

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 02 juin 2020  
Par M<sup>elle</sup> Pauline Coulon**

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Apport diagnostique de la détection par PCR des facteurs  
de virulence de *Staphylococcus epidermidis* dans les  
infections sur prothèses ostéo-articulaires**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Docteur Magali CHABE (Faculté de Pharmacie de Lille)

**Assesseur(s) :** Madame le Docteur Anne VACHEE (CH de Roubaix)  
Monsieur le Professeur Henri MIGAUD (CHU de Lille)  
Monsieur le Professeur Éric SENNEVILLE (CH de Tourcoing)

**Directeur de mémoire :** Madame le Docteur Marie TITECAT (CHU de Lille)



Faculté de Pharmacie  
de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective :	Régis BORDET
Vice-présidente ressources :	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL

Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique

Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	<i>Baptiste</i>	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeurs Associés - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

## Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

## AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

## ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

## Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière



Faculté de Pharmacie  
de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

# REMERCIEMENTS

---

A ma présidente de jury :

**Madame le Docteur Magali CHABE**

*Maitre de conférences en Parasitologie  
Faculté de pharmacie de Lille*

Je suis très touchée que vous ayez accepté de présider ce jury. Merci de vous intéresser à ce travail.

A mes juges :

**Madame le Docteur Anne VACHEE**

*Praticien hospitalier  
Laboratoire de microbiologie  
CH de Roubaix*

Merci pour avoir accepté sans hésitation et avec enthousiasme de faire partie de ce jury de thèse.

**Monsieur le Professeur Henri MIGAUD**

*Praticien hospitalier – Professeur des universités  
Service d'Orthopédie – Traumatologie  
CHU de Lille*

Merci d'apporter à ce jury votre expertise en tant que chirurgien orthopédiste. C'est un honneur pour moi de vous présenter ce travail.

**Monsieur le Professeur Éric SENNEVILLE**

*Praticien hospitalier – Professeur des universités  
Service Universitaire des maladies infectieuses et du voyageur  
CH de Tourcoing*

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse d'exercice. Recevez ici le témoignage de mon profond respect.

A ma directrice de thèse :

**Madame le Docteur Marie TITECAT**

*Praticien hospitalier universitaire  
Service de Bactériologie  
CHU de Lille*

Je te remercie tout d'abord de m'avoir transmis ta passion pour la bactériologie. Un grand merci de m'avoir accompagné dans ce travail : merci pour ta patience, ta rigueur scientifique et tes encouragements.

Je tiens également à remercier tout particulièrement :

**Christophe** et **N. Helevaut**, **Laure**, **Sylvie** et **Sébastien** pour leur aide précieuse concernant la réalisation de la partie technique de ce travail. Merci pour vos conseils.

Merci au **Docteur Baudoux** et au **Docteur Neut** de m'avoir confié les souches isolées d'ostéites et d'avoir pris le temps de me rencontrer.

Merci à **C. Ternynck** pour la réalisation des analyses statistiques.

Je tiens à remercier **Monsieur le Professeur Sendid**, pour m'avoir suivie, encouragée et avoir toujours su trouver les mots justes pour m'accompagner au long de mon internat et de mon Master 2.

J'en profite pour remercier chaleureusement tous les **techniciens** et les **secrétaires** que j'ai rencontrés au cours de mes différents semestres au CHU de Lille, au CH de Lens et de Valenciennes. Merci d'avoir fait en sorte que chaque semestre soit riche d'apprentissage professionnel et de rencontres humaines. Un grand merci aux **biologistes**, notamment aux bactériologues, virologues et parasitologues – mycologues qui m'ont tant appris.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui me soutiennent depuis le début :

**Papa** et **Maman**, merci pour votre présence et votre soutien depuis mes premiers pas à la Faculté de Pharmacie d'Angers. Promis, les études c'est bientôt fini.

**Camille**, tu es mon modèle. Sache que sans toi, j'aurais déjà 1 000 fois baissé les bras. Merci d'être là à chacune des étapes importantes de ma vie.

Enfin, merci à toute ma **famille** : j'ai de la chance d'être si bien entourée.

Merci à mes **copines de la Faculté de Pharmacie d'Angers** : tout a commencé avec vous sur les bancs de la Faculté. Votre amitié m'est plus que précieuse.

Merci à **Lucie** pour ton amitié indéfectible.

Merci à tous les **externes**, **internes** et maintenant **biologistes** avec qui j'ai eu la chance de vivre mon internat. Une dédicace spéciale à **Félix**, **Lucie** et **Marie** : merci d'être devenus plus que des co-internes au fil de ces années. Merci à **Alice** et **Zoé** de m'avoir soutenue durant le semestre de rédaction de ma thèse.

Merci à l'**équipe 2 du LIRIC** : merci de m'avoir si vite intégrée au sein de votre laboratoire et d'avoir fait que cette année de recherche soit un réel plaisir.

Enfin, merci à **Olivier**. Ta présence à mes côtés est la plus belle chose qui me soit arrivée au cours de mon internat.

# TABLES DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS .....	1
TABLES DES MATIERES .....	3
TABLE DES FIGURES .....	6
TABLE DES TABLEAUX .....	7
INTRODUCTION .....	9
I. <i>S. epidermidis</i> : une bactérie commensale de l'homme .....	10
A. <i>Analyse de la flore cutanée par microbiologie conventionnelle et par technique moléculaire</i> .....	10
B. <i>Adaptation de S. epidermidis au microenvironnement cutané</i> .....	11
C. <i>Rôle protecteur de S. epidermidis au sein du microenvironnement cutané</i> . 12	
II. <i>S. epidermidis</i> et son implication en clinique .....	13
A. <i>Epidémiologie générale des infections à S. epidermidis</i> .....	13
B. <i>S. epidermidis dans les infections ostéo-articulaires sur matériel</i> .....	14
a) Généralité sur les infections ostéo-articulaires sur matériel .....	14
(i) Définitions .....	14
(ii) Présentation clinique .....	14
(iii) Projection du nombre d'arthroplasties dans le futur.....	15
b) Bactériologie des infections ostéo-articulaires .....	16
c) Diagnostic des infections ostéo-articulaires sur matériel.....	19
d) Issue des infections ostéo-articulaires à <i>Staphylococcus spp</i> .....	20
C. <i>Ostéite du pied diabétique : quelle est l'imputabilité du S. epidermidis ?</i> ....	22
a) Généralités sur les ostéites du pied diabétique.....	22
b) Bactériologie des ostéites .....	23
D. <i>Physiopathologie générale des infections à S. epidermidis</i> .....	24
III.  Formation du biofilm de <i>S. epidermidis</i> : bases moléculaires.....	25
A. <i>Le biofilm : le facteur de virulence de S. epidermidis</i> .....	25
a) Définition du biofilm.....	25
b) Les différentes étapes de la formation du biofilm .....	26
c) Rôles et caractéristiques du biofilm.....	27
B. <i>Bases moléculaires de la formation du biofilm</i> .....	27
a) Attachement aux surfaces abiotiques .....	27
(i) Protéines de surface non covalentes .....	28

(ii)	Protéines de surface covalentes.....	28
(iii)	Acides téichoïques.....	28
b)	Attachement aux surfaces biotiques .....	29
(i)	Protéines de surface non covalentes .....	29
(ii)	Protéines de surface covalentes.....	29
(iii)	Acides téichoïques.....	29
c)	Phases de prolifération et de maturation.....	30
(i)	Biofilm polysaccharidique .....	30
(ii)	Adhésines protéiques .....	32
d)	Phases de détachement.....	32
(i)	Enzymes extracellulaires : .....	32
(ii)	PSMs .....	32
PROBLEMATIQUE.....		34
MATERIELS ET METHODES .....		36
I.	Collection de <i>S. epidermidis</i> .....	36
A.	<i>Souches isolées de prothèses ostéo-articulaires et souches témoins</i> .....	36
B.	<i>Collection de souches d'ostéite de pieds diabétiques</i> .....	36
C.	<i>Souche de référence</i> .....	37
II.	Culture bactérienne et identification .....	37
III.	Extraction de l'ADN .....	37
IV.	Polymerase-chain reaction (PCR) .....	38
A.	<i>Choix des gènes</i> .....	38
B.	<i>Préparation des amorces</i> .....	38
C.	<i>Mise au point de la technique d'amplification</i> .....	38
D.	<i>Réalisation des PCR</i> .....	40
V.	Recueil des données cliniques et épidémiologiques .....	40
VI.	Analyses statistiques.....	41
RESULTATS .....		42
I.	Adaptation technique sur le thermocycleur QuantStudio 7 .....	42
A.	<i>Validation des amorces utilisées</i> .....	42
B.	<i>Optimisation des conditions de réaction</i> .....	42
C.	<i>Validation technique sur QuantStudio</i> .....	42
II.	Description des groupes étudiés .....	43

III.	Apport diagnostique de l'identification des facteurs de pathogénicité de <i>S. epidermidis</i> dans les infections sur matériel .....	43
A.	<i>Statistiques descriptives démographiques des patients des groupes Infection ostéo-articulaire et Contamination</i> .....	43
B.	<i>Statistiques descriptives des prélèvements microbiologiques effectués chez les patients des groupes Infection ostéo-articulaire et Contamination</i> .....	44
a)	Cultures .....	44
b)	Sensibilité aux antibiotiques .....	45
C.	<i>Distribution des gènes aap, embp, IS256, SE1875, lcaA, lcaD, bhp, SE2251 et QacA au sein des groupes IOA, Contamination et Témoin</i> .....	45
D.	<i>Comparaison de fréquence des gènes aap, embp, IS256, SE1875, lcaA, lcaD, bhp, SE2251 et QacA dans les groupes IOA versus Contamination et Témoin.</i>	47
a)	Analyses statistiques : tests de comparaison de fréquence .....	47
b)	Analyses statistiques : critères composites .....	49
E.	<i>Corrélation génotype et issue clinique</i> .....	50
IV.	Identification des facteurs de pathogénicité de <i>S. epidermidis</i> dans les ostéites du pied diabétique .....	51
A.	<i>Description clinique du groupe ostéite</i> .....	51
B.	<i>Distribution des gènes aap, embp, IS256, SE1875, lcaA, lcaD, bhp, SE2251 et QacA au sein du groupe ostéite</i> .....	53
C.	<i>Comparaison de fréquence des gènes aap, embp, IS256, SE1875, lcaA, lcaD, bhp, SE2251 et QacA dans le groupe Ostéite versus Témoin</i> .....	53
	DISCUSSION .....	54
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	61
	BIBLIOGRAPHIE .....	62

# TABLE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> - Rôles de <i>S. epidermidis</i> au sein du microenvironnement cutané .....	13
<b>Figure 2</b> - Nombre d'arthroplasties de hanches et de genoux réalisées entre 1989 et 2007 aux Etats-Unis d'après les données du CDC (Figure A) et nombre d'infections survenues (Figure B) .....	16
<b>Figure 3</b> - Persistance du biofilm au contact de la prothèse .....	25
<b>Figure 4</b> - Apparence de colonies de la souche de SCN KH11 à la surface d'un cathéter en polyéthylène.....	25
<b>Figure 5</b> - Image de microscopie électronique d'un biofilm de <i>S. epidermidis</i> formé à la surface de chevilles de polystyrène (McCann et al., 2008).....	26
<b>Figure 6</b> - Formation du biofilm chez <i>S. epidermidis</i> .....	27
<b>Figure 7</b> - Structure du PIA .....	30
<b>Figure 8</b> - La synthèse du PIA .....	31
<b>Figure 9</b> - Surface cellulaire de <i>S. epidermidis</i> .....	33
<b>Figure 10</b> - Schéma synthétique des populations étudiées.....	43

# TABLE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau I</b> - Distribution topographique des bactéries isolées des régions cutanées humides .....	11
<b>Tableau II</b> - Classification et présentation clinique des infections sur prothèses ostéo-articulaires .....	15
<b>Tableau III</b> - Principales espèces bactériennes impliquées dans les infections ostéo-articulaires sur prothèse de hanche et de genou .....	17
<b>Tableau IV</b> - Principales bactéries isolées dans les infections ostéo-articulaires sur matériel (< 3 mois après la pose de la prothèse).....	17
<b>Tableau V</b> - Microorganismes responsables d'infections retardées sur prothèse ostéo-articulaires .....	18
<b>Tableau VI</b> - Distribution des isolats bactériens responsables d'infections ostéo-articulaires entre 2002 et 2011 dans le service de traumatologie du CHU de Lille...	18
<b>Tableau VII</b> – Critères proposés pour définir une infection sur prothèse .....	19
<b>Tableau VIII</b> - Corrélation entre les prélèvements superficiels et les prélèvements osseux dans le cadre du diagnostic d'une ostéite .....	23
<b>Tableau IX</b> - Composition moléculaire d'un biofilm .....	26
<b>Tableau X</b> - Tableau récapitulatif des différentes molécules impliquées dans la formation du biofilm .....	33
<b>Tableau XI</b> - Rapport de synthèse des oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR.....	39
<b>Tableau XII</b> - Volumes réactionnels finaux utilisés pour les réactions de PCR .....	40
<b>Tableau XIII</b> - Caractéristiques démographiques des patients des groupes IOA et contamination .....	44
<b>Tableau XIV</b> – Pourcentages de résistance à l'oxacilline, à la rifampicine et à la gentamicine des souches des groupes IOA et contamination .....	45
<b>Tableau XV</b> - Corrélation entre la présence des gènes <i>IcaA</i> et <i>IcaD</i> .....	46
<b>Tableau XVI</b> – Distribution des gènes <i>aap</i> , <i>embp</i> , <i>IS256</i> , <i>SE1875</i> , <i>IcaA</i> , <i>IcaD</i> , <i>bhp</i> , <i>SE2251</i> et <i>QacA</i> au sein des groupes IOA, contamination et témoin.....	48
<b>Tableau XVII</b> - Comparaison intra-groupe pour <i>IS256</i> .....	48
<b>Tableau XVIII</b> - Comparaison intra-groupe pour <i>bhp</i> .....	48
<b>Tableau XIX</b> - Comparaison intra-groupe pour <i>QacA</i> .....	49
<b>Tableau XX</b> - Tableau de contingence selon le critère composite « Biofilm ».....	49

<b>Tableau XXI</b> - Tableau de contingence selon le critère composite « <i>IS256 + bhp + QacA</i> » .....	50
<b>Tableau XXII</b> - Répartition des gènes en fonction de l'état "Guéri" ou "Non guéri" ..	51
<b>Tableau XXIII</b> – Caractéristiques cliniques des patients du groupe Ostéite .....	52
<b>Tableau XXIV</b> - Distribution des gènes <i>aap</i> , <i>embp</i> , <i>IS256</i> , <i>SE1875</i> , <i>IcaA</i> , <i>IcaD</i> , <i>bhp</i> , <i>SE2251</i> et <i>QacA</i> au sein des groupes ostéite et témoin .....	53
<b>Tableau XXV</b> - Prévalence du locus <i>ica</i> (données de la littérature) .....	55

# INTRODUCTION

---

Le genre *Staphylococcus* comprend plus de 40 espèces, qui diffèrent dans leur potentiel de virulence vis-à-vis de l'homme et des animaux. La plupart des Staphylocoques sont isolés de la peau ou des muqueuses des hommes, des mammifères et des oiseaux, où ils sont présents en tant que commensaux ou colonisateurs temporaires de leur hôte (Rosenstein and Götz, 2013). L'espèce *S. aureus*, bien que présente à l'état de commensal chez 30% de la population à l'âge adulte, est l'espèce avec le plus haut potentiel infectieux. Son pouvoir pathogène varie d'infections cutanées superficielles (folliculites, furoncles, impétigos, ...) à des manifestations cliniques très sévères (bactériémies, endocardites, ostéomyélites, fasciite nécrosante,...) (Jenul and Horswill, 2018).

Les Staphylocoques à coagulase-négative (SCNs) diffèrent de *S. aureus* par leur incapacité à produire une coagulase. Première espèce de SCNs identifiée en 1880 par Pasteur et Ogston (Ogston, 1881), initialement appelée *Staphylococcus albus*, l'espèce *Staphylococcus epidermidis* est la plus courante au sein des SCNs isolés en pratique clinique. Elle est historiquement présentée comme une bactérie inoffensive, résidente de la peau et des muqueuses. Elle est considérée le plus souvent par les microbiologistes comme un contaminant des milieux de cultures. Cependant - au sein des SCNs - *S. epidermidis* est l'espèce qui cause le plus d'infections (Rogers *et al.*, 2009; Otto, 2009; Becker *et al.*, 2014). En effet, dans certaines conditions – le plus souvent suite à l'implantation de dispositifs médicaux – elle possède la capacité d'évoluer d'une forme commensale vers une forme invasive, et provoque alors des infections graves (Büttner *et al.*, 2015). L'augmentation du nombre de patients vulnérables (patients hospitalisés au long cours, patients porteurs de dispositifs médicaux) a accru le risque général de développer des infections sévères à *S. epidermidis* (Heilmann *et al.*, 2019).

La virulence de *S. epidermidis* repose essentiellement sur sa capacité à former du biofilm sur les surfaces métalliques, les polymères et les tissus. Au cours des dernières décennies, des avancées quant à la connaissance des bases moléculaires nécessaires à la formation du biofilm ont été menées. Ces études, encore incomplètes, permettent d'avancer des hypothèses sur la mécanistique développée par cette espèce pour passer d'une forme commensale à une forme pathogène pour l'homme. A terme, elles pourraient permettre l'identification d'un marqueur permettant de discriminer rapidement les isolats commensaux des isolats pathogènes.

Au cours de la partie introductive de ce travail, nous détaillerons la dualité de *S. epidermidis* en décrivant sa place au sein de la flore cutanée avant de resituer son implication en pathologie humaine. Nous nous focaliserons sur son implication au sein des infections ostéo-articulaires sur matériel et des ostéites du pied diabétique, qui sont les deux populations de notre étude. Nous détaillerons ensuite les éléments génétiques qui conditionnent la virulence des souches de *S. epidermidis*, en insistant sur ceux qui ont fait l'objet d'une étude lors de ce travail.

