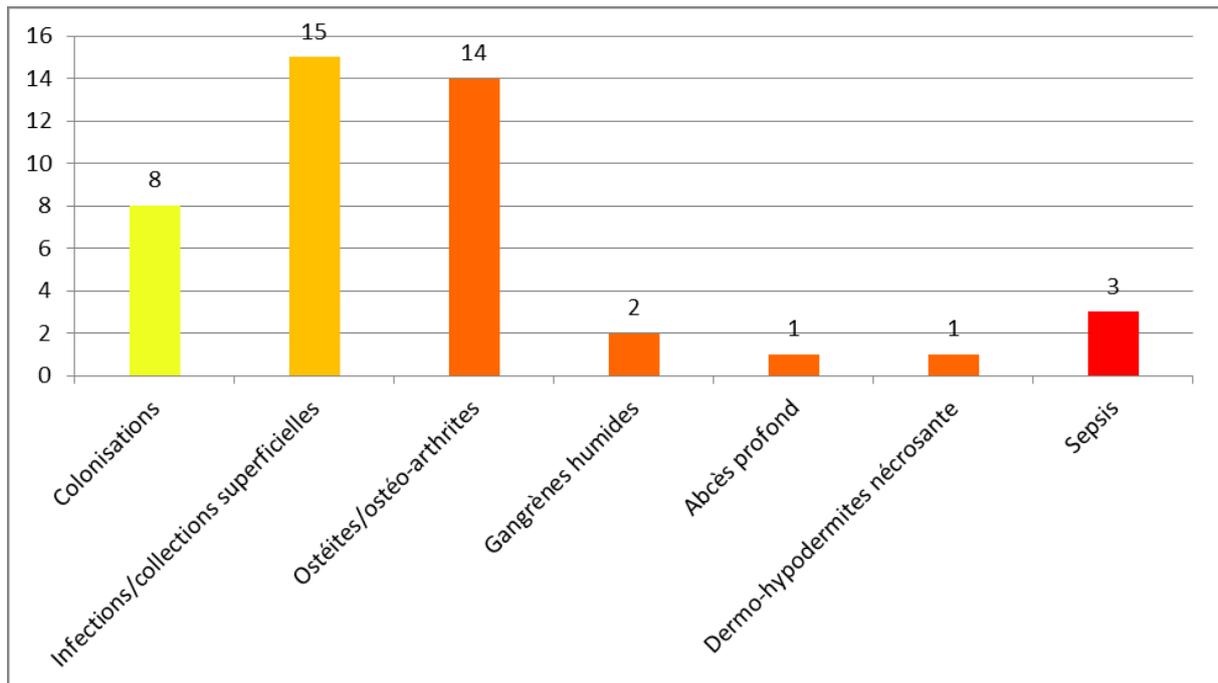
^A : D : Droit ; G : Gauche ; M : Os métatarsien ; ND : non documenté ; TDM : Tomodensitométrie ; P1 : 1^{ère} phalange ; ^B : Grade d'infection des plaies des pieds selon le consensus international sur le pied diabétique (IWGDF 2003, Spilf 2007, IDSA 2007) ; NA : non applicable aux infections qui ne concernent pas le membre inférieur ; ^C : PNN : Nombre de polynucléaires neutrophiles ; ND : Non déterminé ; ^D : QQ : Quelques colonies ; ANB : Assez nombreuses colonies ; NB : Nombreuses colonies ; TNB : Très nombreuses colonies ; ^E : SCN : *Staphylococcus coagulase négative*
¹ : Les isolats n° 31 et n°41 ont été envoyés au laboratoire de bactériologie du CHU de Toulouse pour identification ; ² : Isolats n°34 : *H. kunzii* a été isolé sur 2 prélèvements à 2 semaines d'intervalle, seul le premier isolat a été conservé.

Dans 36 cas³, des signes cliniques d'infection étaient présents au moment de l'isolement d'*H. kunzii*

- 15 infections ou collections superficielles
- 18 infections atteignant des structures sous-cutanées (14 ostéites et/ou ostéo-arthrites, 2 gangrènes humides, un abcès profond et une dermo-hypodermite nécrosante),
- 3 sepsis secondaires à l'infection d'une plaie (mais *H. kunzii* retrouvé dans les hémocultures dans un seul cas).

8 prélèvements ont été réalisés au niveau de plaies sans signe clinique d'infection, pour lesquelles le clinicien était confronté à un retard ou une absence de cicatrisation. (Figure 18)

Figure 18 : Présentation clinique au moment de l'isolement d'*H. kunzii*



³ L'isolement d'*H. kunzii* à plusieurs reprises chez un même patient au cours de la même hospitalisation étant considéré comme un seul cas.

6. MARQUEURS BIOLOGIQUES D'INFLAMMATION

A l'exception d'un cas, la CRP était toujours supérieure à 10 mg/L⁴. (Figure 19)

Une polynucléose neutrophile (PNN > 7,5 G/L) était présente dans 20 cas⁵. Elle était le plus souvent modérée. (Figure 20)

Figure 19 : Valeur de la CRP (mg/L) au moment de l'isolement d'*H. kunzii* (par tranche de 50 mg/L)

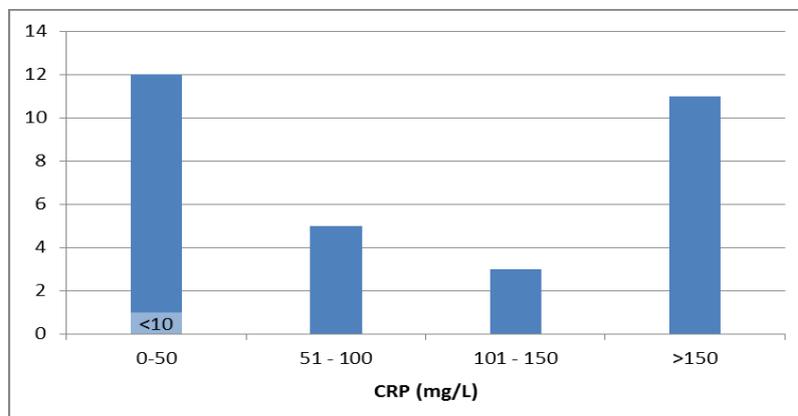
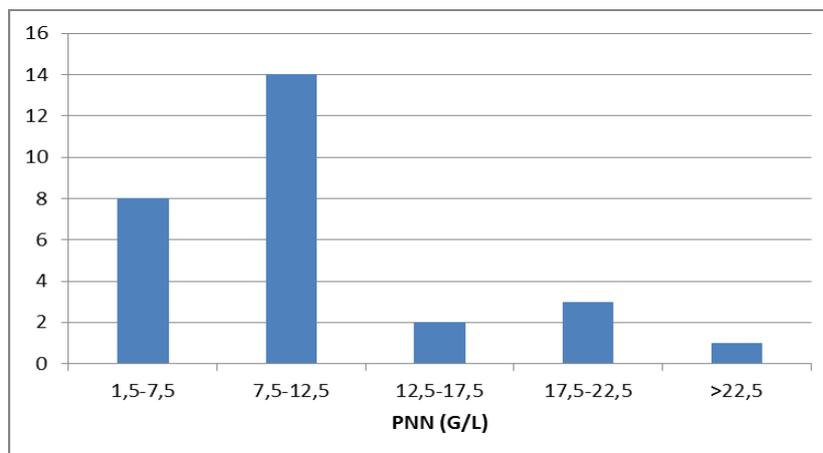


Figure 20 : Nombre de PNN (G/L) au moment de l'isolement d'*H. kunzii* (par tranche de 5 G/L)



⁴ Dosage de la CRP non réalisé ou non disponible dans 13 cas.

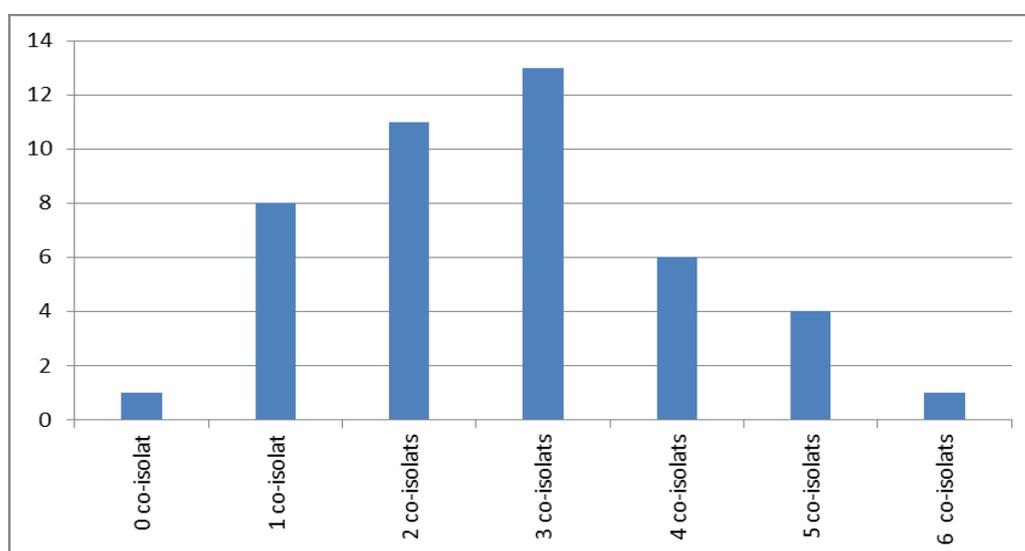
⁵ Numération formule sanguine non réalisée ou non disponible dans 16 cas.

7. ORGANISMES CONCOMITANTS

H. kunzii a été isolé en culture pure dans un seul des prélèvements de notre étude. Il s'agissait d'une biopsie osseuse prélevée dans le cadre d'une infection suite à une amputation d'orteil chez un patient diabétique (patient 31).

Toutes les autres souches (98 %) ont été isolées à partir de prélèvements plurimicrobiens.

Figure 21 : Nombre de co-isolats associés à *H. kunzii*



NB : Co-isolats non documentés pour 2 prélèvements

Au total, plus de 24 espèces bactériennes différentes ont été isolées en association avec *H. kunzii*. (Figure 22)

Les bactéries les plus fréquemment associées à *H. kunzii* étaient :

- *S. aureus* : 25 souches isolées (25/44⁶, c'est-à-dire *H. kunzii* associé à *S. aureus* dans 57 % des prélèvements)
- les entérobactéries : 24 souches isolées dans 21 prélèvements (21/44, c'est-à-dire *H. kunzii* associé à au moins une entérobactérie dans 48 % des prélèvements)

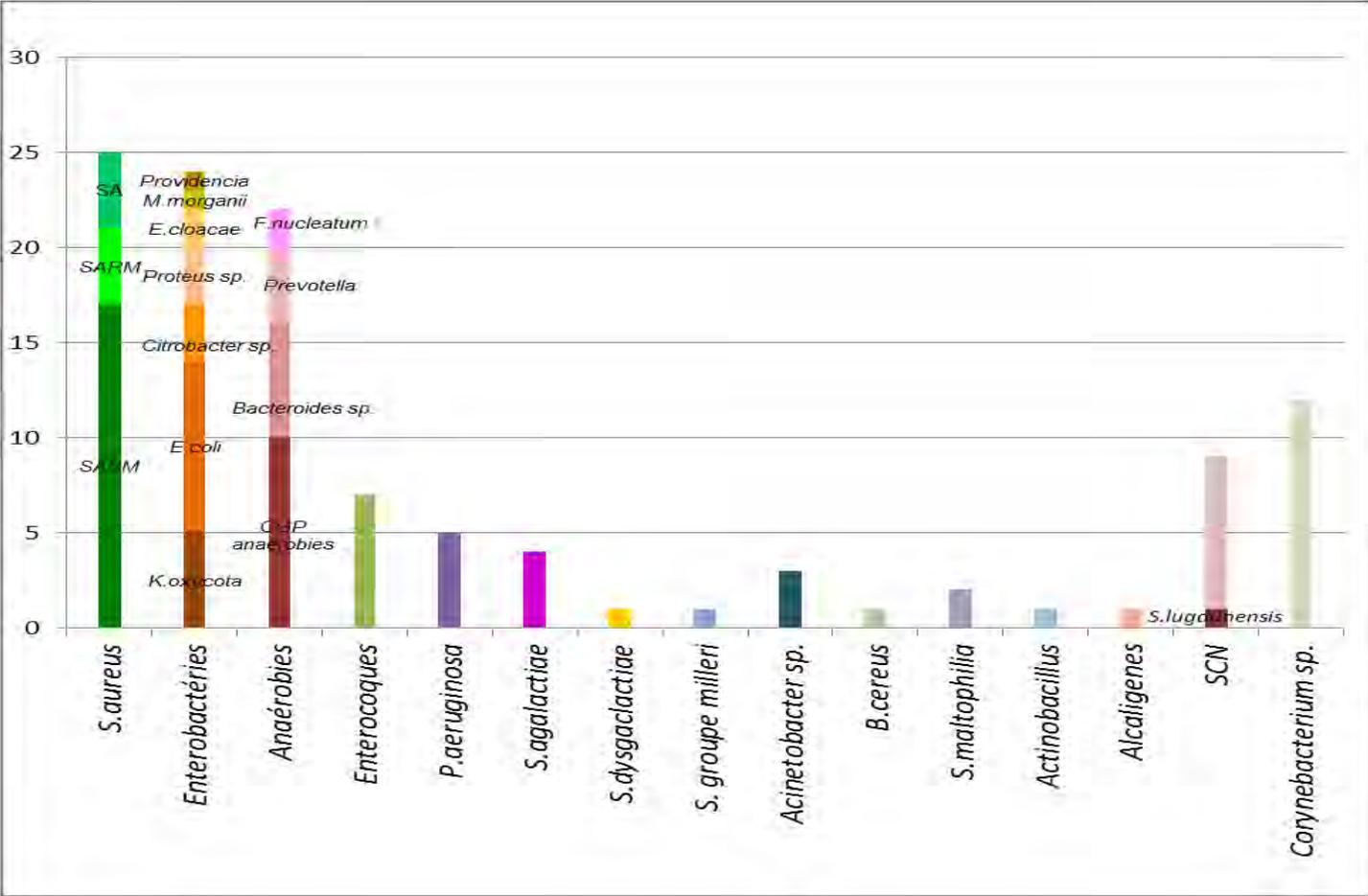
⁶ Co-isolats non documentés dans 2 prélèvements

- les bactéries anaérobies strictes : 22 souches isolées dans 14 prélèvements (14/44, c'est-à-dire *H. kunzii* associé à au moins une bactérie anaérobie stricte dans 32 % des prélèvements)

Aucune levure n'a été isolée en association avec *H. kunzii*.

Pourtant, dans une étude (53) portant sur l'incidence des champignons et des levures dans les infections polymicrobiennes des plaies chroniques, les auteurs rapportaient une espèce fongique dans 23% des prélèvements (208/915). Le plus souvent, il s'agissait de levures du genre *Candida*. Mais une corrélation négative était observée entre les staphylocoques et *Candida spp.*.

Figure 22 : Répartition des différents co-isolats



SASM : *S. aureus* sensible à la métilcilline, SARM : *S. aureus* résistant à la métilcilline, SA : *S. aureus* dont la sensibilité à la métilcilline n'est pas documentée, CGP anaérobies : cocci à Gram positif anaérobies (*Peptococcus spp.* et *Peptostreptococcus spp.*), SCN : staphylocoque à coagulase négative.

8. SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

8.1. CMI obtenues

Les CMI de 41 souches cliniques dont la souche de référence DSM 10548 ont été déterminées par microdilution en milieu liquide par le laboratoire associé au CNR Résistance aux Antibiotiques du CHU de Caen.

En l'absence de seuils critiques définis pour *Helcococcus*, les données de sensibilité font référence aux seuils critiques recommandés par l'EUCAST pour les streptocoques du groupe viridans (ou groupes A, B, C et G en cas de seuils critiques non référencés pour les streptocoques viridans).

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 26.

- **β -lactamines**

Toutes les souches étudiées étaient sensibles *in vitro* à la pénicilline G (seuil critique de sensibilité $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$), à l'amoxicilline (seuil critique $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$) et à l'imipénème (seuil critique $\leq 2 \mu\text{g/mL}$).

Quant au céfotaxime (seuil critique $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$), une seule souche était résistante (CMI = $1 \mu\text{g/mL}$).

- **Glycopeptides**

Toutes les souches étudiées étaient sensibles à la vancomycine et la teicoplanine (seuils critiques $\leq 2 \mu\text{g/mL}$).

- **Daptomycine, Linézolide**

Toutes les souches étudiées étaient sensibles à la daptomycine (seuil critique $\leq 1 \mu\text{g/mL}$) et au linézolide (seuil critique $\leq 2 \mu\text{g/mL}$).

- **Macrolides-lincosamides-streptogramines**

35 souches (85 %) étaient résistantes à l'érythromycine :

- dix souches (24 %) présentait une résistance de haut niveau à l'érythromycine et la clindamycine (CMI > 256 µg/mL).
- une souche était résistante à l'érythromycine uniquement (CMI > 256 µg/mL).
- 24 souches présentait une résistance de bas niveau à l'érythromycine avec des CMI comprises entre 0,5 µg/mL et 2 µg/mL (seuil critique de sensibilité à l'érythromycine ≤ 0,25 µg/mL).

- **Tétracyclines**

Deux souches (5 %) étaient résistantes à la tétracycline (CMI = 16 µg/mL pour un seuil critique de sensibilité ≤ 1 µg/mL), alors que toutes étaient sensibles à la tigécycline (seuil critique ≤ 0,25 µg/mL).

- **Fluoroquinolones**

32 souches étaient résistantes à la ciprofloxacine (CMI généralement comprises entre 2 µg/mL et 4 µg/mL, seuils critiques de sensibilité ≤ 1 µg/mL). Deux souches possédant une résistance de plus haut niveau (CMI = 16 µg/mL et 32 µg/mL) étaient également résistantes à la lévofloxacine (CMI = 8 µg/mL et 32 µg/mL).

Concernant cette dernière molécule, 35 souches étaient sensibles avec des CMI relativement élevées entre 0,25 et 1 µg/mL (seuil critique ≤ 1 µg/mL), 3 souches apparaissaient de sensibilité intermédiaire et 2 souches étaient résistantes.

- **Aminosides**

La plupart des souches étudiées présentait un bas niveau de résistance à la gentamicine avec des CMI comprises entre 2 et 4 µg/mL. Seule une souche présentait une résistance de haut niveau à la gentamicine (CMI à 64 µg/mL).

- **Rifampicine**

Cinq souches étaient de sensibilité intermédiaire à la rifampicine, CMI comprises entre 0,125 et 0,25 µg/mL (seuil critique de sensibilité ≤ 0,06 µg/mL) et une souche était résistante (CMI à 2 µg/mL)

- **Cotrimoxazole**

Trois souches étaient de sensibilité intermédiaire au cotrimoxazole, CMI = 2 µg/mL (seuil critique de sensibilité ≤ 1µg/mL) et une souche était résistante (CMI à 8 µg/mL).⁷

- **Colistine**

Toutes les souches présentaient une résistance de haut niveau à la colistine (CMI > 256 µg/mL).

- **Fosfomycine** (CMI non déterminées, données issues des antibiogrammes en boîtes Mueller-Hinton et Columbia)

La fosfomycine a été testée sur 20 souches, toutes avaient un diamètre d'inhibition > 27 mm et apparaissaient donc sensibles à cette molécule (diamètre critique de sensibilité CASFM 2013 ≥ 14mm)

⁷ Sur les antibiogrammes réalisées en boîtes Mueller-Hinton au sang de mouton et Columbia toutes les souches apparaissaient résistantes au cotrimoxazole avec un diamètre d'inhibition à 10 mm (diamètre critique de sensibilité CASFM ≥ 19mm), ce qui confirme l'inaptitude de ce milieu pour tester cet antibiotique.

- A propos des profils de résistance de deux souches d'*H. kunzii* isolées chez le même patient (n° 22), à partir du même site de prélèvement, à cinq mois d'intervalle

Les 2 profils sont mentionnés dans le tableau ci-dessous (Tableau 25).

Tableau 25 : Profil de résistance aux MLS et aux fluoroquinolones de 2 souches isolées chez le patient 22.

| | Isolat de mars 2012 | Isolat d'août 2012 |
|----------------|---------------------|--------------------|
| Erythromycine | R (>256 µg/mL) | S (0,5 µg/mL) |
| Clindamycine | R (>256 µg/mL) | S (0,25 µg/mL) |
| Ciprofloxacine | S (1 µg/mL) | R (16 µg/mL) |
| Lévofloxacine | S (0,5 µg/mL) | R (8 µg/mL) |

Le patient a été mis sous ofloxacine et clindamycine en mai 2012 pour une surinfection de son mal perforant.

Mais, il pourrait s'agir de 2 souches différentes, car il est peu vraisemblable que sous la pression antibiotique par la clindamycine, la seconde souche, isolée en mars, devienne sensible aux MLS.

8.2. Gènes de résistance aux MLS et aux tétracyclines

Les 10 souches résistantes à haut niveau à l'érythromycine et à la clindamycine (CMI > 256 µg/mL) portaient le gène *ermTR*, sous classe du gène *erm(A)*. La souche résistante à l'érythromycine seule ne portait aucun des gènes de résistance aux MLS recherchés.

Les 2 souches résistantes à la tétracycline (CMI = 16 µg/mL) portaient le gène *tet(M)*.

Tableau 26 : Distribution des CMI pour 40 souches cliniques d'*H. kunzii* et la souche de référence DSM 10548

| Antibiotiques | Souche DSM 10548 | CMI (µg/mL), nb d'isolats | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-----|----|----|----|---|----------------|----|----|-----|------------------------|
| | | 0,004 | 0,008 | 0,016 | 0,031 | 0,063 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| Pénicilline G ¹ | 0,063 | | | 11 | 18 | 9 | 2 | | | | | | | | | | | |
| Amoxicilline ¹ | 0,125 | | | 4 | 11 | 11 | 10 | 4 | | | | | | | | | | |
| Céfotaxime ¹ | 0,25 | | | 1 | 1 | 4 | 11 | 14 | 8 | 1 | | | | | | | | |
| Imipénème ¹ | 0,031 | | | 29 | 11 | | | | | | | | | | | | | |
| Ciprofloxacine ³ | 4 | | | | | | | | | 7 | 22 | 9 | | 1 | 1 | | | |
| Lévofloxacine ² | 1 | | | | | | | 2 | 13 | 20 | 3 | | 1 | | 1 | | | |
| Erythromycine ² | 0,25 | | | | | | | 5 | 14 | 9 | 1 | | | | | | | 11 (>256) ^a |
| Clindamycine ¹ | 0,25 | | | | 1 | 4 | 10 | 13 | 2 | | | | | | | | | 10 (>256) ^a |
| Quinu/Dalfo ³ | 0,5 | | | | | | 2 | 20 | 12 | 5 | 1 | | | | | | | |
| Gentamicine ³ | 2 | | | | | | | | 1 | 3 | 16 | 16 | 3 | | | 1 | | |
| Daptomycine ² | 0,25 | | | | | | | 19 | 19 | 2 | | | | | | | | |
| Linézolide ² | 2 | | | | | | | | | 11 | 29 | | | | | | | |
| Rifampicine ² | 0,031 | | 9 | 6 | 11 | 8 | 3 | 2 | | | 1 | | | | | | | |
| Vancomycine ¹ | 0,5 | | | | | | | 7 | 29 | 4 | | | | | | | | |
| Teicoplanine ¹ | 0,063 | | | | 3 | 15 | 16 | 6 | | | | | | | | | | |
| Tétracycline ² | 0,25 | | | | | 2 | 18 | 18 | | | | | | 2 ^b | | | | |
| Tigécycline ² | 0,008 | 12 | 28 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cotrimoxazole ² | 0,5 | | | | | | 3 | 9 | 10 | 14 | 3 | | 1 | | | | | |
| Colistine ⁴ | >256 | | | | | | | | | | | | | | | | | 40(>256) |

■ Souches sensibles à l'antibiotique testé ; ■ Souches de sensibilité intermédiaire; ■ Souches résistantes

¹: Seuils critiques EUCAST streptocoques du groupe viridans; ²: Seuils critiques EUCAST streptocoques des groupes A,B,C et G; ³: Seuils critiques EUCAST

Staphylococcus sp.; ⁴: Seuils critiques EUCAST *Pseudomonas sp.*

^a : 10 souches porteuses du gène *ermTR* ; ^b : 2 souches porteuses du gène *tet(M)*

Tableau 27 : Sensibilité des 41 souches dont la souche de référence

| Antibiotiques | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | Ranges | % souches sensibles ^a |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------|--|
| Pénicilline G | 0,031 | 0,063 | 0,016-0,125 | 100 |
| Amoxicilline | 0,063 | 0,125 | 0,016-0,25 | 100 |
| Céfotaxime | 0,25 | 0,5 | 0,016-1 | 97,5 |
| Imipénème | 0,016 | 0,031 | 0,016-0,031 | 100 |
| Ciprofloxacine | 2 | 4 | 1-32 | 17 |
| Lévofloxacine | 1 | 2 | 0,25-32 | 88 |
| Erythromycine | 1 | >256 | 0,25- >256 | 14,5 |
| Clindamycine | 0,25 | >256 | 0,031- >256 | 75,5 |
| Q/D ¹ | 0,25 | 1 | 0,125-2 | 97,5 |
| Gentamicine | 2 | 4 | 0,5-64 | 10 |
| Daptomycine | 0,5 | 0,5 | 0,25-1 | 100 |
| Linézolide | 2 | 2 | 1-2 | 100 |
| Rifampicine | 0,031 | 0,125 | 0,008-2 | 85,5 |
| Vancomycine | 0,5 | 0,5 | 0,25-1 | 100 |
| Teicoplanine | 0,125 | 0,25 | 0,031-0,25 | 100 |
| Tétracycline | 0,125 | 0,25 | 0,063-16 | 95 |
| Tigécycline | 0,008 | 0,008 | 0,004-0,008 | 100 |
| Cotrimoxazole | 0,5 | 1 | 0,125-8 | 90 |
| Colistine | >256 | >256 | >256 | 0 |

^a : selon les seuils critiques donnés par l'EUCAST pour les streptocoques

¹ : Quinupristine-dalfopristine

9. PRISE EN CHARGE ET ÉVOLUTION DES PATIENTS

Les Tableau 28 et Tableau 29 mentionnent l'antibiothérapie prescrite et l'évolution de la plaie.