## **I. *S. epidermidis* : une bactérie commensale de l'homme**

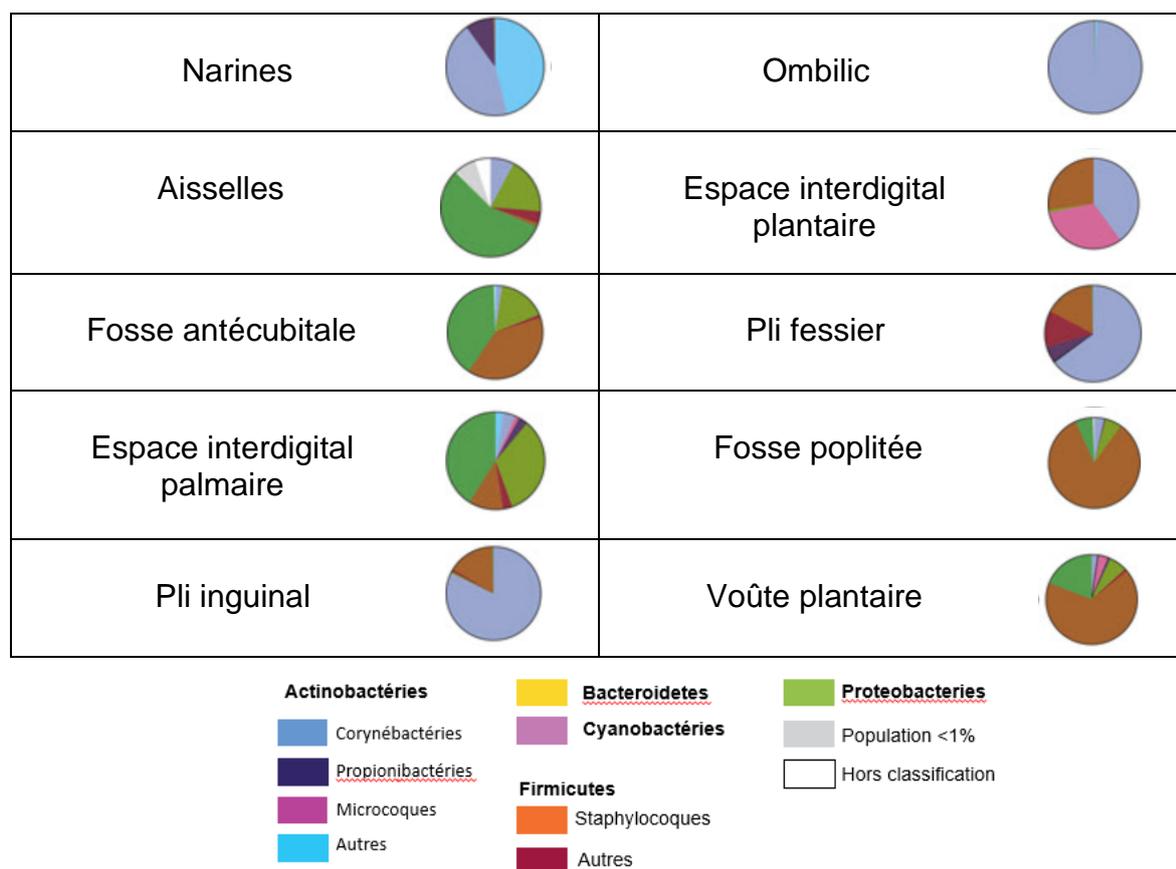
### **A. Analyse de la flore cutanée par microbiologie conventionnelle et par technique moléculaire**

La peau, barrière physique et interface avec l'environnement extérieur, est colonisée physiologiquement par une multitude de microorganismes. L'importance de la colonisation cutanée de l'homme à *S. epidermidis* est connue depuis des décennies. Ainsi, dès 1975, Kloos et Musselwhite à l'aide de techniques de culture standard relèvent que les espèces de Staphylocoques majoritairement isolées de la peau humaine (narines, aisselles, tête, jambes, bras) sont *S. epidermidis* et *S. hominis*, suivies par les espèces *S. haemolyticus*, *S. capitis* et *S. aureus* (Kloos and Musselwhite, 1975). Les genres *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Brevibacterium* et *Micrococcus* sont également décrits comme appartenant à la flore cutanée (Roth and James, 1988). Les études basées sur la microbiologie conventionnelle (méthode de culture et de comptage des bactéries vivantes) sous-estiment la réelle variété de la flore cutanée. La microbiologie conventionnelle a en effet ses limites, puisque seules les espèces capables de croître dans les conditions classiques au laboratoire sont détectées. L'avènement des techniques de biologie moléculaire (nouveaux outils de séquençage) a permis de révéler la diversité de l'écologie cutanée humaine et d'introduire le terme de microbiote cutané (Grice *et al.*, 2009). Le microbiote cutané désigne l'ensemble des bactéries, levures et virus qui colonisent la peau humaine (Byrd *et al.*, 2018). Quantitativement, le nombre de SCNs sur une peau humaine est estimé entre 10 et 10<sup>5</sup> CFU / cm<sup>2</sup>. Un adulte sain héberge entre 10 à 24 souches différentes de *S. epidermidis* (Rogers *et al.*, 2009).

Les études moléculaires ont également mis en avant la variabilité du microbiote en fonction des sites anatomiques étudiés. En effet, la colonisation cutanée dépend de la physiologie du site anatomique, avec des bactéries adaptées à un microenvironnement humide, d'autres à un microenvironnement sec ou encore sébacé.

*Cutibacterium* est ainsi le genre dominant au niveau des zones sébacées. *Staphylococcus* et *Corynebacterium* sont les genres bactériens colonisant majoritairement les zones humides (**Tableau I**). Au niveau des zones sèches, il y a une plus grande variabilité bactérienne, avec la présence des phyla suivants : *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Grice and Segre, 2011).

**Tableau I** - Distribution topographique des bactéries isolées des régions cutanées humides



Les communautés cutanées bactériennes sont propres à un site anatomique. Les Staphylocoques sont isolés des niches humides.

La flore cutanée est donc dominée par les genres *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, *Micrococcus* et *Corynebacterium* (Christensen and Brüggemann, 2014). Les SCNs sont des commensaux majeurs de la flore cutanée humaine. L'espèce *S. epidermidis* est l'une des espèces les plus fréquemment isolées de l'épithélium humain.

#### B. Adaptation de *S. epidermidis* au microenvironnement cutané

Les contraintes écologiques liées à l'environnement cutané spécifique (température inférieure à 37°C, humidité, pH acide, richesse lipidique) limitent la colonisation cutanée et l'implantation d'espèces potentiellement pathogènes. La peau comporte de surcroît des mécanismes de défense permettant de lutter contre l'implantation de

microorganismes. Le principal est la production de peptides cutanés anti-microbiens (AMPs pour skin tissue-derived AntiMicrobials Peptides). Ces peptides anti-microbiens contrôlent la croissance des microorganismes qui résident à la surface cutanée (Nakatsuji *et al.*, 2017).

Les espèces du genre *Staphylococcus* ont développé différentes stratégies pour s'adapter à ce microenvironnement particulier. Les Staphylocoques sont halotérants et donc capables de survivre dans un environnement riche en sel (sueur). Ils peuvent également utiliser l'urée contenue dans la sueur comme source de nitrogène (Byrd *et al.*, 2018). Un des exopolymères produit par *S. epidermidis* (l'acide poly- $\gamma$ -glutamique ou PGA) promeut ainsi la croissance de *S. epidermidis* au sein d'un environnement riche en sel (Kocianova *et al.*, 2005; Otto, 2009).

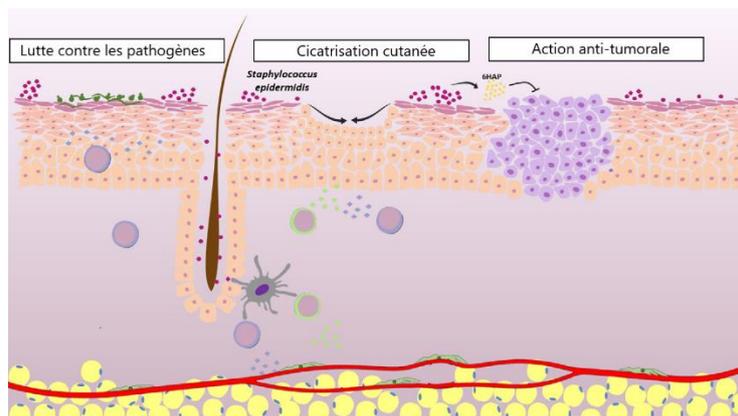
Les polysaccharides présents en large majorité au sein du biofilm de *S. epidermidis* forment une barrière physique qui va gêner l'action des polynucléaires neutrophiles, le dépôt du complément, ou encore l'opsonisation par les immunoglobulines (Christensen and Brüggemann, 2014). La résistance aux peptides anti-microbiens cutanés est également médiée par la protéase SepA (Christensen and Brüggemann, 2014).

### C. Rôle protecteur de *S. epidermidis* au sein du microenvironnement cutané

Au sein de son habitat naturel, *S. epidermidis* est nécessaire au maintien de l'homéostasie locale, bien que son rôle reste encore incomplètement investigué (Grice and Segre, 2011). Le regroupement, la stabilité et les fonctions de cette communauté microbienne sont médiés par des facteurs d'hôte mais également par les interactions qui existent entre l'ensemble de ces microorganismes. La présence des bactéries commensales permet de lutter contre l'implantation des bactéries pathogènes (notion de corrélation négative). Les exemples montrant l'intérêt de la colonisation cutanée à *S. epidermidis* sont multiples et synthétisés dans la **Figure 1**.

Certaines souches de *S. epidermidis* expriment une endopeptidase (Esp) et inhibent la formation du biofilm de *S. aureus*. Esp est une sérine protéase (Sabaté Brescó *et al.*, 2017) dégradant des protéines nécessaires à la formation du biofilm de *S. aureus* et à l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte. Il a été montré que la présence de souches de *S. epidermidis* sécrétrices d'Esp dans la cavité nasale d'humains volontaires était corrélée à l'absence de *S. aureus* au niveau nasal. Cette observation a par la suite été confirmée au cours d'études *in-vivo*, où il a été établi que

les souches de *S. epidermidis* sécrétrices d'Esp éliminent la colonisation nasale à *S. aureus* dans un modèle murin (Iwase *et al.*, 2010; Sugimoto *et al.*, 2013).



**Figure 1** - Rôles de *S. epidermidis* au sein du microenvironnement cutané (d'après Leonel *et al.*, 2019)

*S. epidermidis* est la principale bactérie à Gram-positif qui colonise la peau. Outre son rôle pour limiter l'implantation de microorganismes pathogènes, sa présence serait associée à une meilleure cicatrisation et à une diminution de la formation de tumeur cutanée dans un modèle murin (Nakatsuji *et al.*, 2018).

Longtemps décrit comme un microorganisme commensal, *S. epidermidis* est maintenant reconnu comme un important pathogène opportuniste.

## II. *S. epidermidis* et son implication en clinique

### A. Epidémiologie générale des infections à *S. epidermidis*

*S. epidermidis* est la bactérie la plus fréquemment responsable d'infections associées aux soins (Gomes *et al.*, 2014). Une infection est dite associée aux soins si elle survient au décours d'une prise en charge d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge (CTINILS, 2007). Les infections dans lesquelles sont impliquées *S. epidermidis* sont variées et essentiellement liées à la présence de dispositifs médicaux. Ainsi, *S. epidermidis* est fréquemment isolé au décours d'infections sur cathéter intravasculaire, d'infections sur greffe vasculaire, d'endocardites et d'infections sur pacemaker, d'infections sur valves de dérivation du système nerveux central ou encore d'infections sur d'autres dispositifs médicaux (notamment les lentilles intra-oculaires, les implants mammaires, les sondes urinaires) (Rogers *et al.*, 2009). *S. epidermidis* est également responsable d'infections du site opératoire.

Les manifestations cliniques des infections à SCNs se démarquent de celles dues à *S. aureus*. Le plus souvent, le tableau clinique est subtil et aspécifique et l'évolution de l'infection est rarement aiguë (Eiff *et al.*, 2002).

## B. S. epidermidis dans les infections ostéo-articulaires sur matériel

### a) *Généralité sur les infections ostéo-articulaires sur matériel*

#### (i) Définitions

L'arthroplastie est le traitement chirurgical qui consiste au remplacement total ou partiel d'une articulation. Les principales indications de la pose de prothèses articulaires sont l'arthrose, la survenue d'un traumatisme, l'ostéonécrose. La pose d'une prothèse est un geste chirurgical qui améliore nettement la qualité de vie des patients en permettant une excellente restauration fonctionnelle et une diminution des douleurs. Les prothèses articulaires sont composées de pièces dites fixes, qui sont scellées ou impactées dans les os et de pièces de connexion entre les deux composants qui forment le couple de frottement (Bodard *et al.*, 2019 ; Collège Français des Chirurgiens Orthopédistes et Traumatologues, 2019).

Le terme d'infections ostéo-articulaires désigne un ensemble d'entités cliniques ayant en commun l'invasion et la destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par des microorganismes. La présence de matériel orthopédique augmente le risque d'infections ostéo-articulaires (Valour, 2014).

L'infection à la suite d'une implantation de prothèse est un évènement rare mais redouté, étant donné les difficultés de prise en charge engendrées. En France, la surveillance des infections sur site opératoire se fait dans le cadre du réseau RAISIN (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales). Grâce à ce réseau, le taux d'incidence des infections sur prothèse de hanche (PTH) ou prothèse de genou (PTG) a pu être estimé. Il était de 0,60% pour les PTH ; 1,53% pour les prothèses partielles de hanche et de 0,34% pour les PTG en 2010 (HAS, 2014).

#### (ii) Présentation clinique

La présentation clinique des infections ostéo-articulaires sur matériel dépend du délai entre la pose de la prothèse et la survenue de l'infection, du mécanisme de l'infection (hématogène, infection par inoculation, infection par contiguïté), de la virulence du pathogène et de facteurs liés à l'hôte (Parvizi *et al.*, 2016; Gomez-Urena *et al.*, 2017) (**Tableau II**). La douleur de l'articulation est l'argument clinique le plus fréquent.

**Tableau II** - Classification et présentation clinique des infections sur prothèses ostéo-articulaires

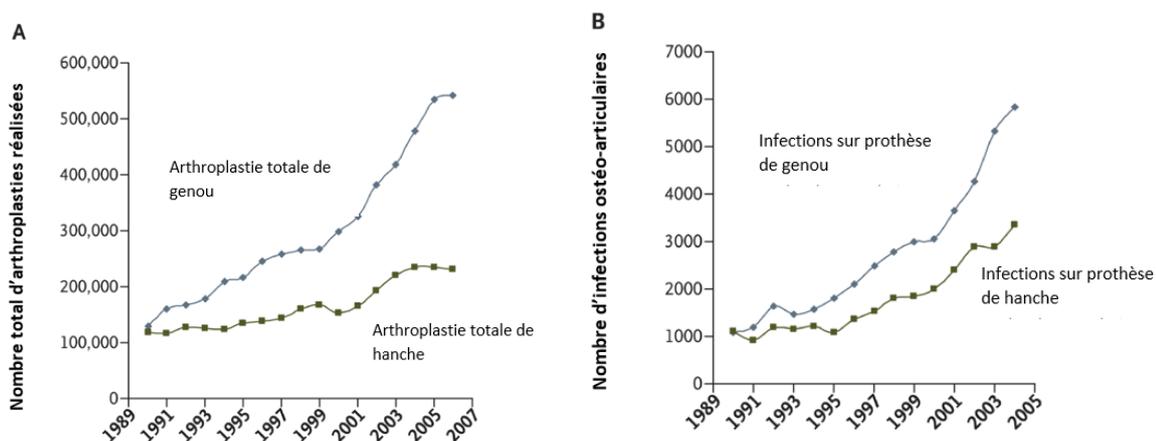
<b>Durée après la chirurgie</b>	<b>Rapidité d'évolution</b>	<b>Examen clinique</b>	<b>Microorganismes isolés</b>	<b>Mécanisme supposé de l'infection</b>
<b>&lt; 3 mois</b>	Tableau aigu avec survenue rapide de la douleur et/ou raideur	1. Signes d'infection (œdème, érythème, chaleur, rigidité, fièvre) 2. Ecoulement de pus, plaie ouverte 3. Nécrose superficielle, formation d'un œdème	Microorganisme virulent ( <i>S. aureus</i> , bacille Gram négatif)	Inoculation intra-opératoire
<b>3 à 12 mois</b>	Douleur d'installation progressive	1. Difficilement distinguable d'un descellement aseptique 2. Visualisation éventuelle d'une fistule	Microorganismes peu virulents ( <i>Cutibacterium acnes</i> , SCNs)	Inoculation intra-opératoire
<b>&gt; 12 mois</b>	1. Erythème ou œdème d'apparition brutale	Signes cardinaux d'infection	Bactérie virulente ( <i>S. aureus</i> )	Dissémination hématogène
	2. Douleur chronique	Articulation douloureuse et moins fonctionnelle	Microorganismes peu virulents ( <i>Cutibacterium acnes</i> , SCNs)	Inoculation intra-opératoire

*La présentation clinique des infections sur prothèse varie selon l'intervalle entre la pose de la prothèse et le geste chirurgical et selon le pathogène isolé.*

(iii) Projection du nombre d'arthroplasties dans le futur

Du fait du vieillissement de la population et du perfectionnement des techniques chirurgicales, la pose de prothèse est une activité chirurgicale en constante augmentation. Selon une analyse de l'ANSM des données de l'assurance maladie, 80 819 prothèses totales de genou ont été posées en France en 2013, soit environ 30% de plus qu'en 2008 (ANSM, 2015). L'analyse de la base nationale du PSMI (Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information) de 2008 à 2014 rapporte qu'il y a eu 1 049 637 d'arthroplasties de hanche (somme des arthroplasties primaires et de remplacement). Le taux d'incidence annuelle de pose de PTH est passé de 222 en 2008 pour 100 000 habitants à 241 en 2014. L'essor de la pose de prothèse laisse craindre l'augmentation du nombre d'infections, comme le montrent les travaux réalisés par Del Pozo et Kurtz, d'après des données nationales américaines recueillies entre 1990 et

2004 (**Figure 2**) (Kurtz *et al.*, 2008; Del Pozo and Patel, 2009) : l'augmentation du nombre d'arthroplasties est associée à une augmentation des infections sur prothèse. Une autre projection réalisée aux Etats-Unis estime à 174% l'augmentation de la pose de prothèses de hanches d'ici 2030 et à 673% celle de genoux (Kurtz *et al.*, 2007).



**Figure 2** - Nombre d'arthroplasties de hanches et de genoux réalisées entre 1989 et 2007 aux Etats-Unis d'après les données du CDC (Figure A) et nombre d'infections survenues (Figure B) (d'après Del Pozo *et al.*, 2009)

### b) Bactériologie des infections ostéo-articulaires

Etablir le diagnostic bactériologique de l'infection sur prothèse est un élément fondamental dans la prise en charge thérapeutique, aussi bien concernant le choix de l'option chirurgicale envisagée (lavage, reprise en un temps ou en deux temps) mais également concernant l'optimisation du traitement antibiotique.

De nombreux microorganismes sont impliqués dans les infections sur prothèse. Les Cocci à Gram positif (notamment *S. aureus* et les SCNs) sont les principaux microorganismes isolés (60% des cas) (Guery *et al.*, 2009; Beam and Osmon, 2018). La fréquence de l'isolement des souches de SCNs rejoint celle de *S. aureus* (Moran *et al.*, 2007).

Les résultats microbiologiques de 14 études ayant permis l'inclusion de plus de 2 400 patients avec une infection sur prothèse de hanche ou de genou rapportent *S. aureus* et les SCN comme responsables d'une infection dans 50 à 60% des cas (**Tableau III**). Au sein des SCNs, c'est *S. epidermidis* qui est le plus fréquemment isolé (Tande and Patel, 2014).

**Tableau III** - Principales espèces bactériennes impliquées dans les infections ostéo-articulaires sur prothèse de hanche et de genou

	% de patients avec une infection sur prothèse	
	Toutes les infections *	Infections précoces **
<b>S. aureus</b>	27	38
<b>SCNs</b>	27	22
<b>Streptococcus spp.</b>	8	4
<b>Enterococcus spp.</b>	3	10
<b>Bacilles Gram négatif</b>	9	24
<b>Bactéries anaérobies</b>	4	3
<b>Culture négative</b>	14	10
<b>Culture polymicrobienne</b>	15	31
<b>Autres</b>	3	

\* : n = 2 435

\*\* : définies selon l'étude comme survenant dans le mois ou les 3 mois après la chirurgie, n = 637

Hormis pour *S. aureus*, il existe des différences entre les microorganismes isolés dans les prélèvements provenant d'infections précoces (< 3 mois) et ceux répertoriés plus de trois mois après la pose (HAS, 2014; Triffault-Fillit *et al.*, 2019). Ainsi, dans les infections précoces, *S. aureus* et les BGN contribuent à 60% des infections. Le nombre d'infections polymicrobiennes est également plus élevé. Dans les infections survenant après 3 mois mais avant 2 ans, on isole principalement les SCNs et les entérocoques (Tande and Patel, 2014; Bergon, 2016).

Le recueil des données internationales effectué par les rédacteurs de l'argumentaire français sur la prise en charge des infections sur prothèse permet d'effectuer un tableau qui rapporte les microorganismes isolés dans les trois premiers mois suivant la chirurgie (HAS, 2014) (**Tableau IV**).

**Tableau IV** - Principales bactéries isolées dans les infections ostéo-articulaires sur matériel (< 3 mois après la pose de la prothèse)

	Pourcentage selon les études
<b>Staphylocoques</b>	75 – 88%
<b>S. aureus</b>	42 – 55%
<b>SASM</b>	27 – 37,7%
<b>SARM</b>	8 – 26%
<b>SCNs</b>	21 – 48%
<b>BGN</b>	14 – 39%
<b>Entérobactéries</b>	7 – 32%
<b>Acinetobacter spp.</b>	0,5 – 3,9%
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	1,3 – 12%
<b>Streptococcus</b>	19,5%
<b>Streptococcus spp.</b>	3 – 6,5%
<b>Enterococcus spp.</b>	12 – 16%
<b>Corynebacterium spp.</b>	2 – 19,5%
<b>Anaérobies</b>	8%
<b>Infections polymicrobiennes</b>	32 – 46%
<b>Mycobactéries, Levures, Gp HACEK</b>	Exceptionnellement décrits

Enfin, concernant les infections tardives sur prothèses de hanche et de genou, *S. epidermidis* est le premier microorganisme isolé, devant *S. aureus* et les autres SCNs (**Tableau V**) (Drago *et al.*, 2017).