Tableau 28 : Antibiothérapie et évolution de la plaie (patients 1 à 21)

| Patient | Antibiothérapie | | Evolution |
|---------|---|------------------|---|
| | Molécule | Durée | |
| 1 | Ofloxacin | 3 jours | Amputation pied D 1 mois après, puis décès suite à l'aggravation des lésions |
| | puis ceftriaxone | 2 semaines | |
| 2 | Ceftazidime et ciprofloxacine | ND | Amputation 2° rayon D 1 mois après |
| 3 | Pristinamycine | 3 semaines | ND |
| 4 | Aminoside (flash), ceftriaxone, métronidazole | 2 semaines | Persistence des ulcères veineux, pas d'aggravation |
| 5 | Amoxicilline-acide clavulanique | 1 semaine | Persistence de la plaie sans aggravation |
| 6 | Amoxicilline-acide clavulanique | ND | ND |
| 7 | Amoxicilline-acide clavulanique et ofloxacin | 3 mois | Bonne évolution |
| 8 | Pristinamycine | 3 jours | Bonne évolution |
| | puis moxifloxacine | 1 mois | |
| 9 | Aucune (refus du patient) | | Plaie inchangée 3 mois après |
| 10 | Ceftazidime et tobramycine | 3 semaines | Bonne évolution |
| 11 | Vancomycine, gentamicine, pipéracilline-tazobactam | ND | Plaie opératoire nécrosée |
| 12 | Gentamicine (flash) et céfotaxime | ND | Bonne évolution |
| | puis amoxicilline-acide clavulanique et ofloxacin | 5 semaines | |
| 13 | Lévofloxacine | 3 semaines | Bonne évolution |
| 14 | Amoxicilline-acide clavulanique (1 seule injection car rash), gentamicine (flash), ofloxacin, métronidazole | Avant le bloc | Bonne évolution |
| | puis ofloxacin et métronidazole | 1 semaine | |
| 15 | ND | | Bonne évolution de la cicatrise d'exérèse |
| 16 | Aucune | | Bonne évolution |
| 17 | Echec de toutes antibiothérapies (Vancomycine, pipéracilline-tazobactam, gentamicine -> amoxicilline-acide clavulanique -> ceftriaxone -> ofloxacin ->zyvoxid->teicoplanine->cotrimoxazole... | ND | Multiples récidives infectieuses de la cicatrice d'amputation |
| 18 | Ceftriaxone | 15 jours | Bonne évolution |
| 19 | Ofloxacin | ND | Nouvelle surinfection à l'arrêt de l'augmentin (prélèvement : SASM, <i>S.lugdunensis</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i>) |
| | puis amoxicilline-acide clavulanique | 3 semaines | |
| 20 | Pristinamycine (à visée préventive devant le risque de surinfection sur le matériel prothétique) | 10 jours | Bonne évolution |
| 21 | Amikacine (flash), pipéracilline- tazobactam | 10 jours, | Récidive de sepsis sévère avec bactériémie à SARM 2 mois après -> sepsis non maîtrisé par le traitement medical -> chirurgie de sauvetage |
| | puis clindamycine et cotrimoxazole | ND | |

ND : non documenté

Tableau 29 : Antibiothérapie et évolution de la plaie (patients 22 à 42)

| Patient | Antibiothérapie | | Evolution |
|---------|---|----------------|---|
| | Molécule | Durée | |
| 22 | Clindamycine, amoxicilline-acide clavulanique | 3 mois | Bonne évolution |
| | Aucun | | ND |
| | Clindamycine | 1 mois | Aggravation de la plaie |
| 23 | Amoxicilline | ND | Décès d'insuffisance cardiaque |
| 24 | Céfazoline | Per-opératoire | J4: évolution peu favorable de la cicatrice amputation |
| 25 | Pipéracilline-tazobactam, linézolide, métronidazole | ND | Etat infectieux contrôlé |
| 26 | Amoxicilline-acide clavulanique | ND | Bonne évolution |
| 27 | Aucune | | ND |
| 28 | Pipéracilline-tazobactam, vancomycine | ND | ND |
| | puis ciprofloxacine, vancomycine | ND | |
| 29 | Non (soins locaux) | | (Soins palliatifs) |
| 30 | Vancomycine, flucloxacilline | ND | ND |
| 31 | ND | | ND |
| 32 | Céfazoline, ofloxacine | ND | ND |
| | puis rifampicine, céftriaxone, métronidazole | ND | |
| 33 | ND | | ND |
| 34 | Ofloxacine et clindamycine | ND | ND |
| 35 | ND | | Novembre 2011: amputation des 3 premiers orteils G |
| 36 | ND | | ND |
| 37 | ND | | ND |
| 38 | ND | | ND |
| 39 | ND | | ND |
| 40 | ND | | ND |
| 41 | ND | | ND |
| 42 | Gentamicine (flash) et clindamycine | 15 jours | 17/04/2013: reprise de l'amputation du 5 ^e orteil-> nettoyage chirurgical+ rifampicine, lévofloxacine 3 semaines ; 13/05/2013: cicatrisation complète |

ND : non documenté

9.1. Antibiothérapie prescrite

Dans un premier temps et si le patient présentait une infection sévère, il s'agissait d'une antibiothérapie probabiliste choisie selon la provenance du patient, ses antécédents microbiologiques (exposition récente aux antibiotiques, bactéries déjà isolées et leurs profils de résistance), le site infectieux, la fonction rénale, etc. Cette antibiothérapie était débutée après les prélèvements à visée bactériologique. Dans un second temps, elle était ré-évaluée en fonction du contexte clinique et des résultats microbiologiques.

Souvent il s'agissait d'association d'antibiotiques visant les bactéries habituellement rencontrées dans les plaies chroniques (c'est-à-dire *S. aureus*, entérobactéries, anaérobies, *P. aeruginosa*) : β -lactamines, fluoroquinolones, glycopeptides, lincosamides, streptogramines et aminosides.

9.2. Évolution

- **A court terme**

Le processus infectieux était maîtrisé grâce à une prise en charge médico-chirurgicale : revascularisation du membre inférieur (si une AOMI était objectivée), débridement et nettoyage chirurgical de la plaie, mise en place d'une antibiothérapie adaptée et prescription de soins locaux.

Dans 8 cas, une amputation a été nécessaire : 5 amputations en urgence et 3 amputations dans les semaines après l'épisode suite à une aggravation de la plaie.

- **A plus long terme**

Il s'agissait de plaies difficiles à cicatriser et qui, par conséquent, ont présenté de nombreuses récurrences infectieuses. Toutefois, lors de ces récurrences, *H. kunzii* était rarement ré-isolé. Mais la pousse des colonies d'*H. kunzii* peut aussi avoir été inhibée lorsque des colonies à croissance rapide étaient présentes.

10. MODÈLE D'ÉTUDE DE VIRULENCE : C. ELEGANS

Dans un premier temps, le nématode *C. elegans* a été mis en contact d'*H. kunzii* seul. Les souches testées paraissaient pas ou peu virulentes sur les vers.

Dans un second temps, la co-infection des vers avec *H. kunzii* et *S. aureus* (souche Newman, ATCC 25904) a été évaluée. Dans la majorité des associations, les souches d'*H. kunzii* n'avaient aucune influence sur la virulence de *S. aureus*. Toutefois, pour certaines souches d'*H. kunzii*, un phénomène très intéressant a été observé : l'association *Helcococcus* – *S. aureus* entraînait une diminution de la virulence du *S. aureus* sur le nématode (alors que les 2 espèces étaient bien présentes dans le tube digestif du ver).

D'autres expériences de co-cultures doivent être réalisées pour préciser ce phénomène.

(Pr. J.P. Lavigne, [courrier électronique], 9 janvier 2014. Communication personnelle)

PARTIE IV
DISCUSSION

H. kunzii est rencontré chez une population assez uniforme, à savoir des patients présentant des troubles trophiques des membres inférieurs. L'incidence de ce germe peu connu est sous-estimée. En effet, il donne de petites colonies au sein de cultures polymicrobiennes contenant des germes à croissance rapide. Ces derniers peuvent même inhiber sa pousse. Les systèmes d'identification de microbiologie clinique (Vitek 2 et MALDI-TOF) l'identifient pourtant correctement.

1. ÉCOLOGIE D'HELCOCOCCUS KUNZII

Dans notre étude, 80 % des souches ont été retrouvées en dessous du genou, dont 67 % au niveau des pieds. De plus, 95 % étaient issues de plaies chroniques, dont 50 % de plaies diabétiques neuropathiques et/ou ischémiques.

Par conséquent, les comorbidités les plus courantes étaient le diabète (50 % des patients), l'HTA (45 %) et la présence d'une AOMI (40 %).

De la même façon, parmi les 22 cas de la littérature, *H. kunzii* était toujours isolé chez des patients présentant des lésions cutanées chroniques et le plus souvent au niveau des membres inférieurs (14/20).

Notre travail portant sur une série continue d'isolats, il est possible qu'un biais de recrutement influe sur les chiffres obtenus.

En effet, le nombre de plaies diabétiques incluses dans notre étude est certainement biaisé par la proportion de prélèvements reçus et les pratiques diagnostiques en microbiologie clinique : le pied diabétique étant d'une façon générale plus susceptible aux infections, est plus souvent prélevé à visée diagnostique (recherche extensive de tous les germes) que les autres types de plaies. Les escarres et les ulcères veineux sont souvent prélevés à visée épidémiologique et ne sont examinés qu'à la recherche de BMR ou de pathogènes patents (streptocoques β -hémolytiques, *S. aureus* et autres agents de surinfection). En effet, d'après la Spilf, 40 à 80 % des ulcérations chez les patients diabétiques s'infectent (31). Schmidt et coll., dans une étude portant sur la flore bactérienne des ulcères diabétiques, artériels et veineux, trouvaient que 70 % des ulcères diabétiques et artériels avec un écouvillonnage positif, développaient une infection clinique, contre seulement 22 % des ulcères veineux (54).

Une autre donnée en faveur de la non prise en compte des souches d'*H. kunzii* dans les plaies chroniques autres que diabétiques est l'étude de Moore et coll. (25) portant sur la colonisation des ulcères veineux non infectés. Cette étude retrouvait *H. kunzii* dans 22 % des prélèvements. Elle reste cependant isolée et mériterait d'être confirmée par d'autres études.

Au total, une étude incluant un nombre important de patients atteints de lésions diverses des membres inférieurs, systématiquement prélevées et traitées de façon similaire, serait nécessaire pour préciser s'il existe ou non une différence significative entre la prévalence d'*H. kunzii* dans les plaies diabétiques par rapport aux autres types de plaies chroniques ou s'il s'agit d'un simple biais de recrutement.

Haas et coll. (13) dans l'étude portant sur la colonisation de la peau par *H. kunzii* retrouvaient cette bactérie au niveau de la peau intacte du pied (espaces inter-orteils ou plante du pied) chez 10% des patients (12/120) avec des problèmes podologiques. Parmi ces 12 patients, 8 étaient diabétiques (2 tiers) et 4 (un tiers) non-diabétiques. Compte tenu du faible nombre de cas, cette différence « diabétiques / non diabétiques » n'était pas significative. A chaque fois, *H. kunzii* n'était isolé que sur l'écouvillonnage du pied et pas sur celui du membre supérieur.

Six patients sur 120 (5 %) avaient une plaie du pied au moment de l'étude. *H. kunzii* a été isolé dans une seule plaie, chez un patient qui en était porteur sur la peau non lésée du pied. Chez les 5 autres sujets présentant une plaie, *H. kunzii* n'était ni retrouvé sur le prélèvement de la plaie, ni sur le prélèvement de peau non lésée.

Quant au groupe de volontaires sains, seul un individu était porteur du germe (1/50, soit 2 %).

Ce constat suggère qu'*H. kunzii* fait partie de la flore commensale cutanée des membres inférieurs des patients atteints de troubles trophiques et peut y coloniser ou infecter les plaies.

Pour l'instant, nous ne savons pas expliquer cette écologie spécifique.

De nombreuses études s'intéressent au microbiote cutané et essaient de comprendre les interactions complexes entre l'écosystème cutané et l'hôte. On sait aujourd'hui que ce microbiote dépend des caractères physico-chimiques de la peau. Il existe d'importantes variations intra-individuelles selon la région du corps

(humidité, sécheresse, production de sébum, pH, température, épaisseur...) et des variations inter-individuelles selon des facteurs endogènes (âge, sexe, hormones, immunité...) et des facteurs exogènes (antibiotiques, hygiène...). (55)

Ainsi, la flore cutanée est affectée par le pH et inversement. Au niveau des surfaces « occluses » (axillaires, génitales, intertrigineuses, interdigitales), le pH est plus neutre (pH \approx 7) que le reste du corps (pH \approx 4,8). Ces régions au pH proche de 7 hébergent une flore bactérienne plus abondante et plus diversifiée (56). De même la modification du pH au niveau des plaies chroniques jouerait un rôle sur la colonisation de ces plaies (57). Autre détail intéressant, d'après une étude réalisée chez des patients hémiparétiques (58), le système nerveux autonome semble avoir un rôle important dans la régulation du pH cutané : le pH au niveau de la main paralysée est plus élevé que celui de la main non paralysée ; et en accord avec ce qui est mentionné ci-dessus, la flore de la main paralysée est plus diversifiée que la main contro-latérale.

Pour savoir si le pH cutané influence l'écologie de *H. kunzii*, il faudrait étudier *in vitro* la croissance de la bactérie en fonction du pH du milieu de culture, de façon similaire à ce qui a été fait pour *Brevibacterium epidermidis* (59).

Par ailleurs, d'après une étude du domaine de la recherche fondamentale de Stavri et coll. en 2001 (60), *H. kunzii* possède une hémagglutinine capable de lier deux sucres différents : le lactose et la N-acétylglucosamine. Dans leurs expérimentations, l'hémagglutination des hématies de mouton était inhibée par l'ajout de l'un ou l'autre de ces deux sucres. Donc une seule hémagglutinine serait impliquée (si 2 hémagglutinines étaient présentes, un mélange des 2 sucres aurait été nécessaire pour prévenir l'hémagglutination). Cette lectine semblait être comprise soit dans la couche de peptidoglycane, soit dans la membrane cytoplasmique (pas de fimbriae). Elle était sensible à la pronase, à la subtilisine, à la mutanolysine et à la chaleur (100°C, 1 min), mais était résistante au lysozyme et aux agents chélateurs.

On retrouve la N-acétylglucosamine liée à l'acide glucuronique pour former les unités dissaccharidiques de l'acide hyaluronique, qui est le principal glycoaminoglycane du derme. Les auteurs suggèrent que cette lectine joue un rôle important dans l'écologie d'*H. kunzii* mais n'en apportent pas de preuves

expérimentales (« test d'adhérence à des cellules épithéliales cutanées »). Depuis 2001, personne n'a repris ce sujet de recherche.

D'autre part, *H. kunzii* est généralement isolé dans des prélèvements polymicrobiens : ses co-isolats les plus fréquents sont *S. aureus*, les entérobactéries et les bactéries anaérobies strictes. Cette écologie bactérienne est habituelle au niveau des plaies chroniques (entérobactéries, polymicrobisme) et nécrotiques (bactéries anaérobies strictes). Il est possible que des interactions entre certains de ces micro-organismes et *H. kunzii* existent, par exemple au sein de biofilms polymicrobiens.

Il est établi depuis quelques années que des biofilms se forment au niveau des plaies, essentiellement chroniques, et sont suspectés d'en retarder la cicatrisation.

Le biofilm correspond à une communauté complexe de micro-organismes, fixés à une surface, qui synthétisent une matrice extra-cellulaire adhésive et protectrice, partagent leurs « compétences individuelles » et modifient leur schéma d'expression génique de manière à favoriser la survie du groupe. Ce processus de coopération microbienne est le résultat d'un type de communication appelée « *quorum sensing* ». Souvent au niveau des plaies, les biofilms sont constitués de plusieurs espèces, organisées en pathogroupes : notion de FEP (« *Functionally Equivalent Pathogroups* »). Des groupes de bactéries agissent en synergie pour résister aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques, alors que isolément ils ne survivraient pas.

L'ischémie, la nécrose tissulaire, les comorbidités altérant la fonction immunitaire, la malnutrition favoriseraient le développement de ces biofilms. (61,62)

Selon Dowd et coll. (63) dans une étude portant sur la diversité microbienne dans les plaies chroniques, identifier et traiter (avec une antibiothérapie qui pénètre le biofilm et pendant une durée suffisamment longue) l'ensemble des espèces présentes au sein des biofilms améliore l'évolution de ces plaies.

A ce jour le rôle de *H. kunzii* dans des biofilms polymicrobiens reste totalement inconnu et à étudier.

2. CARACTÈRES D'IDENTIFICATION

À l'examen direct, ce germe est d'aspect assez remarquable : il s'agit de très gros cocci à Gram positif, pléomorphes, se décolorant facilement, isolés ou en petits amas irréguliers.

Il donne des colonies fines sur les géloses au sang, légèrement α -hémolytiques après 48 heures à 37°C. L'aspect est quasi identique quelle que soit l'atmosphère d'incubation (aérobiose, anaérobiose, CO₂).

Une autre originalité pour ce cocci à Gram positif en amas est d'être catalase négative.

Donc cette bactérie est assez aisément reconnaissable par des techniciens expérimentés.

D'après une étude de Haas et coll (13), pour améliorer la sensibilité de la recherche d'*H. kunzii* sur les prélèvements polymicrobiens (telles que les plaies chroniques), une gélose sélective devrait être ensemencée, les germes à croissance rapide (*S. aureus* et *E. coli*) inhibant la pousse d'*H. kunzii*.

Au laboratoire de Cahors, une gélose ANC est ensemencée lorsqu'il s'agit d'un prélèvement de plaies diabétiques. Haas et coll. utilisent dans leur étude un milieu encore plus sélectif (gélose BHI additionnée de Tween 80, colistine et novobiocine).

Mais en contrepartie, certaines souches d'*H. kunzii* présentent un satellitisme autour de *S. aureus* ou de SCN. Tels *Abiotrophia defectiva* et le genre *Granulicatella*, il semble exister des souches variantes auxotrophes d'*H. kunzii*.

Ainsi, de telles souches pourraient être méconnues lorsqu'en culture elles ne sont pas associées à *Staphylococcus sp.*.

A Cahors, les premières souches isolées (environ jusqu'en 2005) étaient identifiées grâce aux caractères des galeries biochimiques suivies d'une identification génotypique. Il s'agissait d'une démarche longue, coûteuse et fastidieuse.

Suite à une action auprès du fournisseur (bioMérieux), le profil obtenu avec la carte ID-GP de l'automate Vitek 2 a été inclus dans la base de données de l'appareil.

Ainsi aujourd'hui la carte ID-GP colorimétrique de cet automate identifie de façon fiable les souches d'*H. kunzii*.

La grande majorité des souches de notre étude (39/41, soit 95 %) ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce avec un pourcentage de probabilité de 93 % à 99 %. Le profil biochimique le plus fréquemment obtenu était 020112100000000. Les souches décrites par Lemaître en 2008 (10) et Grattarola en 2011 (23) ont également été identifiées de façon adéquate avec 99 % de probabilité par le Vitek 2.

Le système BD Phoenix (Becton Dickinson) identifierait aussi de façon convenable ce germe : la souche décrite par McNicholas en 2011 (24) au niveau d'un dispositif cardiaque implantable a été identifiée par cet automate.

L'identification de cette bactérie est donc possible en routine dans un laboratoire de microbiologie clinique.

Toutes les souches analysées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF avec le système Microflex LT (Brucker Daltonics) ont correctement été identifiées au niveau de l'espèce avec un score >2,01 (score > 2,214 dans 90 % des cas).

Avec le développement actuel et prévisible de cette technique (fiabilité, faible coût, rapidité de rendu du résultat), ces bactéries seront plus facilement identifiées.

Pour les souches analysées par les techniques génotypiques, le pourcentage d'homologie du gène *rrs* avec la souche type variait de 98 % à 100 % selon les souches étudiées, alors que la séquence du gène *sodA* présentait toujours 100 % d'homologie à celle de la souche type.

D'une façon générale, pour les streptocoques, le gène *sodA* est un meilleur outil taxonomique pour une identification d'espèce : moins de divergence sur les différentes copies chez un même micro-organisme et par ailleurs plus discriminant. (36–40)

Ces techniques d'identification sont très lourdes, lentes et coûteuses. Le CNR-Strep les a abandonnées en routine au profit du système MALDI-TOF, après avoir suffisamment alimenté sa base de données grâce aux souches identifiées par séquençage.

3. POUVOIR PATHOGÈNE

Dans cette étude, 8 souches ont été isolées au niveau de plaies sans signe infectieux. Pour les autres plaies, des signes infectieux plus ou moins marqués étaient présents : 15 infections superficielles, 18 infections atteignant des tissus sous-cutanés, 3 sepsis. Mais, *H. kunzii* a été retrouvé dans les hémocultures dans un seul cas (CH Alençon). Il était alors associé à *S. aureus*, *Fusobacterium nucleatum* et à des entérobactéries, chez un patient hospitalisé pour un choc septique avec défaillance multiviscérale suite à une surinfection de ses ulcères des pieds. Un traitement par pipéracilline-tazobactam, linézolide et métronidazole a permis de maîtriser l'état septique. La bactériologie des ulcères et le nombre de flacons positifs n'étaient pas documentés.

Le seul cas (Hôpital de Sion, Dr Reto Lienhard) où *H. kunzii* a été retrouvé en culture pure, et de ce fait avait un rôle pathogène évident, était une ostéite suite une amputation de la tête du cinquième métatarsien chez un diabétique. La souche a été isolée à partir de la biopsie osseuse. Malheureusement, nous ne connaissons pas le traitement entrepris, ni l'évolution de cette infection.

Pour les autres cas, il était très difficile de préciser l'imputabilité d'*H. kunzii* dans l'infection.

Dans la littérature, *H. kunzii* est rapporté comme responsable de tous types d'infections : de l'infection cutanée superficielle à l'infection invasive mettant en danger le pronostic vital.

En 1997, Peel et coll. (7) ont rapporté une infection d'un kyste sébacé de l'épaule compliquée d'une cellulite chez une patiente obèse et hypertendue. *H. kunzii* était isolé en culture pure à partir de l'écouvillonnage du pus. Une antibiothérapie à visée antistaphylococcique par flucloxacilline pendant cinq jours a été débutée après le prélèvement. Les signes inflammatoires persistants, le kyste a été excisé un mois plus tard.

En 1998, Chagla et coll. (6) ont aussi publié un cas d'infection de kyste sébacé au niveau de la poitrine chez une patiente non-diabétique. *H. kunzii* a été retrouvé en culture pure et abondante dans le liquide de drainage. Une antibiothérapie par

céphalexine pendant cinq jours a été débutée après le prélèvement. Un mois plus tard les signes inflammatoires ayant disparus, le kyste n'a pas été excisé.

En 2003, Riegel et Lepargneur (9) ont rapporté un abcès nécrotique du pied au niveau d'une cicatrice d'incision, deux mois après la mise en place de matériel d'ostéo-synthèse, chez une jeune femme ne présentant pas d'immuno-déficience ni de diabète. *H. kunzii* a été isolé en quantité abondante sur deux prélèvements de pus à une semaine d'intervalle. Sur le premier prélèvement, ils signalaient de rares colonies de *S. simulans* ; sur le second prélèvement *H. kunzii* était isolé en culture pure. Une antibiothérapie par pristinamycine et rifampicine, débutée après le premier prélèvement, a permis de faire régresser les signes infectieux.

En 2005, Woo et coll. (11) ont publié deux cas d'infections invasives mettant en danger le pronostic vital chez des toxicomanes intra-veineux :

- Un choc septique où *H. kunzii* était retrouvé en culture pure dans deux paires d'hémocultures. L'état de choc a été rapidement contrôlé après la mise en place d'une antibiothérapie par cloxacilline et pénicilline G (débutées après les prélèvements).
- Un empyème thoracique cloisonné chez un patient en choc septique et défaillance respiratoire. *H. kunzii* a été retrouvé en culture pure et abondante dans le liquide de drainage de la collection pleurale. Une antibiothérapie probabiliste par augmentin IV a été débutée avant le drainage. Les hémocultures et la recherche de mycobactéries étaient négatives. La guérison a été obtenue après 8 semaines d'amoxicilline-acide clavulanique.

En 2008, Lemaitre et coll. (10) ont rapporté un phlegmon plantaire, 4 mois après une amputation d'orteil, chez un patient artéritique non diabétique. *H. kunzii* a été retrouvé en quantité abondante mais non pur (associé à *K. oxycota* et *B. fragilis*) dans le liquide de drainage et dans la biopsie tissulaire. Les auteurs n'ont pas précisé le traitement antibiotique entrepris, ni l'évolution du patient. Ici *H. kunzii* ne pouvait être désigné seul responsable, mais étant isolé à partir de deux prélèvements profonds, il concourait probablement à l'infection.