**Tableau V** - Microorganismes responsables d'infections retardées sur prothèse ostéo-articulaires

	Hanche n	Genou n	Total n (%)
<i>S. aureus</i>	60	46	106 (20,7%)
<i>S. epidermidis</i>	61	59	120 (23,4%)
Autres SCNs	67	48	115 (22,5%)
Enterobactéries	22	26	48 (9,4%)
Enterocoques	14	10	24 (4,7%)
Streptocoques	9	7	16 (3,1%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	10	10	24 (4,7%)
<i>C. acnes</i>	19	20	39 (7,6%)
Autres anaérobies	6	3	9 (1,8%)
<i>Acinetobacter spp.</i>	0	4	10 (2%)
<i>Corynebacterium spp.</i>	4	6	10 (2%)
<i>Candida spp.</i>	1	0	1 (0,2%)

Comme le montre l'étude pluricentrique menée par l'équipe d'Aggarwal, il est important de connaître l'épidémiologie locale de son hôpital. Dans cette étude, 772 cas d'infections sur prothèse identifiés à l'Institut Rothman (Philadelphie, Etats-Unis) ont été comparés avec 898 cas de la clinique Helios-Endo (Hambourg, Allemagne). L'incidence respective des microorganismes isolés à Hambourg *versus* Philadelphie était : SCNs (39,3 vs 20,2%) ; *S. aureus* (13,0 vs 31,0%) ; *Streptococcus sp.* (6,5 vs 5,8%) ; *Enterococcus sp.* (7,0 vs 3,9%) ; bactéries anaérobies (9,0 vs 0,9%) (Aggarwal *et al.*, 2014). Concernant les données lilloises, une étude menée sur une période de 10 années au sein du service de traumatologie du CHU de Lille permet de dresser l'épidémiologie locale des espèces isolées au sein de prélèvements de traumatologie (**Tableau VI**) (Titécat *et al.*, 2013).

**Tableau VI** - Distribution des isolats bactériens responsables d'infections ostéo-articulaires entre 2002 et 2011 dans le service de traumatologie du CHU de Lille

	Pourcentage moyen sur les 10 années de l'étude (± écart-type)
Cocci Gram positif	70,7 (± 4,2)
<i>S. aureus</i>	19,1 (± 2,4)
SCNs	38,4 (± 4,3)
<i>Enterococcus spp.</i>	5,3 (± 0,9)
<i>Streptococcus spp.</i>	7,7 (± 1,3)
Autres	0,3 (± 0,3)
Entérobactéries	12,3 (± 1,7)

<i>Proteus spp.</i>	3,6 (± 0,7)
<i>Enterobacter spp.</i>	3,4 (± 0,9)
<i>E. coli</i>	2,7 (± 1,0)
Autres	2,5 (± 0,9)
<b>BGNs non fermentant</b>	5,1 (± 1,2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,6 (± 1,2)
<b>Bactéries anaérobies</b>	8,0 (± 2,9)
<i>P. acnes</i>	5,8 (± 2,0)
<b>Bacilles Gram positif</b>	3,7 (±1,3)
<b>Autres bactéries ou levures</b>	1,8 (± 2,1)

Au travers de ces différentes études, on constate que les infections ostéo-articulaires sur prothèse sont usuellement causées par des SCNs, majoritairement par l'espèce *S. epidermidis*.

### c) *Diagnostic des infections ostéo-articulaires sur matériel*

L'infection ostéo-articulaire sur prothèse est l'une des complications les plus redoutée après l'implantation d'une prothèse. Elle est l'une des causes de l'échec de l'arthroplastie, au même titre que le descellement aseptique, l'instabilité ou l'usure du polyéthylène pour les prothèses de genou (Sharkey *et al.*, 2002; Ulrich *et al.*, 2008). Chacune de ces complications requiert un traitement spécifique. Ainsi, lors d'une infection sur prothèse, la prise en charge repose sur une intervention chirurgicale associée à une antibiothérapie prolongée. La réalisation du diagnostic d'une infection est un réel défi et requiert une collaboration entre l'ensemble des professionnels de santé. Afin de proposer une définition standardisée d'une telle infection, les sociétés savantes et des groupes de travail ont proposé différents consensus (**Tableau VII**).

**Tableau VII** – Critères proposés pour définir une infection sur prothèse

<b>IDSA (2013) (Osmon <i>et al.</i>, 2013)</b>	<b>MSIS (2011) (Parvizi <i>et al.</i>, 2011)</b>	<b>International Consensus Meeting (2013) (Parvizi and Gehrke, 2014)</b>
Une IOA sur prothèse est présente lorsqu'un des critères suivants est objectivé :	Une IOA sur prothèse est présente si un critère majeur ou quatre mineurs existent	Une IOA sur prothèse est présente si un critère majeur ou trois mineurs existent
- Fistule communiquant avec la prothèse	<u>Critères majeurs :</u>	<u>Critères majeurs :</u>
- Inflammation aiguë du tissu péri-prothétique	- Au minimum, deux cultures sont positives à la même bactérie	- Au minimum, deux cultures sont positives à la même bactérie
- Pus autour de la prothèse	- Fistule communiquant avec la prothèse	- Fistule communiquant avec la prothèse
- Isolement de deux (au minimum) cultures positives à la même	<u>Critères mineurs :</u>	<u>Critères mineurs :</u>
	- CRP ou VS augmentés	- CRP ou VS augmentés
	- Hyperleucocytose du	- Hyperleucocytose du

bactérie - Présence d'une seule culture positive mais à un microorganisme virulent	liquide synovial ou test de la leucocyte estérase positif - Polynucléose du liquide synovial - Pus autour de la prothèse - Examen anatomopathologique positif - Une seule culture positive	liquide synovial ou test de la leucocyte estérase positif - Polynucléose du liquide synovial - Examen anatomopathologique positif - Une seule culture positive
---	--	---

On remarque que l'IDSA oppose les microorganismes virulents (*S. aureus*) et les microorganismes qui sont des contaminants classiques des milieux du culture (SCNs, *C. acnes*), en abaissant le nombre de culture positive nécessaire pour poser le diagnostic d'infection pour les microorganismes virulents.

Dans ses recommandations, la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) porte à au moins trois prélèvements (ou deux prélèvements espacés dans le temps) positifs à la même bactérie le nombre nécessaire pour poser le diagnostic d'infection certaine pour les microorganismes dont l'isolement pose la question d'une éventuelle contamination (Guery *et al.*, 2009).

Ainsi, même si les recommandations des sociétés savantes sont fortement similaires, on constate un manque de consensus quant à la possibilité de réaliser un diagnostic microbiologique pour les souches de *S. epidermidis*. Cela peut s'expliquer par la difficulté à distinguer l'isolat témoignant réellement d'une infection de l'isolat dû à une contamination.

La confirmation microbiologique d'une IOA au laboratoire est délicate, étant donné le faible inoculum bactérien, la répartition non homogène des bactéries dans le site infecté, l'aspect potentiellement polymorphe des colonies (colonies « naines », Small Colony Variant) et leur croissance lente (métabolisme ralenti) (Plouzeau-Jayle, 2016). Ainsi, il y a des précautions à prendre concernant les techniques microbiologiques mises en place au laboratoire lors du rendu des résultats en lien avec les prélèvements microbiologiques réalisés dans le cadre d'une suspicion d'IOA : l'incubation des milieux de culture doit obligatoirement être maintenue pour 14 jours.

#### d) *Issue des infections ostéo-articulaires à Staphylococcus spp.*

L'issue clinique des infections ostéo-articulaires à *S. aureus* ou aux SCNs a été évaluée dans différentes études avec des taux de succès compris entre 60% à 90% pour ces microorganismes (Tornerio *et al.*, 2012). On peut s'interroger sur la variabilité de ce taux de succès en fonction de l'espèce impliquée dans l'infection (*S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. epidermidis*). Tornerio *et al.*, dans une cohorte de 106 patients

présentant une IOA sur matériel à *S. aureus* et SCNs, rapportaient un taux d'échec de 23,6%. Les infections dues à *S. aureus* avaient un moins bon taux de succès que celles dues aux SCNs, mais la différence n'était pas statistiquement significative (taux d'échec de 28% *versus* 18,3%,  $p = 0,26$ ). Dans les infections à SCNs, seule la localisation de la prothèse (hanche *versus* genou) était associée à l'échec ( $p = 0,047$ ) (Tornero *et al.*, 2012). Lourtet-Hascoët *et al.* ont quant à eux comparé les caractéristiques des infections sur matériel à *S. lugdunensis*, *S. aureus* ou encore *S. epidermidis* (en termes de symptômes cliniques, de délai entre le geste et la survenue de l'infection, de susceptibilité aux antibiotiques, et d'issue clinique). Le taux de résistance à la méticilline était de 76,7% parmi les isolats de *S. epidermidis*. Pourtant l'issue clinique était identique avec les infections dues à *S. lugdunensis* ou *S. aureus*, pour lesquels la résistance à la méticilline était seulement de 13,3% et de 0,0% respectivement (Lourtet-Hascoët *et al.*, 2016).

Un autre sujet très débattu concerne l'importance de la méticillinorésistance dans l'échec du traitement : est-elle associée à des taux d'échec plus élevés ? Une autre étude réalisée par l'équipe de Tornero a analysé l'issue des IOA sur matériel (prothèse de hanche ou de genou) parmi 96 patients présentant une infection due à un staphylocoque (*S. aureus* ou SCNs) résistant ou sensible à la méticilline. Les taux d'échec ne variaient pas dans les deux groupes (20,6% dans le groupe méti-R *versus* 27,4% dans le groupe méti-S,  $p = 0,62$ ) (Tornero *et al.*, 2013). Une étude menée par Senneville *et al.* a étudié les variables associées à l'issue clinique d'une IOA à *S. aureus*. Les infections à *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) n'avaient pas de moins bons pronostics que celles dues à *S. aureus* sensibles à la méticilline (taux d'échec de 19,7% pour les SASM *versus* 29,4% pour les SARM,  $p = 0,38$ ) (Senneville *et al.*, 2011). Cependant, ce sujet est très débattu. Dans la cohorte d'Hischebeth, les taux d'éradication d'infection sur prothèse dues à des SASM, des SARM ou des *S. epidermidis* sensibles à la méticilline (SESM) et des *S. epidermidis* résistants à la méticilline (SERM) ont été analysés. En considérant l'issue positive de l'infection comme étant l'absence de signes d'infection au-delà de deux ans, associée à une CRP  $\leq 10\text{mg/dL}$ , l'équipe de Hischebeth constate que les infections à SERM étaient statistiquement moins guéries que les infections à SESM ou SASM ( $p = 0,002$  et  $0,03$  respectivement). Cependant, il n'observa pas de différence entre les souches de SASM et les souches de SARM ( $p = 0,33$ ) (Hischebeth *et al.*, 2019). Mohanty *et al.* ont étudié une cohorte de 2 510 prélèvements collectés au décours d'une intervention pour une pose ou une reprise d'arthroplastie de la hanche ou du genou dans laquelle 55,1% des

isolats de *S. epidermidis* étaient résistants à la méticilline. La durée de conservation de la prothèse après une reprise en un temps était plus élevée dans le cadre des prothèses infectées à *S. epidermidis* sensibles à la méticilline (SEMS) (82,8 mois) que celles infectées à *S. epidermidis* résistantes à la méticilline (SEMR) (52,9 mois) (Mohanthy and Kay, 2004).

La survenue d'une IOA à *S. epidermidis* est ainsi un réel problème, tant par la difficulté inhérente à cette bactérie pour établir un diagnostic microbiologique (contamination *versus* réelle infection) que par sa difficulté d'éradication. Cette dernière est à corrélérer d'une part à la formation du biofilm mais également à l'existence d'isolats qui développent une multirésistance aux antibiotiques. Ainsi, au cours des dernières années, la susceptibilité des SCNs vis-à-vis des antibiotiques a diminué. De forts taux de résistance sont ainsi maintenant rapportés vis-à-vis de la pénicilline, de la méticilline, de la ciprofloxacine, de la clindamycine, de l'érythromycine ou encore de la gentamicine. La fréquence des souches de SCNs méticillino-sensibles (souches isolées de bactériémies) est passée en moyenne de 40% en 1998 à 28% en 2002 (Bertrand *et al.*, 2005). Dans une étude française multicentrique, la sensibilité aux antibiotiques des souches de staphylocoques impliquées dans les infections ostéoarticulaires a été évaluée. *S. epidermidis* est l'espèce la plus fréquemment isolée mais également la plus résistante. Les pourcentages de résistance à la méticilline, à l'ofloxacine et à la rifampicine étaient respectivement de 69,7% ; 55% et de 30,2% (Lourtet-Hascoët *et al.*, 2018).

### C. Ostéite du pied diabétique : quelle est l'imputabilité du *S. epidermidis* ?

#### a) *Généralités sur les ostéites du pied diabétique*

L'infection du pied est une complication fréquente chez les patients diabétiques. Elle est définie chez cette catégorie de patient comme étant la conséquence de l'invasion et de la multiplication des microorganismes dans les tissus du pied de l'hôte, aboutissant à la destruction tissulaire. Dans le cas du pied diabétique, cette infection est en règle générale secondaire à une plaie cutanée. L'origine hématogène est exceptionnelle chez le patient diabétique (SPILF, 2007; IWGDF, 2011; Senneville, 2015).

L'ostéite du pied diabétique est définie comme une infection de la corticale osseuse sans atteinte médullaire. Elle est retrouvée dans 30 à 80% des infections. L'ostéite doit être évoquée devant la présence d'une ulcération étendue (diamètre > 20 mm) et profonde (profondeur > 3 mm) du pied, résistante aux traitements, siégeant en regard d'une proéminence osseuse. D'autres arguments cliniques sont en faveur d'une

ostéite comme l'existence d'un contact osseux au moyen d'une sonde ou encore l'aspect en saucisse de l'orteil (SPILF, 2007; IWGDF, 2011; Senneville, 2015).

La documentation microbiologique de l'ostéite aigüe du pied diabétique repose sur la réalisation d'une biopsie osseuse après une période sans antibiotique chez les patients stables, qui est la méthode de référence (Gold Standard). Le fragment osseux peut-être obtenu par chirurgie ou par ponction percutanée passant en peau saine au moyen d'un trocart (SPILF, 2007; IWGDF, 2011; Senneville, 2015). La réalisation d'une biopsie osseuse est rarement réalisée en dehors des centres spécialisés.

La corrélation entre la biopsie osseuse transcutanée et d'autres types de prélèvements (écouvillons, aspiration à l'aiguille, biopsie au travers de la lésion) est variable (**Tableau VIII**).

**Tableau VIII** - Corrélation entre les prélèvements superficiels et les prélèvements osseux dans le cadre du diagnostic d'une ostéite

Référence	Nombre de prélèvements	Méthodes de recueil	Corrélation
(Slater <i>et al.</i> , 2004)	60	Écouvillonnage superficiel durant 5 secondes <i>versus</i> tissus profonds obtenus lors du débridement chirurgical	62%
(Senneville <i>et al.</i> , 2006)	76	Écouvillonnage par rotation vigoureuse <i>versus</i> biopsie osseuse percutanée	22,5%
(Senneville <i>et al.</i> , 2009)	31	Aspiration à l'aiguille <i>versus</i> biopsie osseuse percutanée	23,9%
(Elamurugan <i>et al.</i> , 2011)	144	Écouvillonnage <i>versus</i> biopsie osseuse	38,2%
(Couturier <i>et al.</i> , 2019)	46	Biopsie osseuse au travers de la lésion <i>versus</i> biopsie osseuse transcutanée	48,4%

#### b) Bactériologie des ostéites

Les ostéites du pied diabétique sont le plus souvent des infections polymicrobiennes (le nombre moyen de microorganismes isolés est de 2,25 dans l'étude menée par Lavery *et al.* (Lavery *et al.*, 1995)). *S. aureus* est le pathogène le plus fréquemment identifié lors de la réalisation des biopsies osseuses. D'autres Cocci à Gram positif sont fréquemment isolés tels que *S. epidermidis*, d'autres SCNs, ou encore des streptocoques. Parmi les bacilles Gram négatif, *E. coli*, *K. pneumonia* et les espèces du

genre *Proteus* spp. sont fréquemment isolées (Senneville and Robineau, 2017). Les bactéries anaérobies peuvent être impliquées, notamment dans les infections profondes ou chroniques (Charles *et al.*, 2015).

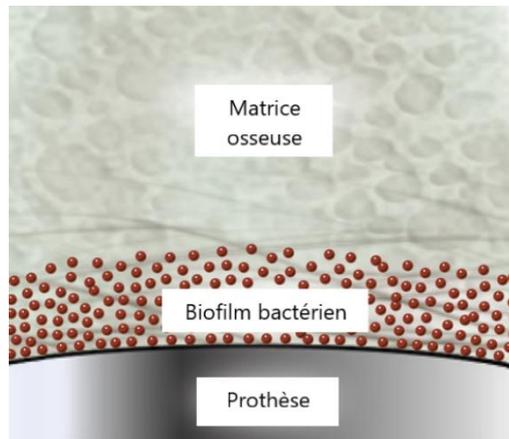
*S. epidermidis* est habituellement considéré comme un contaminant lorsqu'il est isolé au sein d'une flore plurimicrobienne. Son imputabilité, lorsqu'il est isolé seul au décours d'une ostéite, est encore débattue. Aragon-Sanchez et son équipe ont démontré sa virulence lorsqu'il était la seule bactérie isolée, en corrélant sa présence à des données histologiques (Aragón-Sánchez *et al.*, 2010).

Enfin, si l'on compare les données microbiologiques obtenues à partir d'écouvillonnages cutanés à celles obtenues à partir de biopsie osseuse percutanée, on constate que les SCNs ont été isolés dans 4,6% des écouvillonnages contre 25,5% des biopsies osseuses (Senneville *et al.*, 2006). Ce résultat plutôt surprenant permet d'étayer l'idée que dans certaines conditions, *S. epidermidis* est responsable de l'ostéite.

#### D. Physiopathologie générale des infections à *S. epidermidis*

*S. epidermidis* réside sur la peau, où il adhère aux protéines cutanées de l'hôte. Au décours d'un acte chirurgical (pose de voie veineuse par exemple), il est capable de détourner ce mécanisme d'adhésion pour adhérer à des protéines de l'hôte situées plus en profondeur, voire au dispositif médical lui-même. C'est donc le plus souvent une souche de *S. epidermidis* endogène – c'est-à-dire du patient – qui, en dérégulant ses facteurs de virulence, va provoquer la pathologie (Sabaté Brescó *et al.*, 2017).

La pathogénie des infections ostéo-articulaires est similaire à celle décrite pour les infections sur voie veineuse. Seules quelques bactéries de *S. epidermidis* sont nécessaires pour provoquer une infection. Un inoculum bactérien inférieur à 1 000 CFU (qu'il soit per opératoire, par contiguïté ou par voie hématogène) est considéré comme suffisant pour déclencher le processus infectieux (Guery *et al.*, 2009). Celui-ci débute par un phénomène d'attraction au cours duquel les bactéries sont adsorbées sur le matériel de façon réversible (**Figure 3**) (Del Pozo and Patel, 2009; Guery *et al.*, 2009). Ensuite, les bactéries vont s'organiser au sein d'une entité dynamique (le biofilm), qui va s'étendre en quelques jours à toute la surface du matériel. Avirulentes, les bactéries persisteront au sein du biofilm pour donner une infection qui évoluera de manière latente. Cliniquement, l'infection se présentera alors de manière indolente et chronique, avec des symptômes qui apparaîtront des mois voire des années après la pose de la prothèse.