En 2011, Perez-Jorge et coll. (12) ont rapporté une infection de prothèse de genou chez une jeune femme sans comorbidité. *H. kunzii* a été isolé en culture pure dans les 3 biopsies de tissus péri-prothétiques et dans plusieurs fragments

d'implants. Après 3 mois de traitement par clindamycine et rifampicine, une nouvelle prothèse a été mise en place. Pendant la chirurgie, les prélèvements tissulaires réalisés étaient stériles.

En 2011, McNicholas et coll. (24) ont rapporté une infection d'un dispositif cardiaque implantable avec cellulite 8 mois après sa mise en place. Aucune comorbidité n'était mentionnée. *H. kunzii* a été isolé en culture pure dans 4 prélèvements (un écouvillonnage cutané, un écouvillonnage du dispositif implantable et deux prélèvements tissulaires). Une antibiothérapie par cloxacilline et pénicilline G a été débutée 3 jours avant les prélèvements avec une aggravation des signes infectieux. Finalement, le drainage de l'abcès associé à un traitement par amoxicilline et rifampicine ont permis la résolution complète de l'infection alors que le matériel a été laissé en place.

En 2013, Stanger et coll. (26) ont rapporté une nécrose extensive d'un ulcère de la jambe sous thérapie à pression négative compliquée d'une érosion de l'artère tibiale antérieure et d'une hémorragie cataclysmique, chez un patient présentant une ostéomyélite chronique post-traumatique du tibia (fracture du tibia 35 ans avant) et un carcinome épidermoïde de la même jambe. *H. kunzii* a été isolé à partir de deux écouvillonnages prélevés 10 et 7 jours avant l'épisode, associé à d'autres germes commensaux cutanés et à une flore anaérobie mixte. Une antibiothérapie par céfuroxime et métronidazole et un débridement chirurgical ont permis l'amélioration rapide des signes infectieux. Par la suite, 2 écouvillonnages prélevés ne montraient plus *H. kunzii*, mais *S. aureus*, *E. faecalis* et des germes anaérobies. 6 mois après une chirurgie réparatrice par lambeaux libres et 6 semaines d'amoxicilline-acide clavulanique le patient n'a pas présenté de récurrence infectieuse. Ici, bien que le rôle seul d'*H. kunzii* n'était établi, les auteurs suggèrent sa contribution dans la sévérité de l'infection.

En 2013, Sridhar et coll. (14) ont rapporté un abcès cérébral à *H. kunzii* chez un patient de 83 ans diabétique et hypertendu présentant un cholestéatome compliqué d'un abcès mastoïdien. Une excision du cholestéatome et une mastoïdectomie avaient été réalisées. Les prélèvements de pus effectués à ce moment là étaient négatifs. Mais 3 semaines après la chirurgie, le patient a présenté une convulsion fébrile. Un abcès cérébral a été mis en évidence au scanner et a été drainé chirurgicalement. A l'examen direct du pus de l'abcès, des cocci à Gram positifs ont

été observés. Le flacon anaérobie dans lequel avait été inoculé le pus a déclenché en 20 heures, mais aucun des repiquages n'a poussé. Suspectant un streptocoque déficient, une gélose au sang avec une strie de *S. aureus* a étéensemencée à partir du flacon anaérobie, ce qui a permis la pousse de colonies identifiées par la suite *H. kunzii*. Ce cas témoigne du potentiel pathogène de ce germe, l'existence de souches auxotrophes d'*H. kunzii* et la difficulté à les mettre en évidence dans les prélèvements monomicrobiens.

Ainsi *H. kunzii* peut se comporter comme un pathogène opportuniste, parfois virulent, pouvant entraîner des infections invasives à partir d'une porte d'entrée cutanée, y compris chez des patient ne présentant pas d'immunodéficience évidente.

4. SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES ET GÈNES DE RÉSISTANCE

L'ensemble des souches étudiées, à l'exception d'une souche trouvée résistante au céfotaxime (CMI = 1 µg/mL), étaient sensibles aux β-lactamines, de même que les souches de la littérature.

Mais, d'une façon générale, en plus de la sensibilité *in vitro* de la bactérie à l'antibiotique testé, la concentration de ce dernier au niveau du site de l'infection est un facteur déterminant important de l'efficacité du traitement (64,65).

Ainsi, bien qu'*H. kunzii* soit sensible *in vitro* aux β-lactamines, cette famille ne diffuse que modérément dans les tissus mous et les os (66). Cette diffusion est d'autant plus altérée dans les plaies du pied en cas d'artérite des membres inférieurs (67).

Toutes nos souches ainsi que celles de la littérature étaient sensibles aux glycopeptides. Mais ces molécules n'ont également qu'une diffusion modérée dans les tissus mous et les os. D'après Skhirtladze, la pénétration tissulaire de la vancomycine est très diminuée chez les patients diabétiques par rapport aux non diabétiques (68).

Toutes nos souches étaient sensibles à la daptomycine et au linézolide. Les souches de la littérature étaient également sensibles au linézolide (sensibilité à la daptomycine non étudiée). Ce sont des antibiotiques à très bonne diffusion tissulaire, y compris dans le tissu ostéo-articulaire (69–71). De plus la daptomycine pénètre dans les biofilms (72,73).

Dix souches (24 %) présentaient une résistance de haut niveau à l'érythromycine et à la clindamycine (CMI > 256 µg/mL). Toutes ces souches portaient le gène *ermTR*, sous-classe des gènes *erm(A)*. Une des souches décrites par Woo et coll. (11) résistante à l'érythromycine (CMI > 256 µg/mL) portait aussi le gène *ermTR*. D'après les données du CNR-Strep (74), ce gène *ermTR* est retrouvé chez 20 % des *S. pyogenes* résistants à l'érythromycine et chez 32 % des *S. agalactiae* résistants à

l'érythromycine, ce qui suggère un transfert horizontal du gène au sein de la famille des *Streptococcaceae*.

À noter que les MLS ont une excellente pénétration tissulaire, y compris osseuse, mais si leur utilisation est envisagée, étant donné la fréquence des résistances de haut niveau, un antibiogramme est nécessaire.

Les deux souches (5 %) de notre étude résistantes à la tétracycline (CMI = 16 µg/mL), portaient le gène *tet(M)*. Dans la littérature la tétracycline a été étudiée sur trois souches ; toutes y étaient sensibles. Le gène *tet(M)* est retrouvé chez 78 % des *S. pyogenes* résistants aux tétracyclines et chez 94 % des *S. agalactiae* résistants aux tétracyclines. (74)

À noter que les tétracyclines ont une excellente pénétration dans les tissus mous (75) ; par contre la pénétration ostéo-articulaire est controversée (76).

En ce qui concerne les fluoroquinolones, la majorité de nos souches étaient résistantes à la ciprofloxacine (CMI généralement comprises entre 2 et 4 µg/mL, 2 souches avec des CMI > 16 µg/mL). Ces résultats corroboraient ceux de Caliendo (8) : les CMI de la ciprofloxacine des dix souches qu'il a étudiées étaient comprises entre 2 et 4 µg/mL.

Donc *H. kunzii* semble naturellement peu sensible aux fluoroquinolones, et certaines souches peuvent acquérir des résistances de plus haut niveau.

Toutefois, ce sont des molécules ayant une excellente diffusion tissulaire, y compris osseuse (77).

La plupart de nos souches présentaient une résistance de bas niveau à la gentamicine avec des CMI comprises entre 2 et 4 µg/mL. Assimilées à des streptocoques, on peut considérer une résistance permettant d'obtenir une synergie avec un inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne : β-lactamines ou glycopeptides. Seule une souche présentait une résistance de haut niveau à la gentamicine (CMI à 64 µg/mL). À noter que les aminosides diffusent mal dans les tissus, dont le tissu osseux.

Toutes les souches de notre étude étaient sensibles à la rifampicine (hormis une, avec une CMI à 2 µg/mL), de même que celles de la littérature.

Cet antibiotique possède une excellente pénétration tissulaire, y compris osseuse. De plus cette molécule est active sur les bactéries quiescentes au sein des biofilms. (78)

La plupart de nos souches étaient sensibles au cotrimoxazole. Une seule souche était résistante (CMI à 8 µg/mL) et trois souches étaient de sensibilité intermédiaire.

Les 2 souches étudiées par Chow (5) étaient rendues résistantes au cotrimoxazole (CMI > 4/76 µg/mL, système MICroSTREP plus panel, Siemens Healthcare Diagnostics). Les sulfamides possèdent une bonne diffusion tissulaire et osseuse.

Toutes nos souches testées sur milieu gélosé Mueller-Hinton au sang ou Columbia étaient sensibles à la fosfomycine. Cet antibiotique possède une excellente diffusion tissulaire et osseuse (79).

Au vu de ces résultats, les antibiotiques recommandés pour les infections cutanées superficielles et peu sévère à *H. kunzii* pourraient être les β-lactamines ou les glycopeptides. L'association à la gentamicine permettrait d'obtenir une synergie d'action bénéfique. Toutefois, étant donnée la diffusion tissulaire modérée de ces 3 familles d'antibiotiques, d'autant plus quand il s'agit de patients aux réseaux vasculaires périphériques altérés, une évolution non satisfaisante fera envisager des molécules à meilleure pénétration cutanée, par exemple la clindamycine ou la pristinaamycine.

En cas d'infection plus sévère, comme une dermo-hypodermite extensive ou une atteinte ostéo-articulaire, une molécule ayant une très bonne diffusion tissulaire y compris osseuse pourrait être préférée d'emblée : la clindamycine, la pristinaamycine, le linézolide, une tétracycline, le cotrimoxazole, la fosfomycine, la daptomycine ou la rifampicine. Un antibiogramme est nécessaire pour vérifier la sensibilité à ces molécules, notamment à la clindamycine. La daptomycine et la rifampicine ont l'avantage d'être actives au sein des biofilms, ce qui est intéressant dans les lésions ostéo-articulaires chroniques et les infections sur du matériel prothétique. D'une

façon générale, si la rifampicine est envisagée, elle doit impérativement être associée à une autre famille (daptomycine ou lévofloxacine par exemple (80)) pour éviter le risque d'apparition de mutants résistants.

Les fluoroquinolones semblant peu actives sur *H. kunzii*, ne seraient pas à envisager en première intention.

Cependant ces recommandations sont à nuancer en fonction de l'évolution de chaque patient et le choix de l'antibiothérapie devra bien sûr tenir compte de la sensibilité des germes associés. D'autant plus que malgré les multiples études concernant l'antibiothérapie dans l'infection du pied diabétique aucune molécule ni combinaison de molécules ne se révèle meilleure qu'une autre (64).

CONCLUSION

H. kunzii est l'espèce princeps et principale du genre *Helcococcus*, décrits simultanément il y a seulement 20 ans.

Depuis, quatre autres espèces ont été décrites : *H. ovis* (uniquement en clinique vétérinaire), *H. sueciensis*, *H. pyogenica* et *H. seattlensis*, et encore, la description de ces deux dernières espèces ne repose que sur un seul isolat de chaque.

Nos connaissances sur le genre et particulièrement *H. kunzii* sont encore très parcellaires. En 2013, seule une vingtaine de cas d'infections humaines ont été publiés dans la littérature.

On sait peu de choses sur son écologie humaine et animale. *H. kunzii* fait partie de la flore commensale cutanée des membres inférieurs (13), rarement retrouvé chez les personnes saines (1/50) mais assez fréquent chez des patients atteints de troubles trophiques des pieds (avec ou sans plaie) : selon Haas et coll. 10% de ses 120 patients en seraient porteurs.

En ce qui concerne la microbiologie clinique, il est occasionnellement rencontré au niveau des extrémités inférieures en tant qu'agent colonisateur ou infectieux des plaies chroniques et abcès chez les patients diabétiques ou présentant des ulcères vasculaires. De façon encore plus exceptionnelle, il peut être isolé au niveau de divers autres sites cutanés de lésions chroniques (escarres fessières, kystes sébacés du dos ou de la poitrine, ulcérations tumorales) (6,7). L'aspect polymicrobien de ces plaies rend alors son imputabilité dans l'infection difficile à déterminer.

Les derniers cas publiés démontrent son véritable pouvoir pathogène opportuniste, plus virulent que ce qui était initialement décrit. Par exemple, il est rapporté seul responsable de choc septique, d'empyème thoracique, d'infections sur matériels étrangers, d'abcès cérébral (11,12,14,24). Cliniquement, une porte d'entrée cutanée est retrouvée (ulcères de jambes, toxicomanie intra-veineuse, chirurgie...) dans chacune de ces infections profondes. La virulence d'*H. kunzii* est corroborée par le fait que certains de ces patients ne présentaient pas d'immunodépression évidente.

Ce travail, même s'il s'agit de la plus grosse série d'isolats analysée, ne peut prétendre répondre à toutes les questions qui se posent à l'heure actuelle sur la place réelle de cette bactérie. Une meilleure connaissance de son réservoir humain et animal voire environnemental est nécessaire. Des travaux fondamentaux sur sa virulence doivent débiter, notamment avec le séquençage complet de son génome.

Avec la facilitation apportée par le développement de la spectrométrie de masse, des souches d'*H. kunzii* seront probablement de plus en plus souvent mises en évidence. Cela pose déjà aux cliniciens le questionnement de sa prise en compte dans l'adaptation de la thérapeutique antibiotique.

Des travaux de confrontation de données fondamentales et clinico-microbiologiques seront encore nécessaires pour pouvoir affirmer si nous sommes bien face à une bactérie pathogène opportuniste émergente.

Toulouse, le 03.03.2014

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine de Rangueil

D. ROUGE


Professeur Nicole MARTY

Chef de Service

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Institut Fédératif de Biologie

330, avenue de Grand-Bretagne - TSA 40031

31059 TOULOUSE CEDEX 9

Tél. 05 67 69 04 15 / 16 - Fax 05 67 69 04 84

BIBLIOGRAPHIE

1. Collins M.D., Facklam R.R., Rodrigues U.M., Ruoff K.L.. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1993 Jul;43(3):425–9.
2. Collins M.D., Falsen E., Foster G., Monasterio L.R., Dominguez L., Fernandez-Garazabal J.F.. *Helcococcus ovis* sp. nov., a gram-positive organism from sheep. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Oct;49 Pt 4:1429–32.
3. Collins M.D., Falsen E., Brownlee K., Lawson P.A.. *Helcococcus sueciensis* sp. nov., isolated from a human wound. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 Sep;54(Pt 5):1557–60.
4. Panackal A.A., Houze Y.B., Prentice J., Leopold S.S., Cookson B.T., Liles W.C., et al. Prosthetic joint infection due to “*Helcococcus pyogenes*”. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun;42(6):2872–4.
5. Chow S.K., Clarridge J.E. 3rd. Identification and clinical significance of *Helcococcus* species with description of *Helcococcus seattlensis* sp. nov. from a patient with urosepsis. *J Clin Microbiol.* 2013 Dec 26;
6. Chagla A.H., Borczyk A.A., Facklam R.R., Lovgren M.. Breast abscess associated with *Helcococcus kunzii*. *J Clin Microbiol.* 1998 Aug;36(8):2377–9.
7. Peel M.M., Davis J.M., Griffin K.J., Freedman D.L.. *Helcococcus kunzii* as sole isolate from an infected sebaceous cyst. *J Clin Microbiol.* 1997 Jan;35(1):328–9.
8. Caliendo A.M., Jordan C.D., Ruoff K.L.. *Helcococcus*, a new genus of catalase-negative, gram-positive cocci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1995 Jun;33(6):1638.
9. Riegel P., Lepargneur J.P.. Isolation of *Helcococcus kunzii* from a post-surgical foot abscess. *Int J Med Microbiol.* 2003 Dec;293(6):437–9.
10. Lemaître N., Huvent D., Loïez C., Wallet F., Courcol R.J.. Isolation of *Helcococcus kunzii* from plantar phlegmon in a vascular patient. *J Med Microbiol.* 2008 Jul;57(Pt 7):907–8.
11. Woo P.C.Y., Tse H., Wong S.S.Y., Tse C.W.S., Fung A.M.Y., Tam D.M.W., et al. Life-threatening invasive *Helcococcus kunzii* infections in intravenous-drug users and *ermA*-mediated erythromycin resistance. *J Clin Microbiol.* 2005 Dec;43(12):6205–8.
12. Pérez-Jorge C., Cordero J., Marin M., Esteban J.. Prosthetic joint infection caused by *Helcococcus kunzii*. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):528–30.

13. Haas J., Jernick S.L., Scardina R.J., Teruya J., Caliendo A.M., Ruoff K.L.. Colonization of skin by *Helcococcus kunzii*. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov;35(11):2759–61.
14. Sridhar S., Chan J.F.W., Yuen K.Y.. First report of brain abscess caused by a satelliting phenotypic variant of *Helcococcus kunzii*. *J Clin Microbiol.* 2013 Oct 30;(10):370–3.
15. Facklam R., Elliott J.A.. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Oct;8(4):479–95.
16. Ruoff K.L.. Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci: emerging opportunists. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1129–33.
17. Rothschild C.M., Oaks J.L., Schaupp J.K., Rurangirwa F.R., Sellon D.C., Hines M.T.. *Helcococcus ovis* isolated from a pulmonary abscess in a horse. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):2224–6.
18. García A., Risco D., Benítez J.M., Martínez R., García W.L., Cuesta J.M., et al. *Helcococcus ovis* isolated from a goat with purulent bronchopneumonia and pulmonary abscesses. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* 2012 Jan;24(1):235–7.
19. Kutzer P., Schulze C., Engelhardt A., Wieler L.H., Nordhoff M.. *Helcococcus ovis*, an emerging pathogen in bovine valvular endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2008 Oct;46(10):3291–5.
20. Zhang Y., Cui J., Parkinson A., Hayes J., Ott K., Byrum B.. Isolation of *Helcococcus ovis* from sheep with pleuritis and bronchopneumonia. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* 2009 Jan;21(1):164–6.
21. Christensen J.J., Whitney A.M., Teixeira L.M., Steigerwalt A.G., Facklam R.R., Korner B., et al. *Aerococcus urinae* : intraspecies genetic and phenotypic relatedness. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Jan;47(1):28–32.
22. Wallet F., Loïez C., Renaux E., Lemaitre N., Courcol R.J.. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4402–6.
23. Grattarola C., Bellino C., Tursi M., Maggi E., D'Angelo A., Gianella P., et al. *Helcococcus kunzii* isolated from a sow with purulent urocystitis. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):3019–20.
24. McNicholas S., McAdam B., Flynn M., Humphreys H.. The challenges of implantable cardiac device infection due to *Helcococcus kunzii*. *J Hosp Infect.* 2011 Aug;78(4):337–8.
25. Moore K., Hall V., Paull A., Morris T., Brown S., McCulloch D., et al. Surface bacteriology of venous leg ulcers and healing outcome. *J Clin Pathol.* 2010 Sep;63(9):830–4.

26. Stanger K.M., Albert F., Kneser U., Bogdan C., Horch R.. Management of chronic osteomyelitis of the tibia with life-threatening complications under negative pressure wound therapy and isolation of *Helcococcus kunzii*. *Int Wound J*. 2013 Jul 16;
27. Locatelli C., Scaccabarozzi L., Pisoni G., Bronzo V., Casula A., Testa F., et al. *Helcococcus kunzii* and *Helcococcus ovis* isolated in dairy cows with puerperal metritis. *J Gen Appl Microbiol*. 2013;59(5):371–4.
28. Post K.W., Rushton S.D., Billington S.J.. Valvular endocarditis associated with *Helcococcus ovis* infection in a bovine. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*. 2003 Sep;15(5):473–5.
29. Seppala H., Skurnik M., Soini H., Roberts M.C., Huovinen P.. A Novel Erythromycin Resistance Methylase Gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Feb;42(2):257–62.
30. Bilk S., Nordhoff M., Schulze C., Wieler L.H., Kutzer P.. Antimicrobial susceptibilities and occurrence of resistance genes in bovine *Helcococcus ovis* isolates. *Vet Microbiol*. 2011 May 5;149(3-4):488–91.
31. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge du pied diabétique infecté. *Médecine Mal Infect*. 2007 Jan;37(1):26–50.
32. Kliem M., Sauer S.. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol*. 2012 Jun;15(3):397–402.
33. Cariello C., Tissières Lovey L.. La spectrométrie de masse MALDI-TOF et le diagnostic microbiologique. Tiré de <http://www.essante.ch/wp-content/uploads/2013/02/La-spectrométrie-de-masse-MALDI-TOF-et-le-diagnostic-microbiologique.pdf>. 2012.
34. Riegel P.. Spectrométrie de masse en routine dans un laboratoire de Microbiologie. Tiré de <http://congres.eska.fr/files/presentations/P.Riegel.pdf>. 2011.
35. Wilhelm N., Le Coustumier A., Fevrier F., Le Fleche A., Grasmick C., Grimont P.. Bactéries d'identification difficile ou non cultivables en routine: Quelles solutions? Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine. *Spectra Biol*. 2005 May;24(145):49–54.
36. Ueda K., Seki T., Kudo T., Yoshida T., Kataoka M.. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol*. 1999 Jan;181(1):78–82.
37. Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk P.. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*. 1992 Jan;42(1):166–70.

38. Poyart C., Quesnes G., Trieu-Cuot P.. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):415–8.
39. Poyart C., Berche P., Trieu-Cuot P.. Characterization of superoxide dismutase genes from gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. *FEMS Microbiol Lett.* 1995 Aug 15;131(1):41–5.
40. Poyart C., Quesne G., Coulon S., Berche P., Trieu-Cuot P.. Identification of Streptococci to Species Level by Sequencing the Gene Encoding the Manganese-Dependent Superoxide Dismutase. *J Clin Microbiol.* 1998 Jan;36(1):41–7.
41. Relman D.A.. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing, p. 489–495. In D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White, Diagnostic molecular microbiology : principles and applications. 1993.
42. Leclercq R.. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2002 Feb 15;34(4):482–92.
43. Chopra I., Roberts M.. Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Jun;65(2):232–60.
44. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E.. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Dec;47(12):3675–81.
45. Aminov R.I., Garrigues-Jeanjean N., Mackie R.I.. Molecular ecology of tetracycline resistance : development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jan 1;67(1):22–32.
46. Couillault C., Léopold Kurz C. Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire. *STAL.* 2010;36:59–74.
47. Ewbank J.J.. Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes Infect Inst Pasteur.* 2002 Feb;4(2):247–56.
48. Sifri C.D., Begun J., Ausubel F.M.. The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol.* 2005 Mar;13(3):119–27.
49. Marsh E.K., May R.C.. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Apr;78(7):2075–81.
50. Ricordeau P., Weill A., Vallier N., Bourrel R., Fender P., Allemand H.. L'épidémiologie du diabète en France métropolitaine. *Diabetes & Metabolism.* 2000 Sep;26:11–24.

51. Agarwal A.K., Singh M., Arya V., Garg U., Singh V.P., Jain V.. Prevalence of peripheral arterial disease in type 2 diabetes mellitus and its correlation with coronary artery disease and its risk factors. *J Assoc Physicians India*. 2012 Jul;60:28–32.
52. Sadrzadeh Rafie A.H., Stefanick M.L., Sims S.T., Phan T., Higgins M., Gabriel A., et al. Sex differences in the prevalence of peripheral artery disease in patients undergoing coronary catheterization. *Vasc Med Lond Engl*. 2010 Dec;15(6):443–50.
53. Dowd S.E., Delton Hanson J., Rees E., Wolcott R.D., Zischau A.M., Sun Y., et al. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *J Wound Care*. 2011 Jan;20(1):40–7.
54. Schmidt K., Debus E.S., St Jessberger, Ziegler U., Thiede A.. Bacterial population of chronic crural ulcers : is there a difference between the diabetic, the venous, and the arterial ulcer? *VASA Z Für Gefässkrankh*. 2000 Feb;29(1):62–70.
55. Grice E.A., Segre J.A.. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):244–53.
56. Matousek J.L., Campbell K.L.. A comparative review of cutaneous pH. *Vet Dermatol*. 2002;13(6):293–300.
57. Schreml S., Szeimies R.M., Karrer S., Heinlin J., Landthaler M., Babilas P.. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Apr;24(4):373–8.
58. Kurabayashi H., Tamura K., Machida I., Kubota K.. Inhibiting bacteria and skin pH in hemiplegia: effects of washing hands with acidic mineral water. *Am J Phys Med Rehabil Assoc Acad Physiatr*. 2002 Jan;81(1):40–6.
59. Lukacs A., Korting H.C., Lemke O., Ruckdeschel G., Ehret W., Braun-Falco O.. The influence of the pH-value on the growth of *Brevibacterium epidermidis* in continuous culture. *Acta Derm Venereol*. 1995 Jul;75(4):280–2.
60. Stavri H., Beveridge T.J., Moyles D., Athamna A., Doyle R.J.. Hemagglutinin of unusual specificity from *Helcococcus kunzii*. *Arch Microbiol*. 2002 Feb;177(2):197–9.
61. Percival S.L., Hill K.E., Williams D.W., Hooper S.J., Thomas D.W., Costerton J.W.. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2012 Oct;20(5):647–57.
62. James G.A., Swogger E., Wolcott R., Pulcini E., Secor P., Sestrich J., et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2008 Feb;16(1):37–44.