**Figure 3** - Persistance du biofilm au contact de la prothèse

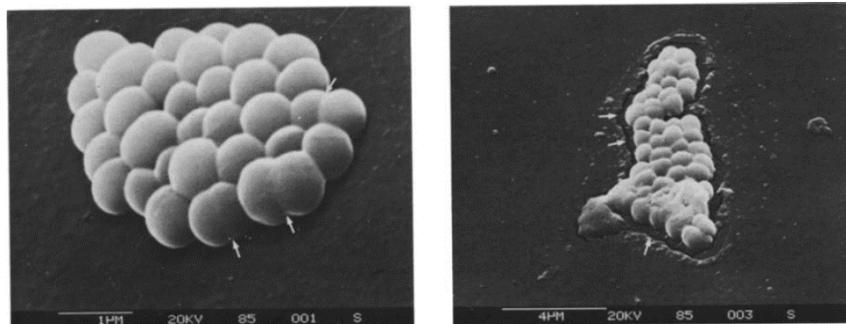
Concernant la physiopathologie des ostéites, on peut émettre l'hypothèse que l'os, mal vascularisé chez les patients diabétiques atteints d'artériopathie, se comporte comme une surface inerte. *S. epidermidis* peut donc y adhérer, former un biofilm et se multiplier, provoquant ainsi une ostéite.

### III. Formation du biofilm de *S. epidermidis* : bases moléculaires

#### A. Le biofilm : le facteur de virulence de *S. epidermidis*

##### a) Définition du biofilm

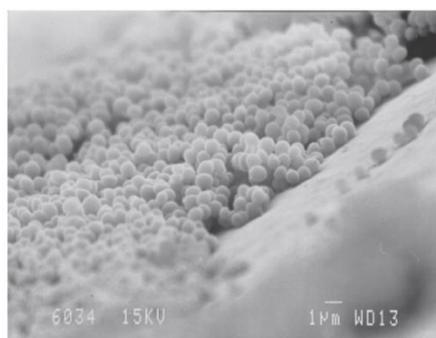
L'hypothèse qu'un lien existait entre la survenue d'une infection à *S. epidermidis* et le port d'un dispositif médical provient des premières analyses de microscopie électronique réalisées après retrait de cathéters veineux. Les cocci étaient alors décrits comme capables de coloniser la surface d'un matériel artificiel en formant de larges regroupements (**Figure 4**), et en étant regroupés au sein d'une substance amorphe (Peters *et al.*, 1982). Ce mode de croissance, initialement appelé « slime » prend aujourd'hui le nom de biofilm.



**Figure 4** - Apparence de colonies de la souche de SCN KH11 à la surface d'un cathéter en polyéthylène

A gauche : Après une incubation de 12 heures. Les flèches soulignent les cellules en cours de division.  
A droite, incubation de 48h : érosion de la surface du cathéter.

Aujourd'hui, un biofilm est défini comme une communauté de microorganismes (**Figure 5**), adhérents à une surface et maintenus entre eux par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (Sutherland, 2001). La composition moléculaire d'un biofilm est synthétisée dans le **tableau IX**. Les biofilms peuvent se former sur les surfaces abiotiques des dispositifs médicaux, mais également sur des surfaces biotiques, c'est-à-dire le tissu humain (Rogers *et al.*, 2009). En effet, dès l'implantation d'un dispositif médical, celui est recouvert avec différents composants de la matrice extracellulaire de l'hôte (fibronectine, fibrinogène, vitronectine, collagène). Le biofilm s'installe en 8 jours (Costerton *et al.*, 1999).



**Figure 5** - Image de microscopie électronique d'un biofilm de *S. epidermidis* formé à la surface de chevilles de polystyrène (McCann *et al.*, 2008)

**Tableau IX** - Composition moléculaire d'un biofilm (d'après Sutherland, 2001)

Composant	% de la matrice
Eau	Jusqu'à 97%
Bactéries	2 à 5%
Polysaccharides	1 à 2% (neutre et polyanionique)
Protéines	< 1 à 2%
ADN et ARN	< 1 à 2%
Ions	Traces

#### b) Les différentes étapes de la formation du biofilm

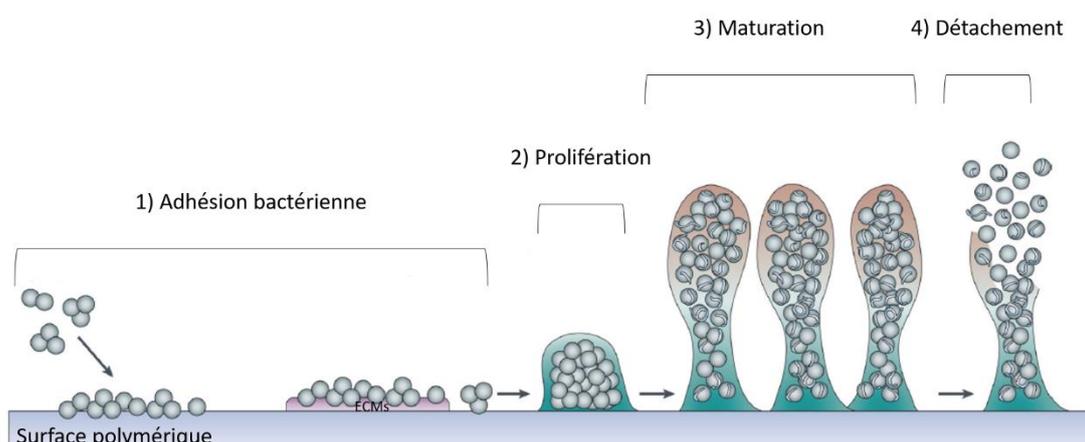
Les phases qui permettent l'élaboration du biofilm par les SCNs et les mécanismes moléculaires sous-jacents sont analysés depuis des années (Otto, 2009; Becker *et al.*, 2014). Chronologiquement, la formation d'un biofilm bactérien est le plus souvent divisée en 4 étapes (**Figure 6**) :

1) Rapidement la bactérie s'attache aux surfaces biotiques et abiotiques (adhésion bactérie / surface inerte)

2) Dans un second temps, les bactéries se multiplient et s'accumulent. Elles forment alors des agrégats composés de plusieurs couches. Ce processus nécessite l'adhésion des bactéries entre elles. Les bactéries situées sur les couches les plus hautes n'adhèrent donc plus directement à la surface.

3) Maturation du biofilm : le biofilm devient alors structuré et organisé. Dans un biofilm mature, il existe des canaux qui permettent de délivrer de l'oxygène et des nutriments aux bactéries localisées dans les couches les plus profondes.

4) Finalement, des cellules individuelles ou des agglomérats cellulaires peuvent se dissocier du biofilm pour disséminer au travers de la circulation sanguine et aller adhérer à un autre site.



**Figure 6 - Formation du biofilm chez *S. epidermidis* (d'après Otto, 2009)**

*La phase d'adhésion bactérienne comprend l'attachement aux surfaces polymériques mais également aux protéines de la matrice extracellulaire (ECMs). Au cours de la phase de prolifération, les bactéries se multiplient et sécrètent un exopolysaccharide, leur permettant d'adhérer les unes aux autres. La prolifération cellulaire continue durant la phase de maturation. Au cours de cette phase, le biofilm est structuré par la formation de canaux. Enfin, le détachement permet la libération de bactéries dans la circulation, qui vont pouvoir coloniser un autre site.*

### c) Rôles et caractéristiques du biofilm

Le mode de vie des bactéries au sein du biofilm est ralenti. Elles sont inaccessibles aux défenses de l'hôte et la plupart des antibiotiques sont inefficaces sur le biofilm (Tremblay *et al.*, 2014).

## B. Bases moléculaires de la formation du biofilm

La formation du biofilm est un processus complexe, faisant intervenir de nombreuses molécules (**Tableau X**).

### a) *Attachement aux surfaces abiotiques*

L'attachement des bactéries à la surface des matériaux fait intervenir des forces physicochimiques (principalement des interactions hydrophobiques). Ces interactions bactéries – surfaces font collaborer différents composants situés à la surface de *S.*

*epidermidis* (protéines de surface non covalentes, protéines de surface covalentes, acides téichoïques).

(i) Protéines de surface non covalentes

- La protéine majeure est AtlE, une protéine de 148 kDa, qui possède une activité autolysine / adhésine. Elle permet l'initiation de l'adhérence bactérienne aux surfaces polymériques (Otto, 2009; Becker *et al.*, 2014; Büttner *et al.*, 2015). L'adhésion initiale ne semble pas uniquement médiée par la protéine AtlE proprement dite mais également par son activité enzymatique. En effet, son activité hydrolytique (lyse du peptidoglycane bactérien) permet la libération d'ADN, qui est un composant essentiel du biofilm (Becker *et al.*, 2014).

- La protéase ClpP dégrade les protéines malformées et est impliquée dans l'adaptation au stress et la formation du biofilm.

(ii) Protéines de surface covalentes

- La protéine Bap (Biofilm-Associated Protein) a été initialement isolée uniquement chez l'espèce *S. aureus* (mastites bovines). Elle médie l'attachement au polystyrène et intervient également dans les phases d'accumulation du biofilm. L'expression de cette protéine augmente significativement la capacité de *S. aureus* à coloniser la glande mammaire des bovins. Récemment, des gènes orthologues de *bap* ont été identifiés chez les SCNs isolés de mastites animales (élevages bovins, ovins, et caprins), dont 38 souches de *S. epidermidis* (Tormo *et al.*, 2005). La présence de ce gène permet la formation de biofilm.

- La souche de *S. epidermidis* RP62A (souche de référence productrice de biofilm) possède un gène qui possède une similarité de séquence avec *Bap*. Ce gène a été appelé *Bhp*. Il code pour une protéine de 258 kDa, impliqué dans la formation du biofilm (Becker *et al.*, 2014).

(iii) Acides téichoïques

Ce sont des constituants importants de la membrane des bactéries à Gram positif. Le terme acide téichoïque englobe les acides téichoïques pariétaux (WTA) et les acides lipotéichoïques (LPA). Les WTA sont liés de manière covalente au peptidoglycane, alors que les LPA sont liés à la membrane cytoplasmique grâce à un glycolipide (Brown *et al.*, 2013). Ce sont des éléments fortement chargés négativement. La charge déterminée par les acides téichoïques est essentielle à la colonisation des surfaces artificielles.

## b) *Attachement aux surfaces biotiques*

Immédiatement après l'implantation du dispositif médical, celui-ci est couvert par des protéines de la matrice extracellulaire : fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, collagène, facteur de Willebrand, vitronectine mais également par des plaquettes. Certains de ces éléments servent de récepteurs à des adhésines exprimées par *S. epidermidis* (Becker *et al.*, 2014).

### (i) Protéines de surface non covalentes

- La protéine AtlE médie non seulement l'adhésion aux polymères mais s'attache aussi à la vitronectine (Becker *et al.*, 2014).

- La protéine Aae est une autre autolysine / adhésine qui se lie au fibrinogène, à la vitronectine ainsi qu'à la fibronectine.

- La protéine GehD permet l'adhésion de la bactérie au collagène (Becker *et al.*, 2014).

- La protéine Embp (Extracellular Matrix-Binding Protein) (1100 kDa) permet la liaison à la fibronectine et est donc impliquée dans l'attachement primaire (Christner *et al.*, 2010).

### (ii) Protéines de surface covalentes

Elles sont regroupées sous l'acronyme MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Elles partagent une structure moléculaire similaire.

- La plus caractérisée des MSCRAMMs de *S. epidermidis* est la protéine Fbe (Fibrinogen-Binding Protein), également référencée sous le nom de SdrG. Elle permet l'interaction de *S. epidermidis* avec le fibrinogène. Les protéines SdrF et SdrH sont également impliquées dans l'adhésion aux surfaces biotiques.

- La protéine SesC médie l'attachement au fibrinogène.

- La protéine Aap (Accumulation-Associated Protein) permet l'adhésion aux cellules de la couche cornée.

### (iii) Acides téichoïques

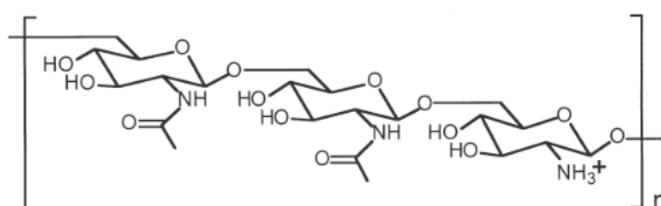
Ils médient l'attachement à la fibronectine.

### c) Phases de prolifération et de maturation

Après la réussite des phases d'attachement, les bactéries se multiplient et s'agrègent pour former des couches organisées. Au cours de ce processus, ce sont les interactions entre les cellules qui sont importantes. L'adhésion intercellulaire est médiée par différentes macromolécules (adhésines polysaccharidiques ou protéiques). De plus, l'ADN extracellulaire libéré peut interagir avec les polysaccharides via ses charges positives, permettant l'accumulation du biofilm en agissant comme de la « glue ».

#### (i) Biofilm polysaccharidique

Le premier travail fiable ayant permis la caractérisation d'un antigène polysaccharidique au sein du biofilm provient des travaux menés par Mack *et al.* sur les souches de *S. epidermidis* productrices de biofilm 1457 et RP62A (Mack *et al.*, 1996). Ces travaux ont permis de distinguer la présence de deux fractions polysaccharidiques. Le polysaccharide I (présent à plus de 80%) est un homoglycane linéaire d'au moins 130 résidus de  $\beta$ -1,6-N-acétylglucosamine, au sein duquel 15 à 20% sont désacétylés (donc chargé positivement) (**Figure 7**). Le polysaccharide II est composé d'une proportion moindre de N-acétylglucosamine désacétylée et comporte des résidus phosphates et succinates, ce qui le rend anionique. La structure de ces polysaccharides est unique. Au vu de leurs fonctions permettant l'agrégation des cellules entre elles, il est nommé Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) (Götz, 2002). Il est parfois appelé poly-N-acétylglucosamine (PNAG).



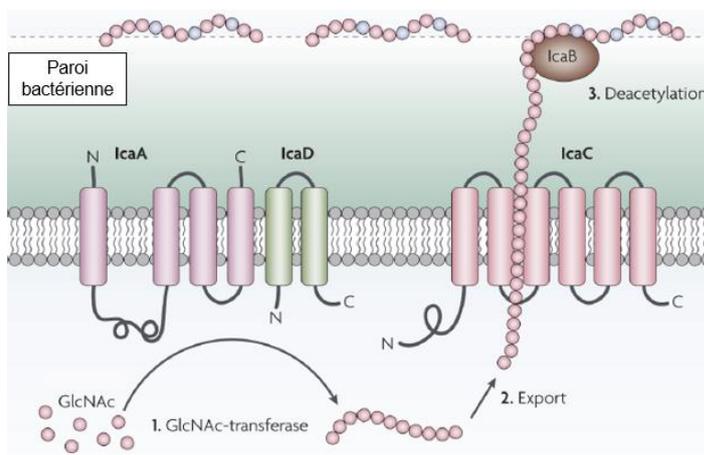
**Figure 7** - Structure du PIA

Le PIA est un homoglycane linéaire composé de  $\beta$ -1,6-N-acétylglucosamine. Environ 20% des résidus sont désacétylés, ce qui lui confère une charge positive.

L'activité de ce PIA au cours de la formation du biofilm s'explique par ces charges positives, résultant de la désacétylation partielle des résidus de N-acétylglucosamine. Il s'ensuit alors des interactions électrostatiques avec les charges négatives des acides téichoïques.

La production de ce PIA est médiée par l'intermédiaire de 4 gènes, organisés en opéron (*IcaADBC*). *IcaA* code pour une protéine porteuse de l'activité N-

acétylglucosamine transférase à partir de monomères d'UDP-N-acétylglucosamine. Seul, *IcaA* possède une faible activité. La co-expression de *IcaA* et de *IcaD* permet de multiplier cette dernière par 20. Les oligomères de N-acétylglucosamines produit à ce niveau sont seulement de 20 résidus. C'est la co-expression de *IcaAD* avec *IcaC* qui permet l'obtention de résidus plus longs (Götz, 2002). *IcaB* catalyse la réaction de désacétylation à la surface des résidus de N-acétylglucosamine (**Figure 8**). Dans les modèles animaux (souris et rats), les mutants de *S. epidermidis* délétés pour l'opéron *IcaADBC* sont moins pathogènes que les souches sauvages (Becker *et al.*, 2014).



**Figure 8** - La synthèse du PIA

*GlcNAc* (N-acétylglucosamine)

La synthèse du PIA est sous la dépendance de l'opéron *IcaADBC*. *IcaA* est une protéine membranaire porteuse de l'activité N-acétyltransférase, qui a besoin de la protéine *IcaD* pour exercer son activité. La chaîne en cours de synthèse est ensuite exportée probablement par *IcaC*, qui permet l'élongation de cette dernière. Après son exportation, *IcaB* désacétyle certains résidus, conférant alors une charge positive à l'ensemble, essentielle pour ses fonctions d'attachement. Les ronds roses représentent des résidus de N-acétylglucosamine et les ronds bleus des résidus désacétylés.

L'expression de l'opéron *Ica* dans les souches de *S. epidermidis* productrices de biofilm est soumise à un processus de variation de phase. C'est un processus génétique réversible qui permet à une bactérie de générer rapidement de la diversité pour s'adapter à son environnement. Ainsi, une mutation dans un gène variable peut permettre l'expression de ce gène (phase ON), tandis qu'une autre mutation permettra l'extinction de l'expression de ce gène (phase OFF). *IS256* est un élément mobile, qui réside souvent sous la forme de nombreuses copies dans le génome de *S. epidermidis*, influençant l'expression de l'opéron *Ica*. L'insertion de cette séquence se fait majoritairement au sein du gène codant pour *IcaC*, sur le nucléotide en position 3742. Sachant que la synthèse de PIA résulte de l'expression simultanée des gènes *IcaA*, *IcaD*, *IcaB* et *IcaC*, on en déduit que l'insertion d'*IS256* conduit à une souche de *S. epidermidis* incapable de synthétiser le PIA (Ziebuhr *et al.*, 1999). *IS256* a été

originellement identifié comme appartenant à la famille des transposases. Il est composé de 1324 paires de bases. Il est connu pour former la fin du transposon Tn4001, conférant une résistance aux aminoglycosides (Hennig and Ziebuhr, 2010).

(ii) Adhésines protéiques

L'accumulation des bactéries peut être PIA-indépendante. On parle alors de biofilm protéique.

- Les protéines Bap et Bhp mentionnées ci-dessus ont une activité au cours de l'accumulation bactérienne.

- La protéine Aap (également mentionnée ci-dessus) est essentielle dans l'accumulation du biofilm. Aap peut aboutir à la formation d'un biofilm de manière totalement indépendante du PIA. Des souches auxquelles il manque l'opéron *IcaADBC* sont capables de produire du biofilm. Cela sous-entend que dans certains cas la formation de biofilm est uniquement médiée par des facteurs protéiques. L'activité de la protéine Aap nécessite une activation protéolytique et la présence d'ions  $Zn^{2+}$ .

- La protéine Embp médie l'accumulation du biofilm.

d) *Phases de détachement*

Une fois que le biofilm est mature, certaines bactéries se dissocient de ce dernier et vont se disperser au travers de la circulation sanguine, conduisant alors à une dissémination de l'infection. Ce phénomène, bien que moins compris, semble médié par des enzymes extracellulaires et les PSMs (Phenol-Soluble Modulins).

(i) Enzymes extracellulaires :

On retrouve des protéases, des hydrolases (permettant de désintégrer le PIA) ou des nucléases (désintégration de l'ADN).

(ii) PSMs

Ce sont des petits peptides sécrétés par les bactéries qui seraient capables de rompre les liaisons électrostatiques et hydrophobiques au sein du biofilm (Otto, 2009).