63. Dowd S.E., Sun Y., Secor P.R., Rhoads D.D., Wolcott B.M., James G.A., et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 2008;8:43.
64. Lipsky B.A., Berendt A.R., Cornia P.B., Pile J.C., Peters E.J.G., Armstrong D.G., et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012 Jun;54(12):e132–173.
65. Lipsky B.A.. Evidence-based antibiotic therapy of diabetic foot infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Dec;26(3-4):267–76.
66. Joukhadar C., Frossard M., Mayer B.X., Brunner M., Klein N., Siostrzonek P., et al. Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2001 Feb;29(2):385–91.
67. Raymakers J.T., Houben A.J., Heyden J.J. vd, Tordoir J.H., Kitslaar P.J., Schaper N.C.. The effect of diabetes and severe ischaemia on the penetration of ceftazidime into tissues of the limb. *Diabet Med.* 2001 Mar 1;18(3):229–34.
68. Skhirtladze K., Hutschala D., Fleck T., Thalhammer F., Ehrlich M., Vukovich T., et al. Impaired target site penetration of vancomycin in diabetic patients following cardiac surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1372–5.
69. Traunmüller F., Schintler M.V., Spendel S., Popovic M., Mauric O., Scharnagl E., et al. Linezolid concentrations in infected soft tissue and bone following repetitive doses in diabetic patients with bacterial foot infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Jul;36(1):84–6.
70. Traunmüller F., Schintler M.V., Metzler J., Spendel S., Mauric O., Popovic M., et al. Soft tissue and bone penetration abilities of daptomycin in diabetic patients with bacterial foot infections. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jun;65(6):1252–7.
71. Kim A., Suecof L.A., Sutherland C.A., Gao L., Kuti J.L., Nicolau D.P.. *In vivo* microdialysis study of the penetration of daptomycin into soft tissues in diabetic versus healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):3941–6.
72. Stewart P.S., Davison W.M., Steenbergen J.N.. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Aug 1;53(8):3505–7.
73. Smith K., Perez A., Ramage G., Gemmell C.G., Lang S.. Comparison of biofilm-associated cell survival following *in vitro* exposure of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Apr;33(4):374–8.
74. Poyart C., Bouvet A., Bingen E., Trieu-Cuot P.. Centre National de Référence des Streptocoques, rapport d'activités 2011.

75. Stein G.E., Smith C.L., Missavage A., Saunders J.P., Nicolau D.P., Battjes S.M., et al. Tigecycline penetration into skin and soft tissue. *Surg Infect.* 2011 Dec;12(6):465–7.
76. Ji A.J., Saunders J.P., Amorusi P., Wadgaonkar N.D., O’Leary K., Leal M., et al. A sensitive human bone assay for quantitation of tigecycline using LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Nov 4;48(3):866–75.
77. Rimmelé T., Boselli E., Breilh D., Djabarouti S., Bel J.C., Guyot R., et al. Diffusion of levofloxacin into bone and synovial tissues. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Mar;53(3):533–5.
78. Darley E.S.R., MacGowan A.P.. Antibiotic treatment of gram-positive bone and joint infections. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jun;53(6):928–35.
79. Schintler M.V., Traunmüller F., Metzler J., Kreuzwirt G., Spindel S., Mauric O., et al. High fosfomycin concentrations in bone and peripheral soft tissue in diabetic patients presenting with bacterial foot infection. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64(3):574–8.
80. John A.K., Baldoni D., Haschke M., Rentsch K., Schaerli P., Zimmerli W., et al. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of combination with rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jul 1;53(7):2719–24.

ANNEXE : tableaux récapitulatifs données clinico-biologiques

Tableau 30 : Synthèse des données clinico-biologiques, patients 1 à 21

| Patient | Age(années) /Sexe ^A | Site | Terrain sous-jacent | Présentation clinique | Co-isolats | ATB | Evolution |
|---------|--------------------------------|---|---|--|--|---|---|
| 1 | 85/M | Plante pied D | AOMI stade IV, Coronaropathie, carcinome urothélial stade terminal | Ostéite sur ulcère artériel | SAMS, SCN | Ofloxacine, puis ceftriaxone | Amputation pied D 1 mois après, puis décès suite à l'aggravation des lésions |
| 2 | 57/M | Plante pied D | Diabète, neuropathie périphérique | Récidive ostéo-arthrite sur mal perforant plantaire | SAMS, <i>P. aeruginosa</i> | Ceftazidime et ciprofloxacine | Amputation 2° rayon D 1 mois après |
| 3 | 84/M | Pied G (bord externe) | AOMI stade IV, Coronaropathie, AVC -> hémiplégie G, HTA, surpoids, exogénose | Ostéite sur ulcère artériel | SAMR, <i>Corynebacterium sp.</i> | Pristinamycine | ND |
| 4 | 68/M | Malléole externe D | Diabète, insuffisance veineuse, obésité morbide, HTA | Colonisation ulcère veineux, Cholécystite abcédée | SAMS | Aminoside, ceftriaxone, métronidazole | Persistance des ulcères veineux, pas d'aggravation |
| 5 | 79/F | 1er orteil D | Diabète, neuropathie périphérique, AOMI stade IV, Coronaropathie, HTA, PPR (sous corticoïdes et novatrex) | Colonisation ulcère artériel | SAMS, flore anaérobie mixte, <i>Corynebacterium sp.</i> | amc | Persistance de la plaie sans aggravation |
| 6 | 57/M | Plante pied D | Diabète, neuropathie périphérique, AOMI, obésité, Insuffisance cardiaque | Ostéite sur mal perforant plantaire | SAMS, <i>K. oxytoca</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> | amc | ND |
| 7 | 79/M | 2°orteil G (face dorsale) | Diabète, neuropathie périphérique, AOMI, Insuffisance cardiaque, exogénose | Colonisation mal perforant plantaire | <i>Enterococcus sp.</i> , <i>K. oxytoca</i> , SCN, <i>Corynebacterium sp.</i> | amc et ofloxacine | Bonne évolution |
| 8 | 53/M | Malléole interne D | Insuffisance veineuse sévère, AOMI compensée, obésité morbide, HTA | Infection superficielle d'un ulcères veineux | SAMS, <i>K. oxytoca</i> , <i>Enterococcus sp.</i> | Pristinamycine puis moxifloxacine | Bonne évolution |
| 9 | 78/M | Talon G | Diabète, neuropathie périphérique, AOMI stade IV, obésité, insuffisance cardiaque | Ostéite sur mal perforant plantaire | <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , SAMS, flore anaérobie mixte, <i>Corynebacterium sp.</i> | Aucune (refus du patient) | Plaie inchangée 3 mois après |
| 10 | 60/M | 1er orteil D | Diabète, neuropathie périphérique, AOMI stade IV, Coronaropathie, HTA | Infection superficielle d'un mal perforant plantaire | <i>P. aeruginosa</i> , SCN | Ceftazidime et tobramycine | Bonne évolution |
| 11 | 84/M | 1er orteil D (pulpe) | Diabète, AOMI, insuffisance veineuse, HTA | Ostéite sur mal perforant plantaire | SAMS, <i>Enterococcus sp.</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | Vancomycine, gentamicine, piperacilline-tazobactam | Résection phalange |
| 12 | 91/M | 2°orteil D | AOMI stade IV, Coronaropathie, HTA | Gangrène purulente d'un orteil s'étendant vers l'avant-pied | <i>E. coli</i> , flore anaérobie mixte, <i>Acinetobacter radioresistens</i> | Gentamicine et céfotaxime, puis amc et ofloxacine | Amputation transmétatarsienne des 5 rayons |
| 13 | 85/M | Malléole interne G | Coronaropathie, HTA | Phlyctène nécrotico-hémorragique avec cellulite sur plaie malléolaire post-traumatique | <i>Bacillus cereus</i> | Lévofloxacine | Bonne évolution |
| 14 | 52/M | Abcès fesse D | Diabète, surpoids | Volumineux abcès de la fesse avec nécrose cutanée et cellulite | Flore anaérobie mixte | amc, gentamicine, ofloxacine, métronidazole, puis ofloxacine et métronidazole | Bonne évolution |
| 15 | 60/F | Tumeur cutanée épaule G | Surpoids, HTA | Infection superficielle d'un mélanome ulcéro-nécrotique de l'épaule | <i>P. mirabilis</i> , <i>Bacteroides sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , SCN | ND | Bonne évolution |
| 16 | 21/F | Plante pied G | Troubles de la statique et de la sensibilité pied gauche suite à AVP | Colonisation plaie du pied | SAMS, <i>E. coli</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i> | Aucune | Bonne évolution |
| 17 | 74/M | Plante pied G Liquide drainage du trajet fistuleux | Diabète, neuropathie périphérique, AOMI, HTA | Ostéo-arthrite sur mal perforant plantaire | <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Enterococcus sp.</i> , SCN | Echec de toutes antibiothérapies | Amputation transmétatarsienne des 5 rayons, multiples récidives infectieuses de la cicatrice d'amputation |
| 18 | 37/M | Escarre sacrée | Paraplégie | Infection superficielle d'une escarre sacrée, | <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Actinobacillus sp.</i> , SCN | Ceftriaxone | Bonne évolution |
| 19 | 41/M | Plante pied D | Diabète, insuffisance veineuse, obésité morbide, HTA | Ostéite sur mal perforant plantaire | <i>M. morgani</i> , <i>P. aeruginosa</i> , SAMS, <i>S. agalactiae</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i> | Ofloxacine, puis amc | Récidive infectieuse à l'arrêt de l'amc |
| 20 | 69/F | Mollet jambe D | AOMI, Coronaropathie, AVC, HTA, polyarthrite rhumatoïde (sous Arava), prothèses de genoux bilatérales | Colonisation angiodermite nécrosante | SAMR, <i>Enterococcus sp.</i> , <i>E. coli</i> | Pristinamycine | Bonne évolution |
| 21 | 57/M | Escarres sacrée et trochantérienne G | Diabète, paraplégie, exogénose | Sepsis sévère sur escarre trochantérienne communiquant avec escarre sacrée | SAMR, <i>E. coli</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> hémoculture : <i>E. coli</i> (profil identique à escarre) | Amikacine, pipéracilline-tazobactam, puis clindamycine et cotrimoxazole | Récidive de sepsis sévère |

Tableau 31 : Synthèse des données clinico-biologiques, patients 22 à 42

| Patient | Age(années) /Sexe ^A | Site | Terrain sous-jacent | Présentation clinique | Co-isolats | ATB | Evolution |
|---------|-----------------------------------|--|---|--|--|---|---|
| 22 | 69/M | Plante pied D | Diabète, neuropathie périphérique, pied de Charcot (côté droit), AOMI, HTA, insuffisance veineuse, coronaropathie, surpoids | Ostéite pied | <i>S. agalactiae</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> | Clindamycine, amc | Bonne évolution |
| | | Plante pied D | | Colonisation mal perforant plantaire | SAMS, <i>E. coli</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> | Aucun | ND |
| | | Plante pied D | | Infection superficielle mal perforant plantaire | SAMS, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i> | Clindamycine | Aggravation de la plaie |
| 23 | 88/F | Malléole externe G | Diabète, Insuffisance veineuse, surpoids, insuffisance cardiaque | Surinfection ulcère veineux | <i>Acinetobacter ursingii</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> | Amoxicilline | Décès d'insuffisance cardiaque |
| 24 | 102/F | 3 ^o orteil G | HTA | Ischémie critique : gangrène sèche 3 ^o orteil | SAMS, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Citrobacter freundii</i> | Céfazoline | Amputation 3 ^o orteil |
| 25 | 84/M | Hémoculture | AOMI, coronaropathie, insuffisance cardiaque | Choc septique sur infection d'ulcères des pieds | SAMS, <i>Proteus sp.</i> , <i>Providencia sp.</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> | Pipéracilline-tazobactam, linézolide, métronidazole | Etat infectieux contrôlé |
| 26 | 43/M | Abcès pied D | Ethylisme | Abcès pied | <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella</i> | amc | Bonne évolution |
| 27 | 55/F | Pieds D et G | ND | Ulcères nécrotiques pieds D et G (<i>H.kunzii</i> à D et G) | SA, <i>E. cloacae</i> | Aucune | ND |
| 28 | 49/M | 5 ^o orteil D (pus profond) | Diabète, AOMI | Gangrène humide des orteils | <i>S. agalactiae</i> | Pipéracilline-tazobactam, vancomycine, puis ciprofloxacine, vancomycine | Amputation transméta 3-4-5 ^o orteils |
| 29 | 81/M | Conduit auditif G | Carcinome épidermoïde avec envahissement du conduit auditif, radiothérapie | Colonisation conduit auditif | SA, flore anaérobie mixte | Non (soins locaux) | (Soins palliatifs) |
| 30 | 68/M | Pied | Diabète, insuffisance cardiaque sévère, éthylisme | Sepsis sur mal perforant | SA Hémocultures 6/8+: SA | Vancomycine, flucloxacilline | ND |
| 31 | 82/M | Pied (biopsie osseuse) | Diabète, HTA | Ostéite suite à amputation tête M5 | Aucun | ND | ND |
| 32 | 47/F | Hanche G (pus profond) | Tumeur desmoïde fesse gauche (opérée en 1984), récidive crête iliaque : radiothérapie 60 Gy -> radiodermite | Ostéo-arthrite hanche | SA, <i>S. dysgalactiae</i> | Céfazoline, ofloxacine, puis rifampicine, céftriaxone, métronidazole | ND |
| 33 | 61/M | ND | AOMI, HTA, éthylisme, escarre sacrée | Infection superficielle ulcère artériel | ND | ND | ND |
| 34 | 63/M | Pied (écouvillon) | Diabète, neuropathie périphérique, HTA | Ostéite orteil | <i>S. agalactiae</i> | Ofloxacine et clindamycine | Amputation du 1er orteil |
| | | Biopsie | | | <i>Enterococcus sp.</i> | | |
| 35 | 85/F | 3 ^o orteil G | AOMI stade IV, diabète, HTA, insuffisance cardiaque, valvulopathie, coronaropathie | Infection superficielle plaie orteil | SARM, SCN | ND | Amputation des 3 premiers orteils G |
| 36 | 52/M | Jambe G | Maladie de Behcet, pseudo-folliculites nécrosantes, thromboses veineuses profondes et superficielles | Infection superficielle ulcère veineux | SAMS, <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Porphyromonas sp.</i> | ND | ND |
| 37 | 56/M | Plaie de néphrectomie | Adénocarcinome rein D, néphrectomie en septembre 2009 | Infection plaie chirurgicale | <i>S. lugdunensis</i> | ND | ND |
| 38 | 56/M | Abcès pied G | Goutte tophacée | Abcès pied | SAMS | ND | ND |
| 39 | 41/F | Ulcère inguinal | Adénocarcinome vulvaire -> radiothérapie, curage inguino-iliaque et résection d'une adénopathie fémorale D en janvier 2011 | Infection d'ulcère inguinal et 3 épisodes d'hémorragies aiguës de l'artère fémorale commune D (artérite radique) | <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> | ND | ND |
| 40 | 64/M | Pied | Diabète, HTA, insuffisance veineuse | Infection superficielle mal perforant plantaire | <i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> | ND | ND |
| 41 | 64/M | Pied | Pieds bots varus équien, éthylisme | Ostéite pied | ND | ND | ND |
| 42 | 63/M | Tissu mou 5 ^o orteil G (3/3 prélèvements +) | Diabète, neuropathie sévère, varices | Nécrose osseuse septique d'un orteil | SAMS | Gentamicine et clindamycine | Amputation 5 ^o orteil |