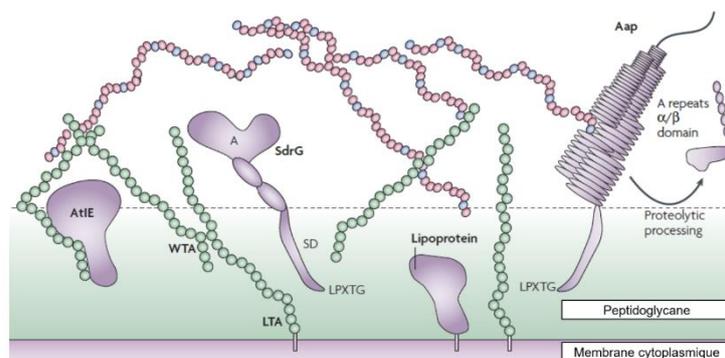
**Tableau X** - Tableau récapitulatif des différentes molécules impliquées dans la formation du biofilm (d'après Otto et al, 2009)

Facteurs de virulence	Gène(s)	Fonction(s)	Phases de formation du biofilm
<b>AtIE</b>	<i>atIE</i>	Autolysine et adhésine	A
<b>Aae</b>	<i>aae</i>	Autolysine et adhésine	A et M
<b>Aap</b>	<i>aap</i>	Attachement aux cornéocytes	A et M
<b>Acides téichoïques</b>	Nombreux	Médiée par les charges	A et M
<b>Bap</b>	<i>bap</i>	Adhésine protéique	A et M
<b>Bhp</b>	<i>bhp</i>	Adhésine protéique	A
<b>ClpP</b>	<i>clpP</i>	Protéase	M
<b>Embp</b>	<i>embp</i>	Liaison à la fibronectine	A
<b>GehD</b>	<i>gehD</i>	Liaison au collagène	
<b>PIA (= PNGA)</b>	<i>IcaADBC</i>	Adhésine polysaccharidique	M
<b>SdrF</b>	<i>sdrF</i>	Liaison au collagène	A
<b>SdrG (= Fbe)</b>	<i>sdrG</i>	Liaison au fibrinogène	A
<b>SdrH</b>	<i>sdrH</i>	Fonction putative	A
<b>SeSc</b>	<i>sesC</i>	Attachement au fibrinogène	A
<b>PSMs</b>	Nombreux		D

*A = phase d'attachement ; M = phase de multiplication ; D = phase de détachement*

*La phase d'attachement comprend sans distinction l'attachement aux éléments biotiques et abiotiques. On constate que les protéines sont multifonctionnelles : elles sont capables d'avoir différents rôles au sein de chacun des étapes de formation du biofilm.*

La localisation de toutes ces molécules à la surface de la bactérie est schématiquement représentée sur la **Figure 9**.



**Figure 9** - Surface cellulaire de *S. epidermidis*

*Les protéines telles que SdrG et Aap sont enchâssées dans le peptidoglycane par un ancrage via le motif d'acides aminés LPXTG (le résidu thréonine est lié au peptidoglycane). L'autolysine AtIE est quant à elle liée de manière non covalente à la membrane bactérienne. Elle est maintenue au sein de cette dernière probablement via son interaction avec les acides téichoïques. Le PIA est cationique et interagit avec les charges négatives exposés par les acides téichoïques de la paroi (WTA) ou les acides lipotéichoïques (LTA).*

# PROBLEMATIQUE

---

Les infections sur prothèses ostéo-articulaires sont l'une des complications les plus redoutées de l'arthroplastie. Au sein de ces infections, l'espèce *S. epidermidis* est responsable d'infections chroniques, particulièrement difficiles à diagnostiquer pour le clinicien. L'obtention d'un diagnostic de certitude peut être facilité lorsque deux prélèvements peropératoires ou plus sont positifs avec des isolats présentant les mêmes phénotypes de résistance. En revanche, lorsqu'un seul prélèvement se positive de manière isolée avec cette bactérie commensale de la peau, il est impossible de différencier une éventuelle contamination d'une infection avérée.

Face à cette situation, nous manquons encore aujourd'hui d'outils pour poser un diagnostic microbiologique de certitude qui peut être pourtant décisif pour orienter rapidement la prise en charge du patient. Cette problématique se pose également dans le cadre des ostéites du pied diabétique et du pouvoir pathogène imputable à cette bactérie lorsqu'elle est isolée en culture mono ou plurimicrobienne. *S. epidermidis* doit-il alors être pris en compte dans le pari antibiotique ?

Ainsi, nous nous proposons dans ce travail d'évaluer l'intérêt de la détection de facteurs de virulence de *S. epidermidis* par une technique de PCR rapide comme argument diagnostique supplémentaire permettant d'étayer l'étiologie d'une infection ostéo-articulaire prothétique et du pied diabétique.

Nous avons travaillé sur un panel de souches de *S. epidermidis* isolées d'infections sur prothèses ostéo-articulaires et d'ostéites de pieds diabétiques. La présence de dix gènes a été recherchée par PCR en temps réel au sein de ces deux groupes dont le profil génotypique a été comparé à celui de souches isolées de patients sains et de souches considérées comme contaminantes. Les dix gènes retenus étaient impliqués dans la formation du biofilm (*aap*, *embp*, *IcaA*, *IcaD*, *bap* et *bhp*), dans la résistance aux antibiotiques (*IS256*), dans la résistance aux antiseptiques (*QacA*) ou encore ont été identifiés dans la littérature comme associés plus fréquemment au phénotype « infectant » (*SE2251*) ou commensal (*SE1875*).

Les objectifs primaires de notre étude étaient :

- La détermination de la prévalence des 10 gènes sus-cités parmi une collection de souches de *S. epidermidis* responsables d'infections ostéo-articulaires (infections

sur prothèse et de pied diabétique), de souches considérées « contaminantes » et de souches cutanées isolées de témoins sains.

- L'identification d'un ou de plusieurs marqueurs permettant de différencier les phénotypes « infectants » et « contaminants ».

Les objectifs secondaires de notre étude étaient :

- De déterminer si le profil génotypique des souches permettait de prédire l'évolution clinique de l'infection.

- D'évaluer l'intérêt de réaliser ces PCR en mode rapide sur le délai de rendu des résultats.

# MATERIELS ET METHODES

---

## I. Collection de *S. epidermidis*

L'ensemble des souches de *S. epidermidis* était isolé de patients pris en charge au sein du CRIOAC Nord-Ouest (Lille - Tourcoing) pour des suspicions d'infections sur prothèse de membre inférieur ou d'infections de pied diabétique.

### A. Souches isolées de prothèses ostéo-articulaires et souches témoins

Cette première collection comprenait 3 types de souches :

- « Souches infectantes » ou « IOA » : il s'agissait de souches isolées d'infection ostéo-articulaire sur matériel documentée à *S. epidermidis*. La documentation microbiologique était établie selon les recommandations fournies en 2013 par l'Infectious Diseases Society of America (Osmon *et al.*, 2013). Ainsi, la présence d'au moins deux souches de *S. epidermidis* identiques (antibiogramme identique ou avec une différence de CMI de deux dilutions par antibiotique) sur des sites différents était considérée comme une IOA à *S. epidermidis*. Les souches avaient été isolées entre janvier 2010 et décembre 2012. 5 souches supplémentaires de *S. epidermidis* responsables d'infections ostéo-articulaires sur matériel avaient été collectées, au cours de la réalisation de ce travail (année 2018). Les isolats cliniques avaient été conservés dans des bouillons glycérolés à une température de -20°C.

- « Souches contaminantes » : ce second sous-groupe était composé de souches de *S. epidermidis* isolées d'une infection ostéo-articulaire sur matériel, et considérées comme contaminantes.

- « Souches témoins » : ce troisième sous-groupe était composé de souches de *S. epidermidis* isolées chez des sujets sains, sans contact avec l'hôpital. Les souches avaient été recueillies par écouvillonnage cutané.

### B. Collection de souches d'ostéite de pieds diabétiques

Cette collection comprenait une partie des souches issues de l'étude « Analyse bactériologique quantitative et qualitative de biopsies osseuses de pieds diabétiques et recherche des facteurs de pathogénicité » menée par le Dr F. Baudoux dans le cadre de son Master 2 recherche. Ce travail prospectif avait été mené entre février 2010 et mai 2011 dans les centres hospitaliers de Tourcoing et de Lille. Les patients étaient des patients diabétiques (diabète de type I ou II), atteints d'ostéite documentée par la clinique (contact osseux positif) et l'imagerie (Baudoux, 2010). Les isolats

cliniques avaient été conservés dans des bouillons Mueller-Hinton glycérolés (10%) à une température de -20°C.

### C. Souche de référence

La souche de référence *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) était utilisée comme contrôle positif (souche productrice de biofilm isolée durant l'épidémie de sepsis liés au cathéter ayant sévit à Memphis en 1979 et 1980) (Christensen *et al.*, 1985; Gill *et al.*, 2005).

## II. **Culture bactérienne et identification**

Les souches étaient réisolées la veille sur gélose au sang (Columbia agar + Horse Blood, Oxoid, Thermo Fisher Scientific®) et incubées en condition aérobie à 37°C. L'identification des souches était ensuite vérifiée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (MALDI Biotyper, Bruker®). Une colonie isolée était déposée sur la cible à l'aide d'un cône. Une fois le dépôt sec, 1µL de la matrice acide A-cyano-4-hydroxy-cinnamique (HCCA) était déposé sur le spot. Les spectres obtenus étaient confrontés aux spectres de référence des bases BDAL et SR-Clinical (mise en évidence des bactéries classiques et hautement pathogènes).

## III. **Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN des souches était réalisée à l'aide du kit Macherey-Nagel (NucleoSpin® 8 Tissue) sur l'automate MICROLAB STARlet (Hamilton®).

200µL d'eau distillée stérile étaient distribués dans des tubes à vis 2mL (Sarstedt®). Un fond de bille de verre ≤106µm (Sigma®) était déposé dans chacun des tubes, puis 1 à 2 colonies de *S. epidermidis* étaient ajoutées. Les colonies étaient broyées par lyse mécanique (7000 oscillations, 70 secondes) sur l'automate Magna-Lyser (Roche®).

Les extractions étaient réalisées sur l'automate MICROLAB STARlet (Hamilton®). 25µL de protéinase K par échantillon étaient déposés sur une plaque 96 puits, avec 10µL d'échantillon et 180µL de tampon de lyse. La plaque était agitée hors du robot sur un agitateur thermique, pendant 1h à 56°C (650 rpm). Les extractions étaient effectuées sur barrettes de colonnes de silice. Les éluats contenant l'ADN étaient ensuite transférés dans de nouveaux tubes.

## IV. Polymerase-chain reaction (PCR)

### A. Choix des gènes

Les gènes choisis pour discriminer les souches virulentes des souches commensales étaient pour la plupart des gènes impliqués dans la formation du biofilm.

Un gène impliqué dans la résistance à la chlorhexidine était également étudié. Il s'agit de *QacA*, décrit comme étant plus fréquemment isolé chez des souches de *S. epidermidis* issus d'IOA que parmi des souches commensales (Prag *et al.*, 2014).

Enfin, deux gènes considérés par Yao comme discriminant potentiellement les souches invasives (cohorte de souches isolées d'IOA sur matériel) et les souches témoins (isolées de la peau d'individus sains) étaient étudiés. Il s'agissait des gènes *SE2251* (codant pour une protéine de surface) et *SE1875* (codant probablement pour une protéine conservée) (Yao *et al.*, 2005).

### B. Préparation des amorces

Les amorces (Eurofins®) étaient dessinées manuellement. L'absence de formation de primer dimer était vérifiée informatiquement. Il y a deux types de primer dimer identifiés dans les réactions de PCR, qui sont responsables d'une réaction d'amplification non spécifique. Il s'agit des cross-primer dimers (interaction intermoléculaire entre le fragment sens et le fragment anti-sens) et des self-primer dimers (interaction au sein de la même amorce). Afin de s'affranchir de ces amplifications non spécifiques, les amorces étaient désignées plusieurs fois, jusqu'à l'obtention d'une valeur de  $\Delta G$  (énergie en kcal/mol nécessaire à rompre un double-brin d'ADN) supérieure à -9 kcal/mol. Les amorces utilisées sont résumées dans le **Tableau XI**.

Après réception, les amorces étaient reconstituées à 100 pmol/ $\mu$ L dans de l'eau ultrapure (en suivant les recommandations du fournisseur) puis stockées à -20°C. Finalement, les amorces étaient diluées au 1/10<sup>ème</sup> avant leur utilisation.

### C. Mise au point de la technique d'amplification

L'optimisation des conditions de PCR était réalisée sur le thermocycleur 7500 (Applied Biosystems®), en utilisant la technologie SybrGreen (fluorophore qui se lie à l'ADN double brin). Le volume final réactionnel était de 25 $\mu$ L/puit. Une gamme (100nM, 200nM, 300nM, 500nM et 900nM) était réalisée pour chaque couple d'amorces, afin de choisir la concentration d'amorce à utiliser pour avoir des résultats optimaux. Pour la réalisation de la gamme, les souches utilisées étaient la souche de référence RP62A ainsi que 3 souches infectantes.

**Tableau XI** - Rapport de synthèse des oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR

<b>Gène cible</b>	<b>Oligo-nucléotides</b>	<b>Séquence (5' → 3')</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Présence chez la souche RP62A</b>
<b>aap</b>	<i>aap_Fwd</i>	GCCTGCTGATAGTTCATCCAA	57,9	OUI
	<i>aap_Rev</i>	TTGTTGTACCAGGTGGCTGTC	59,8	
<b>bap</b>	<i>bap_Fwd</i>	ACATGTCAGGATCAAACCTCTGGA	58,9	NON
	<i>bap_Rev</i>	CGCACGAATAAAGTTGACTTCCC	60,6	
<b>bhp</b>	<i>bhp_Fwd</i>	TTGACAAGTCATGATGAGAGTCCT	59,3	OUI
	<i>bhp_Rev</i>	TGAATACTCGGAATTATTGGGCTTT	58,1	
<b>embp</b>	<i>embp_Fwd</i>	AGCACTGATGGTATGACGCA	57,3	OUI
	<i>embp_Rev</i>	AGACCTTGTTTCGCCTGTGT	57,3	
<b>lcaA1</b>	<i>lcaA1_Fwd</i>	TGAAACAGTTCAAGACACGCTT	56,5	OUI
	<i>lcaA1_Rev</i>	CCCTCATTGAGTGCATTAGCTTT	58,9	
<b>lcaA2</b>	<i>lcaA2_Fwd</i>	ACGTGCTCTATGCTGGATGT	57,3	OUI
	<i>lcaA2_Rev</i>	CATAGTACGATGTAGACCCATGTA	59,3	
<b>lcaD</b>	<i>lcaD_Fwd</i>	TGGATGTATTGTATCGTTGTGATGA	58,1	OUI
	<i>lcaD_Rev</i>	TTTTTGAAACGCGAGACTAAATGT	55,9	
<b>IS256</b>	<i>IS256_Fwd</i>	GCCATGAGGGCTTTTTTCGTT	57,3	OUI
	<i>IS256_Rev</i>	ATGAGCGCAGCTTTACGACA	57,3	
<b>QacA</b>	<i>QacA_Fwd</i>	TGGACCAATTATCGGAGGAGC	59,4	NON
	<i>QacA_Rev</i>	ACCAGTCCAATCATGCCTGC	57,3	
<b>SE1875</b>	<i>SE1875_Fwd</i>	TGATTTTGTTGCTGGTGGTAGT	56,5	NON
	<i>SE1875_Rev</i>	AACGGTATCGTGAGTGGGAT	57,3	
<b>SE2251</b>	<i>SE2251_Fwd</i>	CTCACTTGTTGATGCAGACG	57,3	NON
	<i>SE2251_Rev</i>	AGTGTGAGCGACTCGGAAAG	59,4	

Pour chaque gène, la concentration finale choisie a été la concentration en oligonucléotides la plus faible permettant d'avoir une amplification correcte.

#### D. Réalisation des PCR

La totalité des PCR était réalisée en plaque 96 puits sur le thermocycleur QuantStudio7 (Applied Biosystems®), en utilisant la technologie SybrGreen, en mode rapide. Le volume final réactionnel était de 10µL. La concentration en oligonucléotides était de 100nM pour chacun des gènes. Les volumes réactionnels des différents réactifs nécessaires sont listés dans le **Tableau XII**. Une étape initiale de dénaturation (95°C, 3min) était suivie de 45 cycles de dénaturation / extension (95°C, 5s puis 60°C, 15s). L'ensemble des amplifications était réalisé en dupliqua voire en tripliqua en cas de résultats équivoques lors de l'interprétation des courbes d'amplification.

**Tableau XII** - Volumes réactionnels finaux utilisés pour les réactions de PCR

	<b>100nM</b>
<b>Mix Sybr Green (µL)</b>	5
<b>Amorce sens 10µM (µL)</b>	0.1
<b>Amorce anti-sens 10µM (µL)</b>	0,1
<b>Eau (µL)</b>	2.8
<b>Extrait (µL)</b>	2
<b>Volume total (µL)</b>	10

#### V. **Recueil des données cliniques et épidémiologiques**

Les données cliniques et épidémiologiques étaient collectées rétrospectivement pour chacun des patients pour lequel une souche avait été isolée, après lecture des dossiers patients sur Sillage (dossier patient informatisé), sur les périodes correspondant à la date d'intervention. Un travail prospectif a également été fait pour les souches contaminantes, afin d'évaluer la progression clinique de ces patients. Les données microbiologiques ont été recueillies sur le logiciel du laboratoire (Molis).

Les paramètres relatifs à l'épidémiologie du patient, aux caractéristiques de l'infection, aux données microbiologiques ainsi qu'à l'issue clinique étaient ainsi colligés. Concernant le type d'infection, la catégorisation était faite en infection précoce (IOA survenant dans les 3 mois après la réalisation du geste), retardée (IOA survenue entre 3 mois et 1 ans après l'intervention) ou chronique (IOA survenue au-delà d'un an) (Tsai *et al.*, 2015). Pour catégoriser l'issue clinique, les patients étaient considérés comme

guéris s'il n'y avait plus de signe local ou global d'infection, en l'absence de poursuite d'antibiothérapie et en l'absence de reprise chirurgicale, et si une restauration fonctionnelle articulaire était obtenue à au moins 2 ans. Les patients étaient considérés comme non guéris si au moins un de ces critères n'était pas respecté (Post *et al.*, 2017). Enfin, certains patients n'ont pas été suivis (perdus de vue).

## **VI. Analyses statistiques**

Les variables qualitatives ont été décrites en termes d'effectifs et de pourcentages. Les variables quantitatives non gaussiennes ont été décrites en termes de médiane et d'intervalle interquartiles. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Les comparaisons de deux groupes de souches ont été étudiées à l'aide d'un test du Chi-deux pour les variables qualitatives ou de Fisher exact (lorsque les conditions de validité du test du Chi-deux ne sont pas vérifiées), et à l'aide d'un test U de Mann-Whitney pour les variables continues non gaussiennes.

Les comparaisons de plus de deux groupes de souches ont été réalisées à l'aide d'un test du chi-deux ou de Fisher exact pour les variables qualitatives. En cas de différence globale significative, des comparaisons post hoc deux à deux ont été effectuées en appliquant la correction de Bonferroni.

Les tests bilatéraux ont été réalisés avec un niveau de significativité de 5%. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4). Les analyses statistiques ont été réalisées par l'Unité de Méthodologie - Biostatistique du CHU de Lille.

# RESULTATS

---

## I. Adaptation technique sur le thermocycleur QuantStudio 7

### A. Validation des amorces utilisées

Afin de valider les amorces, chacune d'entre elles a été testée initialement avec un contrôle positif (RP62A ou une souche infectante pour *bap*, *QacA*, *SE1875* et *SE2251*). De manière générale, l'utilisation d'une amorce est légitimée par l'allure de la courbe de fusion obtenue. L'obtention d'un seul pic est interprété comme matérialisant la présence d'un seul amplicon au sein du mélange réactionnel. Cela permet de s'assurer de la spécificité des amorces. L'analyse des courbes de fusion obtenue nous a permis de confirmer la spécificité des amorces pour les gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *SE2251*, *QacA*, *bhp* et *IcaD*. Pour *bap*, en l'absence de contrôle positif fiable, nous n'avons pas pu valider les amorces. Enfin pour *IcaA*, la première amorce ne donnant pas de courbes de fusion correctes, nous avons choisi de redessiner puis d'utiliser une autre amorce (*IcaA2*).