SAMS : *S. aureus* méti-sensible ; SAMR : *S. aureus* méti-résistant ; amc : amoxicilline-acide clavulanique ; ND : non documenté

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Caractères phénotypiques utilisés pour différencier entre eux les cocci à Gram positif, catalase négative. (15,16,21)..... | 14 |
| Tableau 2 : Caractères phénotypiques des 5 espèces d' <i>Helcococcus</i> (1–5) | 15 |
| Tableau 3 : Caractères obtenus avec une API 20 Strep (bioMérieux) pour <i>H. kunzii</i> et <i>H. ovis</i> (1,6,7,11–13,17)..... | 17 |
| Tableau 4 : Caractères obtenus avec une galerie Rapid ID 32 Strep (bioMérieux) pour <i>H. kunzii</i> , <i>H. ovis</i> et <i>H. sueciensis</i> (3,9,19)..... | 18 |
| Tableau 5 : Revue des cas humains d' <i>Helcococcus kunzii</i> dans la littérature (cas 1 à 10)..... | 23 |
| Tableau 6 : Revue des cas humains d' <i>Helcococcus kunzii</i> dans la littérature (cas 11 à 20)..... | 24 |
| Tableau 7 : Revue des cas d' <i>Helcococcus ovis</i> dans la littérature | 25 |
| Tableau 8 : Sensibilité des souches d' <i>Helcococcus kunzii</i> de la littérature aux antibiotiques. (CMI en µg/mL)..... | 29 |
| Tableau 9 : Sensibilité des souches d' <i>Helcococcus kunzii</i> de la littérature aux antibiotiques (tableau de synthèse) | 30 |
| Tableau 10 : Distribution des CMI de 29 souches bovines d' <i>Helcococcus ovis</i> (30) | 31 |
| Tableau 11 : Listes des souches d' <i>Helcococcus kunzii</i> utilisées dans cette étude... | 35 |
| Tableau 12 : Classification de l'infection des plaies du pied selon le Consensus International sur le Pied Diabétique (31)..... | 36 |
| Tableau 13 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des gènes <i>ermTR</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> et <i>mef(A)</i> | 47 |
| Tableau 14 : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification des gènes <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> et <i>tet(L)</i> | 48 |
| Tableau 15 : Données démographiques, sites de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 1 à 11)..... | 52 |
| Tableau 16 : Données démographiques, sites de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 12 à 21)..... | 53 |
| Tableau 17 : Données démographiques, sites de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 22 à 30)..... | 54 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 18 : Données démographiques, site de prélèvement et conditions sous-jacentes (patients 31 à 42)..... | 55 |
| Tableau 19 : Tableau récapitulatif de la démographie et conditions sous-jacentes des 42 patients | 62 |
| Tableau 20 : Caractères Vitek 2 obtenus sur 40 souches d' <i>H. kunzii</i> et sur la souche de référence DSM 10548 | 67 |
| Tableau 21 : Données clinico-biologiques (patients 1 à 11) | 69 |
| Tableau 22 : Données clinico-biologiques (patients 12 à 21) | 70 |
| Tableau 23 : Données clinico-biologiques (patients 22 à 30) | 71 |
| Tableau 24 : Données clinico-biologiques (patients 31 à 42) | 72 |
| Tableau 25 : Profil de résistance aux MLS et aux fluoroquinolones de 2 souches isolées chez le patient 22..... | 81 |
| Tableau 26 : Distribution des CMI pour 40 souches cliniques d' <i>H. kunzii</i> et la souche de référence DSM 10548 | 82 |
| Tableau 27 : Sensibilité des 41 souches dont la souche de référence | 83 |
| Tableau 28 : Antibiothérapie et évolution de la plaie (patients 1 à 21) | 84 |
| Tableau 29 : Antibiothérapie et évolution de la plaie (patients 22 à 42) | 85 |
| Tableau 30 : Synthèse des données clinico-biologiques, patients 1 à 21..... | 113 |
| Tableau 31 : Synthèse des données clinico-biologiques, patients 22 à 42..... | 114 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Dendrogramme montrant les relations entre les <i>Helcococcus</i> et les espèces proches. Cet arbre a été construit à partir de l'alignement des séquences des gènes <i>rrs</i> (ARNr 16S) (1327 nucléotides). (3)..... | 7 |
| Figure 2 : Dendrogramme construit à partir de la comparaison des profils électrophorétiques des protéines cellulaires de <i>H. sueciensis</i> , <i>H. kunzii</i> , <i>H. ovis</i> et de micro-organismes apparentés. (3) | 8 |
| Figure 3 : Principe d'ionisation pour la technique MALDI (33)..... | 39 |
| Figure 4 : Technique temps de vol (34) | 40 |
| Figure 5 : Schéma de préparation de l'échantillon (33) | 40 |
| Figure 6 : Sites d'isolement des souches incluses dans l'étude | 56 |
| Figure 7 : Types de plaies hébergeant <i>H. kunzii</i> | 58 |
| Figure 8 : Quantification des colonies d' <i>H. kunzii</i> | 59 |
| Figure 9 : Répartition par classe d'âge et par sexe des 42 patients inclus | 60 |
| Figure 10 : Comorbidités des 42 patients inclus..... | 61 |
| Figure 11 : Photographie gélose ANC après 72 h d'incubation, isolat du patient 8 (+ <i>S. aureus</i> , <i>K. oxycota</i> , <i>Enterococcus</i> sp.) | 63 |
| Figure 12 : Photographie gélose ANC après 72 h d'incubation, isolat du patient 17 (+ <i>Enterococcus</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp., <i>K. oxycota</i> , <i>Corynebacterium</i> sp.) | 63 |
| Figure 13 : Photographie gélose COS après 4 jours d'incubation en anaérobiose (gauche) et en aérobie (droite), isolat du patient 17 (+ <i>Enterococcus</i> sp., SCN) | 64 |
| Figure 14 : Photographie gélose COS après 72 h d'incubation en anaérobiose (gauche) et en aérobie (droite), isolat du patient 4 (+ <i>S. aureus</i>) | 64 |
| Figure 15 : Photographie gélose ANC (72 h d'incubation), satellitisme autour d'une souche de SCN (isolat du patient 13) | 65 |
| Figure 16 : Photographie réisolement sur COS (48 h d'incubation), isolat du patient 20..... | 65 |
| Figure 17 : Photographie coloration de Gram, isolat du patient 17 (grossissement x100)..... | 65 |
| Figure 18 : Présentation clinique au moment de l'isolement d' <i>H. kunzii</i> | 73 |

| | |
|---|----|
| Figure 19 : Valeur de la CRP (mg/L) au moment de l'isolement d' <i>H. kunzii</i> (par tranche de 50 mg/L)..... | 74 |
| Figure 20 : Nombre de PNN (G/L) au moment de l'isolement d' <i>H. kunzii</i> (par tranche de 5 G/L)..... | 74 |
| Figure 21 : Nombre de co-isolats associés à <i>H. kunzii</i> | 75 |
| Figure 22 : Répartition des différents co-isolats..... | 77 |

ABSTRACT

Clinical significance, bacterial identification and antimicrobial susceptibility of *Helcococcus kunzii*, through a review of 42 patients.

Helcococcus kunzii, first species of the genus, described in 1993, is recovered, rarely, from lower-extremity wounds. This study present the largest series of *H. kunzii*, with 46 isolates recovered from 42 patients in 3 hospitals (Cahors, Toulouse and Caen).

Strains were identified with Vitek2 ID-GP card, MALDI Biotyper and sequencing *rrs* or *sodA* genes. MIC of 19 antimicrobials were determined for 40 isolates by the broth microdilution method. Presence of genes encoding for macrolides-lincosamides-streptogramins B (MLS) et tetracyclines (T) resistance were sought by PCR-sequencing.

34 isolates (81%) were recovered from lower-extremity chronic wounds with 21 isolates (50%) from diabetic foot ulcers. Incidence of *H. kunzii* in diabetic foot ulcer samples from 2008 to 2013 in Cahors laboratory was 1,9%. In this study, a single strain was isolated in pure culture.

36 wounds showed clinical signs of infection : 15 superficial infections, 18 deep infections and 3 sepsis (but *H. k.* isolated from blood cultures in only one case).

About antimicrobial susceptibilities, a high MIC for both erythromycin and clindamycin (>256 µg/mL) was detected in 10 isolates (24 %), systematically associated with the *ermTR* gene. Increased tetracycline MIC (MIC=16 µg/mL) was found in 2 isolates (5%), both carried the *tetM* gene.

H. kunzii colonize chronic wound, especially those of lower-extremities, and can, from this portal of entry, cause deep infections.

PLACE DES *HELCOCOCCUS* EN CLINIQUE HUMAINE

Revue sur une série de 42 patients du CH de Cahors, du CHU de Toulouse et du CHU de Caen

Toulouse, le 4 avril 2014

Helcococcus kunzii, décrit en 1993 et espèce princeps du genre, est isolé, rarement, au niveau de plaies des membres inférieurs. Notre travail présente la plus importante série d'*H. kunzii*, avec 46 souches isolées chez 42 patients dans 3 centres hospitaliers (Cahors, Toulouse et Caen).

Les souches ont été identifiées avec la carte ID-GP de l'automate Vitek 2, en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (système Microflex LT, Bruker Daltonics) et confirmées par le séquençage des gènes *rrs* ou *sodA*. Les CMI de 19 antibiotiques ont été déterminées par microdilution, selon les recommandations de l'EUCAST. Les gènes de résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines B (MLS) et tétracyclines (T) ont été recherchés par PCR-séquençage.

34 souches (81 %) étaient issues de prélèvements de plaies chroniques des membres inférieurs dont 21 souches (50 %) issues de plaies diabétiques. L'incidence d'*H. kunzii* dans les prélèvements de pieds diabétiques au laboratoire de Cahors entre 2008 et 2013 était de 1,9 %. Des signes infectieux plus ou moins marqués étaient présents lors de l'isolement du germe dans 36 cas : 15 infections superficielles, 18 infections atteignant des structures sous-cutanées et 3 sepsis (mais *H. k.* isolé dans les hémocultures dans un seul cas). 8 souches ont été isolées au niveau de plaies sans signe infectieux. Une seule souche a été retrouvée en culture pure.

Concernant la sensibilité aux antibiotiques, 10 souches (24 %) présentaient une résistance acquise à haut niveau à l'érythromycine et à la clindamycine (CMI > 256 µg/mL), celle-ci était systématiquement associée au gène *ermTR*. Les 2 souches (5 %) qui présentaient une résistance acquise à la tétracycline portaient le gène *tet(M)*.

H. kunzii, commensal cutané des membres inférieurs atteints de troubles trophiques, est présent en tant que colonisateur au niveau des plaies chroniques et peut être impliqué à partir de ces portes d'entrée cutanée dans des infections profondes.

Discipline administrative : BIOLOGIE MEDICALE

Mots-Clés : *Helcococcus* – plaies chroniques – membres inférieurs – prélèvements polymicrobiens – commensale cutané – pathogène opportuniste – gène *ermTR*

Université Toulouse III – 118 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04

Directeur de Thèse : LE COUSTUMIER Alain