### B. Optimisation des conditions de réaction

Nous avons comparé l'aspect des courbes de fusion obtenu avec les 5 concentrations d'amorces testées. Nous avons ensuite choisi la concentration d'amorces la plus faible permettant une amplification correcte. Pour toutes les amorces, cette concentration a été estimée à 100nM.

### C. Validation technique sur QuantStudio

Le passage sur QuantStudio nous a permis à la fois de diviser par deux le temps de réalisation de la PCR qui était de 40 minutes en mode rapide *versus* 90 minutes en mode conventionnel, mais également de réduire les volumes réactionnels. En effet, sur le thermocycleur ABI7500, le volume final réactionnel était de 25 $\mu$ L. Il était de 10 $\mu$ L sur le thermocycleur QuantStudio. La première plaque testée a donné des résultats tout à fait satisfaisants, nous permettant de réaliser l'ensemble de nos manipulations sur ce thermocycleur.

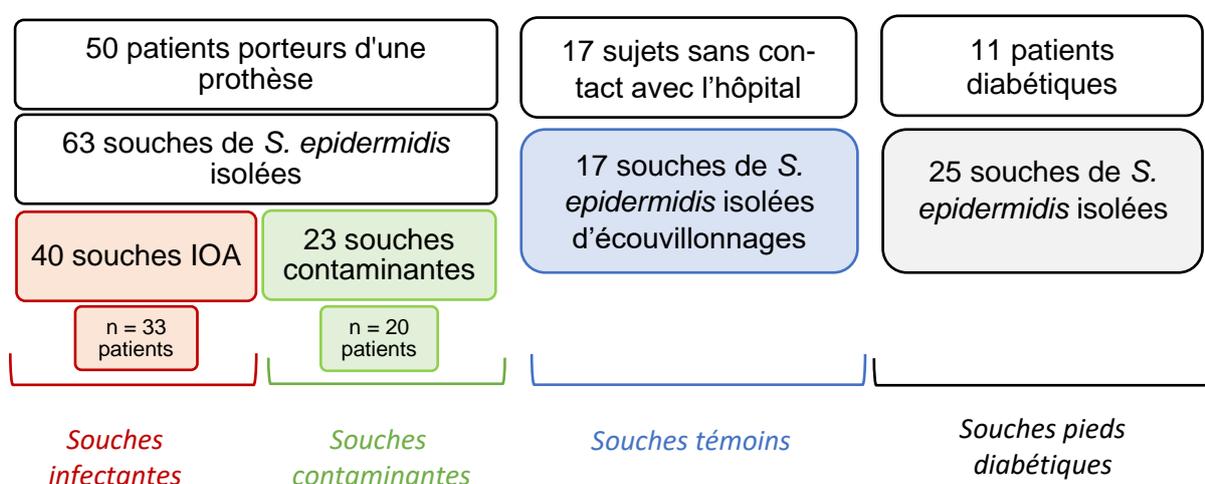
## II. Description des groupes étudiés

Le groupe « souches infectantes » ou « IOA » comportait 40 souches, isolées de 33 patients différents (**Figure 10**). En effet, pour 5 des patients, deux souches de *S. epidermidis* avaient été isolées et pour 1 patient nous avons étudié 3 souches distinctes.

Le groupe « souches contaminantes » comportait 23 souches, isolées chez 20 patients. Pour 3 des patients, nous disposions de 2 souches de *S. epidermidis*.

Le groupe « témoin » comportait 17 souches, provenant de 17 sujets.

Le groupe « pied diabétique » comportait 25 souches, isolées de 11 patients.



**Figure 10** - Schéma synthétique des populations étudiées

## III. Apport diagnostique de l'identification des facteurs de pathogénicité de *S. epidermidis* dans les infections sur matériel

### A. Statistiques descriptives démographiques des patients des groupes infection ostéo-articulaire et contamination

Un effectif de 33 patients présentant une infection ostéo-articulaire sur matériel avérée à *S. epidermidis* et de 20 patients pour lesquels une souche contaminante était isolée ont été inclus dans cette étude. Les caractéristiques démographiques des patients des deux groupes sont résumées dans le **Tableau XIII**. Celles-ci étaient similaires dans les deux groupes. A l'issue du suivi, la majorité des patients était considérée comme guéris soit 77,5% et 82,6% des groupes « IOA » et « contamination ». Six patients étaient perdus de vue : cinq dans le groupe infecté et un dans le groupe contaminant.

**Tableau XIII** - Caractéristiques démographiques des patients des groupes IOA et contamination

	Groupe IOA (n = 33)	Groupe contamination (n = 20)	p-value
<b>Age (Moyenne ± Ecart type)</b>	63,8 ± 15,6	70,0 ± 13,4	0,17♦
<b>Homme (n (%))</b>	17 (51,5%)	5 (25,0%)	0,058 ♦♦
<b>IMC si ≥ 30kg/m<sup>2</sup></b>	8 (24,2%)	3 (15,0%)	0,50 ♦♦♦
<b>Pathologies chroniques (n (%))</b>			
Diabète	7 (21,2%)	6 (30,0%)	0,52 ♦♦♦
Insuffisance rénale	2 (6,1%)	3 (15,0%)	na
Hémopathie / Tumeur	3 (9,1%)	5 (25,0%)	0,14 ♦♦♦
Cardiopathie	6 (18,2%)	7 (35,0%)	0,20 ♦♦♦
Insuffisance respiratoire	2 (6,1%)	2 (10,0%)	na
Immunodépression	0 (0,0%)	0 (0,0%)	na
Hypertension	13 (39,4%)	10 (50,0%)	0,45 ♦♦
Insuffisance hépatique	0 (0,0%)	1 (5,0%)	na
Polyarthrite rhumatoïde	2 (6,1%)	1 (5,0%)	na
<b>Prothèses (n (%))</b>			0,72 ♦♦
Hanche	23 (69,7%)	13 (65,0%)	
Genou	10 (30,3%)	7 (35,0%)	
<b>Nature du geste *</b>			na
Lavage	12 (30,0%)	5 (21,7%)	
Reprise en 1 temps	14 (35,0%)	4 (17,4%)	
Reprise en 2 temps	13 (32,5%)	13 (56,5%)	
Ponction	1 (2,5%)	1 (4,3%)	
<b>Infection</b>			na
Précoce	7 (21,2%)	5 (25,0%)	
Retardée	2 (6,1%)	2 (10,0%)	
Chronique	24 (72,7%)	13 (65,0%)	
<b>CRP ** (Moyenne ± Ecart type)</b>	38,0 ± 46,5	39,8 ± 41,7	1 ♦
<b>Outcome *</b>			na
Guéri	31 (77,5%)	19 (82,6%)	
Non guéri	4 (10,0%)	3 (13,0%)	
Perdus de vue	5 (12,5%)	1 (4,3%)	

\* n = 40 pour le groupe IOA et n = 23 pour le groupe contamination

\*\* n = 34 pour le groupe IOA et n = 20 pour le groupe contamination

♦ Test de Wilcoxon    ♦♦ Test du Khi-deux    ♦♦♦ Test de Fisher exact

na pour non réalisable

Les caractéristiques démographiques des patients des deux groupes sont similaires.

## B. Statistiques descriptives des prélèvements microbiologiques effectués chez les patients des groupes infection ostéo-articulaire et contamination

### a) *Cultures*

Le nombre moyen de prélèvements standards positifs à *S. epidermidis* était de  $1,8 \pm 1,2$  pour les réelles infections contre  $0,4 \pm 0,5$  ( $p < 0,0001$ ) pour les contaminations. Le nombre moyen de milieux de Rosenow positifs à *S. epidermidis*

était de  $2,8 \pm 1,3$  pour le groupe IOA et de  $0,7 \pm 0,5$  pour le groupe contamination ( $p < 0,0001$ ). Pour les patients avec une réelle infection à *S. epidermidis*, l'infection était surtout monomicrobienne. Ainsi, le nombre moyen de prélèvements standards positifs avec un autre micro-organisme était de  $0,2 \pm 0,5$  pour les souches infectantes contre  $0,4 \pm 0,7$  pour les souches contaminantes ( $p = 0,05$ ). Pour les patients avec une contamination, l'infection était alors due à un autre SCN, à *S. aureus*, à *S. lugdunensis*, à un bacille Gram positif, à un streptocoque, ou encore à *Pseudomonas aeruginosa*.

#### b) Sensibilité aux antibiotiques

Le phénotype de résistance des souches isolées des deux groupes a été étudié pour trois molécules : la méticilline, la rifampicine et la gentamicine. Les fréquences de résistance sont reportées dans le **Tableau XIV**. Ainsi, 70,0% et 69,6% des souches étaient résistantes à la méticilline dans les groupes IOA et contamination respectivement. La résistance à la rifampicine touchait 25,0% des souches du groupe IOA et 34,8% des souches du groupe contamination. La résistance à la gentamicine était mise en évidence dans 45,0% des souches du groupe IOA et 56,5% des souches du groupe contamination. Par ailleurs, la présence de la séquence d'insertion IS256 était corrélée à la résistance à la gentamicine pour 55 des 63 isolats, soit 87,3%. De manière générale, les fréquences de résistance vis-à-vis de ces trois molécules étaient similaires dans les deux groupes.

**Tableau XIV** – Pourcentages de résistance à l'oxacilline, à la rifampicine et à la gentamicine des souches des groupes IOA et contamination

Antibiotique	Groupe IOA (n = 40)	Groupe contamination (n = 23)	p-value (Test du chi- deux)
<b>Oxacilline</b>	28 (70,0%)	16 (69,6%)	0,97
<b>Rifampicine</b>	10 (25,0%)	8 (34,8%)	0,41
<b>Gentamicine</b>	18 (45,0%)	13 (56,5%)	0,38

#### C. Distribution des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* au sein des groupes IOA, contamination et témoin

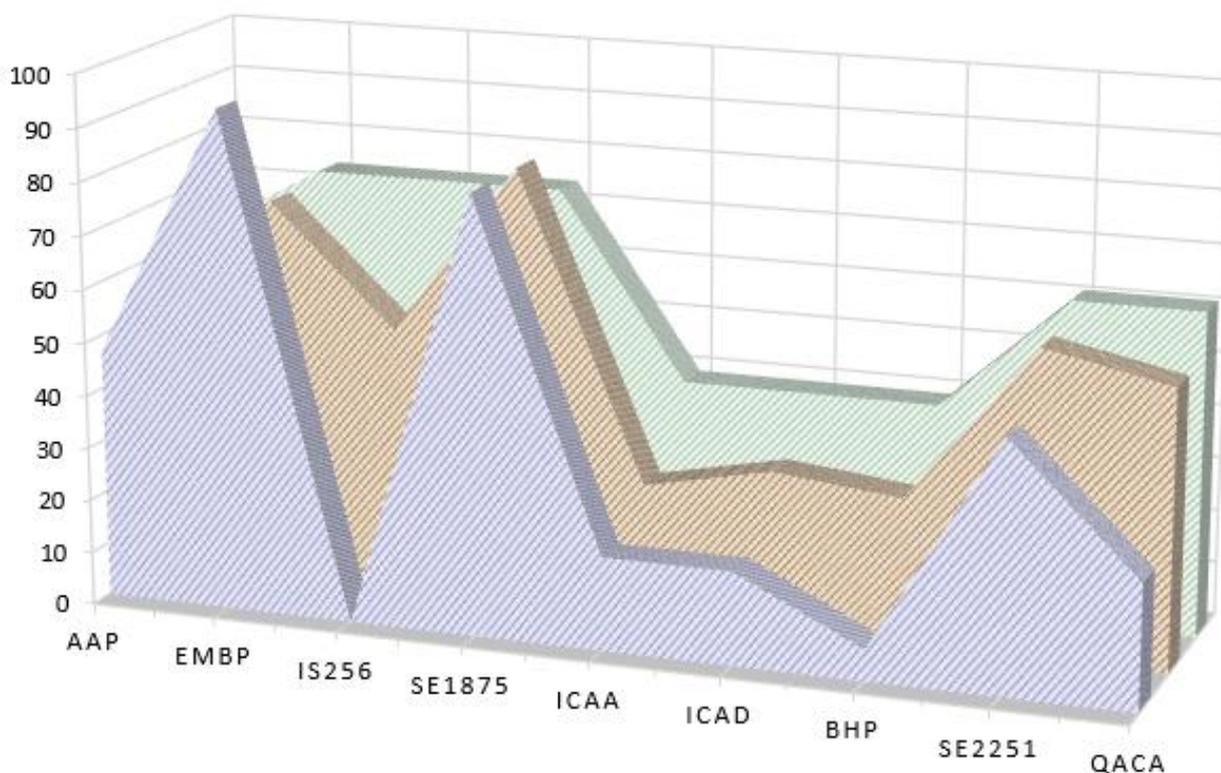
Le gène *aap* était présent respectivement dans 60,0% des souches du groupe IOA ; 60,9% des souches du groupe contamination ; 47,1% des souches du groupe témoin. Le gène *embp* était présent respectivement dans 72,5% des souches du

groupe IOA ; 73,9% des souches du groupe contamination ; 94,1% des souches du groupe témoin. Le gène *IS256* était présent respectivement dans 50,0% des souches du groupe IOA et dans 73,9% des souches du groupe contamination. Le gène *IS256* était absent des souches du groupe témoin. Le gène *SE1875* était présent respectivement dans 82,5% des souches du groupe IOA ; 73,9% des souches du groupe contamination et 82,4% des souches du groupe témoin. Le gène *IcaA* était présent respectivement dans 25,0% des souches du groupe IOA ; 39,1% des souches du groupe contamination et 17,6% des souches du groupe témoin. Le gène *IcaD* était présent respectivement dans 30,0% des souches du groupe IOA ; 39,1% des souches du groupe contamination et 17,6% des souches du groupe témoin. Le gène *bhp* était présent respectivement dans 27,5% des souches du groupe IOA ; 39,1% des souches du groupe contamination et 5,9% des souches du groupe témoin. Le gène *SE2251* était présent respectivement dans 57,5% des souches du groupe IOA ; 60,9% des souches du groupe contamination et 47,1% des souches du groupe témoin. Le gène *QacA* était présent respectivement dans 52,5% des souches du groupe IOA ; 60,9% des souches du groupe contamination et 23,5% des souches du groupe témoin (**Figure 12**).

La présence des différents gènes du locus *ica* apparait comme étant étroitement régulée : soit ces gènes (*i.e* *IcaA*, *IcaB*, *IcaC*, *IcaD* et *IcaR*) sont tous présents, soit ils sont tous absents (Arciola *et al.*, 2004). Dans notre étude, nous définissons la corrélation entre *IcaA* et *IcaD* comme suit : *IcaA* et *IcaD* sont présents simultanément ou *IcaA* et *IcaD* sont absents simultanément. La corrélation est de 80,0% pour le groupe IOA ; 91,3% pour le groupe contamination et de 100% pour le groupe témoin (**Tableau XV**).

**Tableau XV** - Corrélation entre la présence des gènes *IcaA* et *IcaD*

	<b>Groupe IOA (n = 40)</b>	<b>Groupe contamination (n = 23)</b>	<b>Groupe témoins (n = 17)</b>
<b>Corrélation <i>IcaA</i> / <i>IcaD</i></b>	6 (80,0%)	21 (91,3%)	17 (100,0%)



**Figure 12** - Distribution des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* au sein des souches infectantes (en orange), contaminantes (en vert) et témoins (en bleu).

D. Comparaison de fréquence des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* dans les groupes IOA versus contamination et témoin

a) *Analyses statistiques : tests de comparaison de fréquence*

Afin d'identifier un biomarqueur moléculaire permettant de discriminer les isolats invasifs des isolats contaminants, la fréquence de distribution des différents gènes étudiés a été comparée (**Tableau XVI**). Le gène *IS256* - absent des souches du groupe témoin - semblait être un bon marqueur pour discriminer les trois groupes ( $p < 0,001$ ). La distribution du gène *bhp* tendait à discriminer les groupes ( $p = 0,059$ ). Il en était de même pour le gène *QacA* ( $p = 0,052$ ).

Afin de préciser ces tendances, des comparaisons intra-groupes ont été effectuées pour les 3 gènes susmentionnés (**Tableaux XVII, XVIII et XIX**).

**Tableau XVI** – Distribution des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* au sein des groupes IOA, contamination et témoin

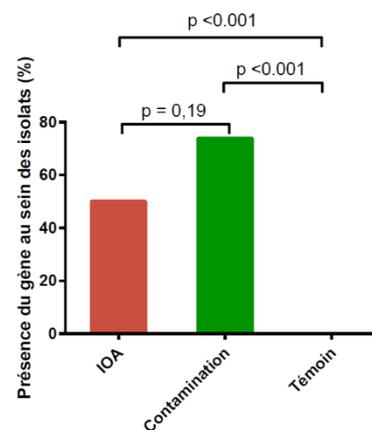
Gène	Groupe IOA (n = 40)	Groupe contamination (n = 23)	Groupe témoin (n = 17)	p - value
<i>aap</i>	24 (60,0%)	14 (60,9%)	8 (47,1%)	0,62*
<i>embp</i>	29 (72,5%)	17 (73,9%)	16 (94,1%)	0,18*
<i>IS256</i>	20 (50,0%)	17 (73,9%)	0 (0,0%)	<0,001*
<i>SE1875</i>	33 (82,5%)	17 (73,9%)	14 (82,4%)	0,76**
<i>IcaA</i>	10 (25,0%)	9 (39,1%)	3 (17,6%)	0,28*
<i>IcaD</i>	12 (30,0%)	9 (39,1%)	3 (17,6%)	0,34*
<i>bhp</i>	11 (27,5%)	9 (39,1%)	1 (5,9%)	0,059*
<i>SE2251</i>	23 (57,5%)	14 (60,9%)	8 (47,1%)	0,67*
<i>QacA</i>	21 (52,5%)	14 (60,9%)	4 (23,5%)	0,052*

\* Test du Khi-deux

\*\* Test de Fisher exact

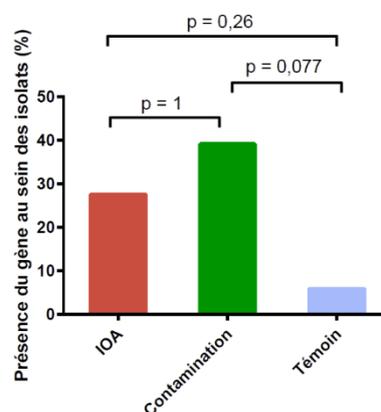
**Tableau XVII** - Comparaison intra-groupe pour *IS256*

Comparaison 2 à 2	p-value
Groupe IOA <i>versus</i> contamination	0,19
Groupe IOA <i>versus</i> témoins	<0,001
Groupe contamination <i>versus</i> témoins	<0,001



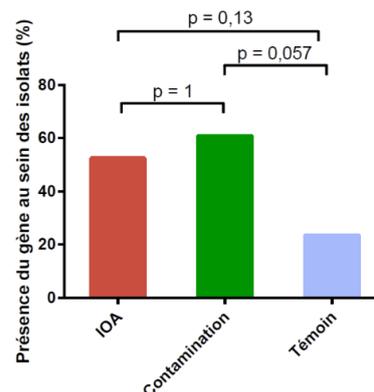
**Tableau XVIII** - Comparaison intra-groupe pour *bhp*

Comparaison 2 à 2	p-value
Groupe IOA <i>versus</i> contamination	1
Groupe IOA <i>versus</i> témoins	0,26
Groupe Contamination <i>versus</i> témoins	0,077



**Tableau XIX** - Comparaison intra-groupe pour *QacA*

Comparaison 2 à 2	p-value
Groupe IOA <i>versus</i> contamination	1
Groupe IOA <i>versus</i> témoins	0,13
Groupe Contamination <i>versus</i> témoins	0,057



Le gène *IS256* permettait de différencier les souches appartenant au groupe témoin de celles appartenant aux groupes IOA ou contamination. Les gènes *bhp* et *QacA* permettaient de distinguer les souches du groupe témoin des souches du groupe contamination. Ils ne permettaient pas en revanche de distinguer les souches du groupe témoin des souches du groupe IOA. A ce stade, aucun gène ne permettait de discriminer les souches du groupe IOA des souches du groupe contamination.

*b) Analyses statistiques : critères composites*

La production de PIA (sous la dépendance des gènes *IcaA* et *IcaD*) est le principal facteur de virulence de *S. epidermidis*. Cependant, la présence des gènes *IcaA* et *IcaD* ne permettait pas de discriminer les souches du groupe IOA des souches du groupe contamination. L'accumulation des bactéries entre elles pouvant être PIA-indépendante, nous avons voulu vérifier si les facteurs protéiques ne suppléaient pas aux facteurs polysaccharidiques dans le groupe IOA.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons créé un critère composite associant les gènes impliqués dans la formation du biofilm polysaccharidique à ceux impliqués dans la formation du biofilm protéique. Ce critère prend le score de 1 si la souche possède ou le gène *aap*, ou le gène *embp* ou les gènes *IcaA* et *IcaD* (**Tableau XX**).

**Tableau XX** - Tableau de contingence selon le critère composite « Biofilm »

Valeur du critère	Groupe IOA (n = 40)	Groupe contamination (n = 23)	Groupe témoin (n = 17)
0	3 (7,5%)	1 (4,35%)	1 (5,88%)
1	37 (92,50%)	22 (95,6%)	16 (94,1%)

Critère 1 = 1 si présence du gène *aap* ou du gène *embp* ou si présence des gènes *IcaA* et *IcaD* ; sinon critère 1 = 0

L'application du test de Fischer donnait une p-value non significative à 1. Il ne semblait pas y avoir de différence quant à la distribution des gènes impliqués dans la formation du biofilm entre les groupes étudiés.

L'analyse statistique univariée montrait que les gènes *IS256*, *bhp* et *QacA* permettaient de discriminer les souches des groupes IOA et contamination des souches témoins. Un critère composite combinant ces 3 gènes a alors été créé : ce critère vaut 0 en l'absence de *IS256*, de *bhp* et de *QacA*. Si au moins un des trois gènes est présent, il vaut 1 (**Tableau XXI**).

**Tableau XXI** - Tableau de contingence selon le critère composite « *IS256 + bhp + QacA* »

Critère 2	Groupe IOA (n = 40)	Groupe contamination (n = 23)	Groupe témoin (n = 17)
0	11 (27,5%)	3 (13,0%)	12 (70,6%)
1	29 (72,5%)	20 (87,0%)	5 (29,4%)

Critère 2 = 0 si *IS256* = 0 et *bhp* = 0 et *QacA* = 0, sinon critère 2 = 1.

L'application de test du Khi-deux nous donnait une valeur de  $p = 0,0004$ . Le critère composite « *IS256 + bhp + QacA* » pouvait être utilisé pour distinguer les souches appartenant au groupe témoin.

#### E. Corrélation génotype et issue clinique

Post *et al.* ont étudié l'association entre le génome ainsi que des données phénotypiques de souches de *S. epidermidis* isolées d'infections sur matériel avec la guérison de l'infection. Trois des gènes étudiés dans notre étude ont été isolés plus fréquemment chez les souches provenant de patients non guéris. Il s'agit des gènes *bhp*, *QacA* et du gène codant pour la séquence d'insertion *IS256* (Post *et al.*, 2017).

Afin d'étayer ces données, nous avons évalué la distribution des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* en fonction de l'issue clinique des patients (« guéris » ou « non guéris ») des groupes IOA et contamination (**Tableau XXII**). Le gène *SE2251* était associé à l'état « Non guéri ».

**Tableau XXII** - Répartition des gènes en fonction de l'état "Guéri" ou "Non guéri"

Gène	Outcome		p-value (Test de Fischer)
	Guéri (n = 50)	Non guéri (n = 7)	
<i>aap</i>	30 (60,0%)	4 (57,1%)	1,00
<i>embp</i>	34 (68,0%)	7 (100,0%)	0,17
<i>IS256</i>	28 (56,0%)	5 (71,4%)	0,69
<i>SE1875</i>	39 (78,0%)	6 (85,7%)	1,00
<i>lcaA</i>	16 (32,0%)	2 (28,6%)	1,00
<i>lcaD</i>	17 (34,0%)	2 (28,6%)	1,00
<i>bhp</i>	15 (30,0%)	3 (42,9%)	0,67
<i>SE2251</i>	28 (56,0%)	7 (100,0%)	0,04
<i>QacA</i>	28 (56,0%)	4 (57,1%)	1,00

#### IV. Identification des facteurs de pathogénicité de *S. epidermidis* dans les ostéites du pied diabétique

##### A. Description clinique du groupe ostéite

La description clinique de ce groupe repose sur les données recueillies par le Dr F. Baudoux (**Tableau XXIII**). Les données bactériologiques ont été ensuite collectées sur le logiciel de laboratoire Molis pour les patients de Lille. Pour les patients de Tourcoing, les dossiers sont antérieurs à la version du logiciel de laboratoire utilisée (Logiciel Glims utilisé depuis 2013). On constate que ces souches étaient isolées de flores polymicrobiennes.

**Tableau XXIII – Caractéristiques cliniques des patients du groupe Ostéite**

	Lieu	Age (ans)	Geste	Type de diabète	IR	Neuro	Artério	Bactériologie
<b>Patient 1</b>	T	60	Amp. transmétataphalangienne du 1 <sup>er</sup> orteil gauche	II	Oui	Oui	Non	<i>Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus chromogenes, Corynebacterium striatum</i>
<b>Patient 2</b>	L	65	Amp. 2 <sup>ème</sup> rayon droit	II	Non	Non	Oui	<i>Morganella morganii, Providencia rettgeri, S. epidermidis</i>
<b>Patient 3</b>	L	70	Amp. 5 <sup>ème</sup> rayon gauche	II	Oui	Oui	Oui	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b>Patient 4</b>	L	69	Amp. de l'hallux	II	Oui	Oui	Oui	<i>Enterobacter cloacae, S. epidermidis</i>
<b>Patient 5</b>	L	70	Amp. du 4 <sup>ème</sup> orteil droit	II	Oui	Non	Oui	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b>Patient 6</b>	L	71	Biopsie calcanéum gauche	II	Non	Oui	Oui	<i>Staphylococcus aureus</i> méticillino-sensible, <i>S. epidermidis</i>
<b>Patient 7</b>	L		Amp. 1 <sup>er</sup> rayon	II	Oui	Oui	Oui	<i>S. epidermidis, levures</i>
<b>Patient 8</b>	L	58	Amp. 5 <sup>ème</sup> orteil	II	Non	Oui	Oui	<i>Proteus mirabilis, S. epidermidis</i>
<b>Patient 9</b>	T	69	nd	II	nd	Oui	Non	Streptococcus du groupe G, <i>Staphylococcus aureus</i> méticillino-sensible, <i>S. epidermidis</i>
<b>Patient 10</b>	T	50	nd	II	nd	Oui	Non	<i>Staphylococcus aureus</i> méticillino-sensible, <i>Enterococcus faecalis, Streptococcus spp., S. epidermidis</i>
<b>Patient 11</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

T = Tourcoing, L = Lille ; Age : Age au moment du geste ; Amp = amputation ; IR = insulinorequérant ; Neuro = présence d'une neuropathie diabétique ; artério = présence d'une artériopathie diabétique ; nd = données non disponibles

B. Distribution des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* au sein du groupe ostéite

Les gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* étaient présents respectivement dans 44,0% ; 68,0% ; 44,0% ; 88,0% ; 28,0% ; 28,0% ; 56,0% ; 40,0% et 40,0% des souches du groupe ostéite.

C. Comparaison de fréquence des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* dans le groupe Ostéite versus Témoin

Les gènes *IS256* et *bhp* étaient statistiquement plus fréquents au sein du groupe ostéite que du groupe témoin ( $p = 0,001$  et  $< 0,001$  respectivement) (**Tableau XXIV**).

**Tableau XXIV** - Distribution des gènes *aap*, *embp*, *IS256*, *SE1875*, *IcaA*, *IcaD*, *bhp*, *SE2251* et *QacA* au sein des groupes ostéite et témoin

Gène	Groupe Témoin (n = 17)	Groupe Ostéite (n = 25)	p-value
<i>Aap</i>	8 (47,1%)	11 (44,0%)	0,85*
<i>Embp</i>	16 (94,1%)	17 (68,0%)	0,060**
<i>IS256</i>	0 (0,0%)	11 (44,0%)	0,001**
<i>SE1875</i>	14 (82,4%)	22 (88,0%)	na
<i>IcaA</i>	3 (17,6%)	7 (28,0%)	0,49**
<i>IcaD</i>	3 (17,6%)	7 (28,0%)	0,49**
<i>Bhp</i>	1 (5,9%)	14 (56,0%)	<0,001*
<i>SE2251</i>	8 (47,1%)	10 (40,0%)	0,65*
<i>QacA</i>	4 (23,5%)	10 (40,0%)	0,27*

\* Test du Khi-deux

\*\* Test de Fisher exact

## DISCUSSION

---

*S. epidermidis* est l'une des principales bactéries impliquées dans les infections ostéo-articulaires sur matériel. La pathogénèse de ce type d'infection s'explique par la capacité inhérente de *S. epidermidis* à adhérer à la surface de la prothèse puis à se multiplier au sein d'un biofilm, permettant alors à la bactérie d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte et d'être moins sensible aux antibiotiques. Une prise en charge rapide de ce type d'infection est indispensable et dépend de la précocité du diagnostic. Actuellement, il est délicat d'affirmer l'imputabilité de cette bactérie commensale lorsque celle-ci est isolée d'un unique prélèvement per-opératoire lors d'une reprise prothétique ou d'une chirurgie du pied diabétique. Ainsi, il conviendrait d'identifier un marqueur génétique fiable qui permettrait de discriminer les souches contaminantes de celles réellement impliquées dans l'infection.

Cet objectif a poussé de nombreuses équipes à chercher des caractères génotypiques ou phénotypiques permettant de distinguer les souches invasives des souches commensales. Ces études ont montré que les souches cliniques de *S. epidermidis* différaient des souches commensales par la présence de facteurs de virulence notamment ceux impliqués dans la formation de biofilm (Harris *et al.*, 2016). Cependant, la possibilité d'effectuer une réelle distinction entre les deux groupes est difficile, laissant supposer que l'aptitude à envahir l'hôte et celle à le coloniser ne requièrent pas nécessairement des caractéristiques génétiques différentes.

Ainsi, actuellement, nous sommes toujours à la recherche d'un ou plusieurs marqueurs utilisables en routine permettant de distinguer de manière rapide, simple et directement à partir de la souche un isolat commensal d'un isolat pathogène. C'est pourquoi, au-delà des gènes impliqués dans la formation du biofilm, nous nous sommes intéressés à des gènes connus comme étant impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques et aux antiseptiques, ou putatifs mis en évidence par des méthodes de microarray. Parallèlement, nous nous sommes interrogés sur le potentiel prédictif de ces gènes en termes d'évolution de l'infection.

Pour ce faire, nous avons déterminé la prévalence de ces 10 gènes au sein d'un panel de souches infectantes isolées d'infections sur prothèses et de pieds diabétiques, de souches contaminantes et de souches témoins. Si l'on s'intéresse à la distribution de ces gènes au sein du groupe IOA sur prothèse, nous constatons que les gènes codant pour des protéines engagées dans la formation du biofilm

polysaccharidique (*IcaA* et *IcaD*) étaient présents respectivement dans 25,0 et 30,0% des souches infectantes uniquement. Cette observation est corrélée avec les données d'un travail réalisé par Rohde *et al.* sur 52 souches de *S. epidermidis* et 18 souches de *S. aureus* isolées d'IOA sur prothèse. Dans cette étude, le gène *IcaA* était identifié dans 100% des isolats de *S. aureus* versus 61,5% des souches de *S. epidermidis* (Rohde *et al.*, 2007). Ces résultats laissent présupposer que la formation du biofilm chez *S. epidermidis* ne dépend pas exclusivement de la voie polysaccharidique dans les infections ostéo-articulaires sur matériel. Ainsi, la formation du biofilm relèverait de processus multifactoriels, organisés de manière alternée (Rohde *et al.*, 2007). Le locus *ica* a par ailleurs été proposé comme un moyen de distinguer les isolats cliniques des isolats commensaux. En effet, dans les différents travaux qui se sont intéressés à l'étude de sa prévalence, l'opéron *ica* a été évoqué comme présent plus fréquemment dans les cohortes cliniques qu'au sein des cohortes témoins. Ainsi, il était présent dans 43 à 88% des souches cliniques contre seulement 0 à 38% des souches isolées d'individus sans lien avec l'hôpital (**Tableau XXV**). Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits dans nos différents groupes, même si finalement il est moins détecté dans le groupe IOA que dans le groupe contaminant. De plus, deux problèmes sont associés à son utilisation comme marqueur génétique de virulence de *S. epidermidis* : (i) l'expression d'*ica* est régulée par d'autres gènes et par des facteurs environnementaux, (ii) son utilisation en routine montre des résultats mitigés (Gu *et al.*, 2005). Ainsi l'opéron *ica* ne semble pas être un marqueur fiable pour diagnostiquer les IOA (Koskela *et al.*, 2009)

**Tableau XXV** - Prévalence du locus *ica* (données de la littérature)

Références	Collection	Prévalence du locus <i>ica</i> (%)	
		Au sein des isolats cliniques	Au sein des souches témoins
(Ziebuhr <i>et al.</i> , 1997)*	Bactériémies (n = 55) Volontaires sains (n = 36)	85%	6%
(Galdbart <i>et al.</i> , 2000)*	Infections sur prothèse (n = 54) Volontaires sains (n = 23)	81,5%	17,4%
(Freboung <i>et al.</i> , 2000)**	Sepsis (S) (n = 39) Contamination d'une hémoculture (C) (n=39) Infection sur cathéter (K) (n = 40) Volontaires sains (V) (n = 40)	S : 76,9% K : 68,2 %	V : 37,5% C : 28,2%

<b>(Vandecasteele et al., 2003)***</b>	Sepsis (n = 34) Infections sur cathéter (K) (n = 16) Volontaires sains (n = 29)	S : 59% K : 88%	38%
<b>(Arciola et al., 2002)****</b>	Infections sur cathéter (n = 100) Volontaires sains (n = 25)	61%	0%
<b>(Arciola et al., 2004)*****</b>	Infections sur prothèse (n = 120)	43%	
* <i>locus ica</i>	** <i>IcaAB</i>	*** <i>IcaA</i>	**** <i>IcaA et IcaD</i>
			***** <i>IcaA, icaB, icaC, IcaD, icaR</i>

Dans notre travail, la séquence d'insertion *IS256* était totalement absente du panel des souches témoins, ce qui en fait un marqueur potentiellement intéressant. Ce résultat est cohérent avec les données obtenues dans différentes autres collections de souches témoins de *S. epidermidis*. Ainsi, la littérature rapporte la présence de l'*IS256* chez seulement 16,0% des souches isolées de la peau de 55 jeunes étudiants sans contact avec l'hôpital depuis plus de 6 mois (Gu *et al.*, 2005) ; 12,9% de souches isolées chez 31 individus issus de milieux communautaires (Murugesan *et al.*, 2018) ou encore 4,2% de souches isolées chez des individus sans contact avec l'hôpital (n = 12) et d'individus travaillant au sein de laboratoires (n = 12) (Koskela *et al.*, 2009). En revanche, l'*IS256* est volontiers détectée parmi les souches responsables d'IOA, jusqu'à 81% des isolats (Koskela *et al.*, 2009). Ces résultats corroborent ceux décrits dans notre étude pour les groupes IOA et témoins. Pour Rohde *et al.*, cette séquence d'insertion est davantage un marqueur de l'origine hospitalière des souches. En effet, sa détection ne permet finalement pas de différencier les souches cliniques (50% sont *IS256* +) des souches contaminantes (73,9% sont *IS256* +).

Au cours de cette étude, nous nous sommes également attachés à rechercher une corrélation entre le phénotype de résistance des souches à la gentamicine et la présence de cette séquence d'insertion. Les aminosides constituent une classe d'intérêt dans la prise en charge des IOA. En effet, la gentamicine est souvent intégrée dans des ciments orthopédiques. La résistance à la gentamicine au sein de cohortes de *S. epidermidis* isolés d'IOA varie entre 40 et 65% (Anguita-Alonso *et al.*, 2005; Uçkay *et al.*, 2009). *IS256* flanque les régions terminales du transposon Tn4001, et encadre ainsi l'enzyme AAC(6') - APH(2''), pourvu d'une activité aminoglycosidique, responsable de la résistance à la gentamicine. Le rôle de cette séquence d'insertion dans la formation du biofilm et la résistance aux antibiotiques a été investigué par l'équipe de Kozitskaya au sein d'une cohorte de *S. epidermidis*. La séquence

d'insertion *IS256* et la résistance à la gentamicine étaient observées dans les mêmes proportions de 87% pour les isolats provenant des hémocultures (n = 53) et de 4% pour les souches commensales (n = 139). Les proportions étaient quasiment identiques pour les isolats provenant d'infections urinaires (n = 38), avec 45% des isolats résistants à la gentamicine et 47% des isolats porteurs de la séquence d'insertions *IS256*. Le gène *AAC(6') - APH(2'')* était détecté au sein de tous les isolats résistants à la gentamicine, laissant supposer que la résistance à la gentamicine était bien médiée par le transposon *Tn4001* (Kozitskaya *et al.*, 2004). A la lumière de ces données, notre travail pourrait être complété par l'étude de la prévalence du gène *AAC(6') - APH(2'')* afin de confirmer que le transposon *Tn4001* est bien le vecteur de cette résistance. Les bénéfices pratiques de cette démarche semblent néanmoins minimes pour le diagnostic des IOA. La prévalence de la résistance à la méticilline, à la gentamicine et à la rifampicine ne permettaient pas d'ailleurs dans notre étude de distinguer les souches infectantes et contaminantes.

Parallèlement à la résistance aux antibiotiques, nous nous sommes intéressés au support génétique de la résistance à la chlorhexidine. Il s'agit d'un antiseptique de la famille des biguanides, très largement utilisé dans les établissements de santé comme désinfectant pour prévenir la transmission bactérienne et les infections nosocomiales (infections du site opératoire). Un des mécanismes de la résistance à la chlorhexidine est médié par une pompe à efflux, et codé par le gène *QacA*. Nous avons remarqué que le gène *QacA* était présent dans 23,5% de nos souches Témoins. Ce résultat est similaire à celui décrit par Prag *et al.* avec 25% d'isolats témoins (individus sans contact récent avec l'hôpital) porteurs du gène *QacA* (Prag *et al.*, 2014). Il est surprenant de constater qu'un quart des souches témoins (« naïves »), c'est-à-dire obtenues chez des individus sans contact avec le milieu hospitalier soient porteuses de ce gène de résistance. Néanmoins, la prévalence au sein des souches infectantes et contaminantes était au moins deux fois supérieure (52,5% et 60,9% respectivement).

Concernant les gènes *SE1875* et *SE2251*, nos résultats sont décevants et différent totalement de ceux présentés par Yao *et al.* Cette étude rapportait que le gène *SE1875* était présent dans 20/20 (100,0%) des souches contrôles (souches isolées de la peau de sujets sains) et seulement 9/22 (40,9%) des souches cliniques (souches

isolées d'IOA sur matériel) tandis que *SE2251* était présent dans 5/20 (25,0%) des souches contrôles contre 16/22 (72,7%) des souches cliniques (Yao *et al.*, 2005). Dans notre travail, ces gènes étaient présents dans la même proportion quel que soit le groupe, soit 73,9% à 82,5% des souches pour *SE1875* et 47,1% à 60,9% des souches pour *SE2251*.

Si nous cherchons à répondre à notre deuxième objectif principal (*i.e* l'identification d'un ou plusieurs marqueurs permettant de différencier les phénotypes « infectant » et « contaminant »), nous constatons qu'aucun gène ou qu'aucune association de gènes ne permet de distinguer ces deux groupes. De manière surprenante, la fréquence de répartition des gènes au sein du groupe contamination semble plus proche de celle du groupe IOA que de celle du groupe témoin. Il était pourtant tentant de penser que les souches du groupe contamination se rapprocheraient en terme génétique de celles du groupe témoin. Il s'avèrerait que les souches du groupe contamination soient « armées » comme les souches virulentes. Il se peut que lors de séjours à l'hôpital, de la pose initiale de la prothèse voire des reprises chirurgicales elles-mêmes, il se produise un remaniement de la flore cutanée, sélectionnant ainsi des souches aptes à former du biofilm et résistantes aux antibiotiques et aux antiseptiques. L'environnement hospitalier exercerait une pression de sélection sur la population de souches de *S. epidermidis*, aboutissant à la sélection de souches *IcaADBC* et *IS256* positives.

Cette tendance a déjà été rapportée sur des souches isolées de sepsis qui ont été comparées à des souches commensales de *S. epidermidis* isolées chez des patients hospitalisés et à des sujets sains. La présence de 9 gènes était recherchée parmi ces souches : *IcaADBC*, *aap*, *bhp*, *fbe*, *mecA*, *embp*, *atIE*, *IS256* et *IS257* (Rohde *et al.*, 2004). Il en résultait que la fréquence de la répartition de ces gènes était similaire entre les souches invasives et les souches commensales issues des patients hospitalisés. Ainsi, la différenciation entre les souches contaminantes et les souches invasives responsables d'IOA semble impossible par cette méthode.

Finalement, l'ensemble de ces données concordent avec l'hypothèse d'Otto, selon qui, *S. epidermidis* est un pathogène accidentel. Les IOA à *S. epidermidis* constituent un évènement accidentel survenant à partir de la flore commensale. Les souches de portage et invasives constituent ainsi une seule et même entité

microbiologique. La plupart des facteurs de virulence de *S. epidermidis* - nécessaires à la pathogénèse des IOA – ont en effet un rôle dans le commensalisme de cette bactérie. Ainsi, le regroupement des bactéries au sein du biofilm polysaccharidique les protège des peptides anti-microbiens synthétisés par la peau (Rohde *et al.*, 2004).

L'un des objectifs secondaires de notre étude était de déterminer si le profil génotypique des souches permettait de prédire l'évolution clinique de l'infection. Au regard des travaux réalisés par Post *et al.*, certains gènes semblent associés à la guérison de l'infection. Il s'agit du gène *bhp*, du gène *QacA*, des gènes *ccrA* et *ccrB* et du gène codant pour l'*IS256*. Malheureusement, parmi les gènes que nous avons étudiés ici (*bhp*, *QacA*, *IS256*), aucun ne semble associé à la guérison de l'infection. En revanche, le gène *SE2251* était détecté dans tous les isolats de sujets non guéris contre 56% des isolats de sujets guéris. Ceci reste difficilement interprétable au regard du faible effectif de notre étude : 7 patients non guéris *versus* 19 dans l'étude de Post *et al.* De plus, nous avons fait le choix de réunir les deux groupes (IOA et Contaminations) pour majorer cet effectif, ce qui entraîne un biais de sélection. En effet les patients non guéris (n = 3) du groupe Contamination ont probablement vu leur situation clinique se détériorer du fait de la persistance d'autres bactéries virulentes (un patient avec une collection à SARM, un second avec une bactériémie à Streptocoque).

Pour ce qui est de l'étude des souches isolées de pieds diabétiques, ce travail est l'un des premiers à avoir étudié la répartition des gènes impliqués dans la formation du biofilm et la résistance aux antiseptiques au sein d'une cohorte de *S. epidermidis* issus d'ostéite de pied diabétique. Les souches ayant été isolées majoritairement au sein de flores plurimicrobiennes, il est délicat d'imputer le *S. epidermidis* dans le tableau clinique. On peut ainsi seulement constater que les souches isolées au décours d'ostéite diffèrent des souches témoins par la présence des gènes *IS256* et *bhp*. Ces données mériteraient d'être corroborées sur des isolats de cultures monomicrobiennes. Un recueil prospectif est actuellement en cours.

Enfin, l'objet de ce travail était également d'explorer la faisabilité et l'intérêt diagnostique de proposer la réalisation de PCR en mode « rapide ». Le laboratoire de microbiologie du Centre de Biologie Pathologie du CHU de Lille regroupe les secteurs de bactériologie, virologie, parasitologie-mycologie qui partagent un plateau commun de biologie moléculaire. Au sein de ce plateau commun, les thermocycleurs permettant la réalisation de PCR en temps réel utilisés pour la bactériologie ont des temps d'analyse moyens de 90 minutes en mode standard (7500, Applied Biosystem® ; CFX96, BioRad® ; LightCycler 480, Roche Life Science®). Au cours de la réalisation de ce travail, j'ai pu réaliser les PCR en utilisant un thermocycleur du plateau commun d'Oncohématologie, en mode dit « rapide ». Ce mode d'utilisation implique que l'appareil est capable d'effectuer beaucoup plus rapidement ses changements de température, ce qui réduit le temps d'analyse à 40 minutes par run, permettant de limiter les conflits de planification des analyses. De plus les analyses ont été réalisées en volume de 10µL, limitant également la consommation de réactifs.

L'utilisation de cet automate démontre la facilité d'adaptation des protocoles de microbiologies en mode rapide, permettant des gains de temps et de réactifs. Par ailleurs, cette méthode s'intègre parfaitement à la routine du laboratoire grâce à ces temps d'occupation de l'automate restreint. On peut alors imaginer rendre les résultats de ces analyses dans la journée. Enfin, pour ce travail exploratoire et pour des raisons de coût, nous avons employé la technologie SybrGreen qui est un agent intercalant non spécifique de l'ADN. Si, à l'avenir, un ou plusieurs marqueurs venaient à être identifiés, la méthode pourrait être optimisée en ayant recours au multiplexage et sensibilisée par l'utilisation de sondes Taqman.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Les données obtenues suggèrent que les gènes *IS256*, *bhp* et *QacA* permettent de différencier les souches appartenant au groupe IOA de celles appartenant au groupe témoin. Cependant, aucun gène ou aucune association de gènes ne permet de différencier les isolats du groupe IOA de ceux du groupe contamination. Les souches du groupe contamination présentent un profil génétique très proche de celles du groupe IOA, suggérant une pression de sélection observée sur les souches de *S. epidermidis* lors d'un séjour à l'hôpital. Il serait intéressant d'évaluer la modification de la colonisation cutanée à *S. epidermidis* à la suite d'une hospitalisation. Enfin, concernant l'évolution de l'infection, au vu du faible effectif de patients non guéris, nos résultats manquent de puissance. Nous ne pouvons pas conclure quant à l'intérêt d'un éventuel gène pour prédire l'évolution de l'IOA à *S. epidermidis*.

Les difficultés inhérentes à ce travail résultent de difficultés méthodologiques, d'une part quant aux choix des groupes contrôles (hétérogénéité de la littérature quant à l'utilisation des cohortes contrôles, paucité des études utilisant des souches contaminantes comme contrôle), au choix des gènes mais également au choix des amorces. De plus, au regard de l'essor actuel du séquençage à haut débit, la réalisation de PCR unitaires semble désuète. Cette technologie reste néanmoins rapide, facile d'accès et d'interprétation et surtout peut s'intégrer à la routine de n'importe quel laboratoire de microbiologie clinique.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Aggarwal, V.K., Bakhshi, H., Ecker, N.U., Parvizi, J., Gehrke, T., Kendoff, D., 2014. Organism profile in periprosthetic joint infection: pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. *J Knee Surg* 27, 399–406. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1364102>
- Anguita-Alonso, P., Hanssen, A.D., Osmon, D.R., Trampuz, A., Steckelberg, J.M., Patel, R., 2005. High rate of aminoglycoside resistance among *staphylococci* causing prosthetic joint infection. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 439, 43–47. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000182394.39601.9d>
- ANSM, 2015. Surveillance des dispositifs médicaux à risque : Prothèses totales de genou (Etude). ANSM.
- Aragón-Sánchez, J., Lázaro-Martínez, J.L., Hernández-Herrero, M.J., Quintana-Marrero, Y., Cabrera-Galván, J.J., 2010. Clinical significance of the isolation of *Staphylococcus epidermidis* from bone biopsy in diabetic foot osteomyelitis. *Diabet Foot Ankle* 1. <https://doi.org/10.3402/dfa.v1i0.5418>
- Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2002. In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J. Biomed. Mater. Res.* 59, 557–562. <https://doi.org/10.1002/jbm.10006>
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Rizzi, S., Donati, M.E., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2004. Search for the insertion element IS256 within the ica locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials* 25, 4117–4125. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.027>
- Baudoux, F., 2010. Analyse bactériologique quantitative et qualitative de biopsies osseuses de pieds diabétiques et recherche des facteurs de pathogénicité.
- Beam, E., Osmon, D., 2018. Prosthetic Joint Infection Update. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 32, 843–859. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.06.005>
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G., 2014a. Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 27, 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Bergon, L., 2016. *S. capitis*, *S. caprae* et *S. lugdunensis* : rôle dans les infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques
- Bertrand, X., Costa, Y., Pina, P., 2005. Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les bactériémies : données de l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) 1998–2003. *Médecine et Maladies Infectieuses* 35, 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.05.002>

- Bodard, S., Edgard-Rosa, G., Azuelos, A., Aharoni, C., 2019. Orthopédie, Traumatologie, 2019th ed. Vernazobres-Grego.
- Brown, S., Santa Maria, J.P., Walker, S., 2013. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 67. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
- Büttner, H., Mack, D., Rohde, H., 2015. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol* 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014>
- Byrd, A.L., Belkaid, Y., Segre, J.A., 2018. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 16, 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Charles, P.G.P., Uçkay, I., Kressmann, B., Emonet, S., Lipsky, B.A., 2015. The role of anaerobes in diabetic foot infections. *Anaerobe* 34, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.03.009>
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22, 996–1006.
- Christensen, G.J.M., Brüggemann, H., 2014. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes* 5, 201–215. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0062>
- Christner, M., Franke, G.C., Schommer, N.N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., Kroll, G., Schulze, C., Buck, F., Mack, D., Aepfelbacher, M., Rohde, H., 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular Microbiology* 75, 187–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06981.x>
- Collège Français des Chirurgiens Orthopédistes et Traumatologues, C., 2019. Orthopédie, Traumatologie, 2ème. ed. Ellipses.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Couturier, A., Chabaud, A., Desbiez, F., Descamps, S., Petrosyan, E., Letertre-Gilbert, P., Mrozek, N., Vidal, M., Tauveron, I., Maqdasy, S., Lesens, O., 2019. Comparison of microbiological results obtained from per-wound bone biopsies versus transcutaneous bone biopsies in diabetic foot osteomyelitis: a prospective cohort study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 1287–1291. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03547-6>
- CTINILS, 2007. Définition des infections associées aux soins.

- Del Pozo, J.L., Patel, R., 2009. Infection Associated with Prosthetic Joints. *N Engl J Med* 361, 787–794. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp0905029>
- Drago, L., Vecchi, E.D., Bortolin, M., Zagra, L., Romanò, C.L., Cappelletti, L., 2017. Epidemiology and Antibiotic Resistance of Late Prosthetic Knee and Hip Infections. *The Journal of Arthroplasty* 32, 2496–2500. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2017.03.005>
- Eiff, C. von, Peters, G., Heilmann, C., 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase negative *staphylococci*. *The Lancet Infectious Diseases* 2, 677–685. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00438-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00438-3)
- Elamurugan, T.P., Jagdish, S., Kate, V., Chandra Parija, S., 2011. Role of bone biopsy specimen culture in the management of diabetic foot osteomyelitis. *Int J Surg* 9, 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijisu.2010.11.011>
- Frebourg, N.B., Lefebvre, S., Baert, S., Lemeland, J.-F., 2000. PCR-Based Assay for Discrimination between Invasive and Contaminating *Staphylococcus epidermidis* Strains. *J Clin Microbiol* 38, 877–880.
- Galdbart, J.O., Allignet, J., Tung, H.S., Rydèn, C., El Solh, N., 2000. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infect. Dis.* 182, 351–355. <https://doi.org/10.1086/315660>
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., DeBoy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E., Fraser, C.M., 2005. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *Journal of Bacteriology* 187, 2426–2438. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005>
- Gomes, F., Teixeira, P., Oliveira, R., 2014. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling* 30, 131–141. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.848858>
- Gomez-Urena, E.O., Tande, A.J., Osmon, D.R., Berbari, E.F., 2017. Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: Cultures, Biomarker and Criteria. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 31, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.01.008>
- Götz, F., 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43, 1367–1378.
- Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L., Segre, J.A., 2009. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* 324, 1190–1192. <https://doi.org/10.1126/science.1171700>

- Grice, E.A., Segre, J.A., 2011. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9, 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Gu, J., Li, H., Li, M., Vuong, C., Otto, M., Wen, Y., Gao, Q., 2005. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Hospital Infection* 61, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.04.017>
- Guery, B., Roblot, F., Schmit, J.-L., Strady, C., Varon, E., 2009. Recommandations de pratique clinique - Infections ostéo-articulaires sur matériel (protèse, implant, ostéosynthèse) 62.
- Harris, L.G., Murray, S., Pascoe, B., Bray, J., Meric, G., Mageiros, L., Wilkinson, T.S., Jeeves, R., Rohde, H., Schwarz, S., de Lencastre, H., Miragaia, M., Rolo, J., Bowden, R., Jolley, K.A., Maiden, M.C.J., Mack, D., Sheppard, S.K., 2016. Bio-film Morphotypes and Population Structure among *Staphylococcus epidermidis* from Commensal and Clinical Samples. *PLoS ONE* 11, e0151240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151240>
- HAS, 2014. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation 134.
- Heilmann, C., Ziebuhr, W., Becker, K., 2019. Are coagulase-negative *staphylococci* virulent? *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 1071–1080. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>
- Hennig, S., Ziebuhr, W., 2010. Characterization of the Transposase Encoded by IS256, the Prototype of a Major Family of Bacterial Insertion Sequence Elements. *J Bacteriol* 192, 4153–4163. <https://doi.org/10.1128/JB.00226-10>
- Hischebeth, G.T., Randau, T.M., Ploeger, M.M., Friedrich, M.J., Kaup, E., Jacobs, C., Molitor, E., Hoerauf, A., Gravius, S., Wimmer, M.D., 2019. *Staphylococcus aureus* versus *Staphylococcus epidermidis* in periprosthetic joint infection—Outcome analysis of methicillin-resistant versus methicillin-susceptible strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 93, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.012>
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y., 2010. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* bio-film formation and nasal colonization. *Nature* 465, 346–349. <https://doi.org/10.1038/nature09074>
- IWGDF, 2011. Consensus International sur la Prise en Charge et la Prévention du Pied Diabétique.
- Jenul, C., Horswill, A.R., 2018. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>

- Kloos, W.E., Musselwhite, M.S., 1975. Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. *Appl Microbiol* 30, 381–395.
- Kocianova, S., Vuong, C., Yao, Y., Voyich, J.M., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., Otto, M., 2005. Key role of poly- $\gamma$ -dl-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest* 115, 688–694. <https://doi.org/10.1172/JCI200523523>
- Koskela, A., Nilsdotter-Augustinsson, A., Persson, L., Söderquist, B., 2009. Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 655–660. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0664-6>
- Kozitskaya, S., Cho, S.-H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K., Ziebuhr, W., 2004. The Bacterial Insertion Sequence Element IS256 Occurs Preferentially in Nosocomial *Staphylococcus epidermidis* Isolates: Association with Biofilm Formation and Resistance to Aminoglycosides. *Infect Immun* 72, 1210–1215. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1210-1215.2004>
- Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., Halpern, M., 2007. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 89, 780–785. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00222>
- Kurtz, S.M., Lau, E., Schmier, J., Ong, K.L., Zhao, K., Parvizi, J., 2008. Infection Burden for Hip and Knee Arthroplasty in the United States. *The Journal of Arthroplasty* 23, 984–991. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2007.10.017>
- Lavery, L.A., Sariaya, M., Ashry, H., Harkless, L.B., 1995. Microbiology of osteomyelitis in diabetic foot infections. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 34, 61–64. [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(09\)80103-8](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(09)80103-8)
- Leonel, C., Sena, I.F.G., Silva, W.N., Prazeres, P.H.D.M., Fernandes, G.R., Mancha Agresti, P., Martins Drumond, M., Mintz, A., Azevedo, V.A.C., Birbrair, A., 2019. *Staphylococcus epidermidis* role in the skin microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.* 23, 5949–5955. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14415>
- Lourtet-Hascoët, J., Bicart-See, A., Félicé, M.P., Giordano, G., Bonnet, E., 2016. *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Infect. Dis.* 51, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.007>
- Lourtet-Hascoët, J., Félicé, M.P., Bicart-See, A., Bouige, A., Giordano, G., Bonnet, E., 2018. Species and antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative *staphylococci* in periprosthetic joint infections. *Epidemiology & Infection* 146, 1771–1776. <https://doi.org/10.1017/S0950268818001437>
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R., 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and

structural analysis. J. Bacteriol. 178, 175–183.  
<https://doi.org/10.1128/jb.178.1.175-183.1996>

- Mohanty, S.S., Kay, P.R., 2004. Infection in total joint replacements. Why we screen MRSA when MRSE is the problem? J Bone Joint Surg Br 86, 266–268.  
<https://doi.org/10.1302/0301-620x.86b2.14129>
- Moran, E., Masters, S., Berendt, A.R., McLardy-Smith, P., Byren, I., Atkins, B.L., 2007. Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: The microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention. Journal of Infection 55, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.01.007>
- Murugesan, S., Mani, S., Kuppusamy, I., Krishnan, P., 2018. Role of insertion sequence element IS256 as a virulence marker and its association with biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* from hospital and community settings in Chennai, South India. Indian Journal of Medical Microbiology 36, 124. [https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM\\_17\\_276](https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_17_276)
- Nakatsuji, T., Chen, T.H., Butcher, A.M., Trzoss, L.L., Nam, S.-J., Shirakawa, K.T., Zhou, W., Oh, J., Otto, M., Fenical, W., Gallo, R.L., 2018. A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. Science Advances 4, eaao4502. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4502>
- Nakatsuji, T., Chen, T.H., Narala, S., Chun, K.A., Two, A.M., Yun, T., Shafiq, F., Kotol, P.F., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Latif, H., Kim, J.-N., Lockhart, A., Artis, K., David, G., Taylor, P., Streib, J., Dorrestein, P.C., Grier, A., Gill, S.R., Zengler, K., Hata, T.R., Leung, D.Y.M., Gallo, R.L., 2017. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. Sci Transl Med 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680>
- Ogston, A., 1881. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. Br Med J 1, 369.b2-375.
- Osmon, D.R., Berbari, E.F., Berendt, A.R., Lew, D., Zimmerli, W., Steckelberg, J.M., Rao, N., Hanssen, A., Wilson, W.R., Infectious Diseases Society of America, 2013. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 56, e1–e25. <https://doi.org/10.1093/cid/cis803>
- Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. Nat. Rev. Microbiol. 7, 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Parvizi, J., Fassihi, S.C., Enayatollahi, M.A., 2016. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection Following Hip and Knee Arthroplasty. Orthopedic Clinics of North America, Orthopedic Urgencies and Emergencies 47, 505–515.  
<https://doi.org/10.1016/j.ocl.2016.03.001>

- Parvizi, J., Gehrke, T., 2014. Definition of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty* 29, 1331. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2014.03.009>
- Parvizi, J., Zmistowski, B., Berbari, E.F., Bauer, T.W., Springer, B.D., Della Valle, C.J., Garvin, K.L., Mont, M.A., Wongworawat, M.D., Zalavras, C.G., 2011. New Definition for Periprosthetic Joint Infection: From the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res* 469, 2992–2994. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-2102-9>
- Peters, G., Locci, R., Pulverer, G., 1982. Adherence and Growth of Coagulase-Negative Staphylococci on Surfaces of Intravenous Catheters. *Journal of Infectious Diseases* 146, 479–482. <https://doi.org/10.1093/infdis/146.4.479>
- Plouzeau-Jayle, C., 2016. Diagnostic bactériologique de l'infection de prothèse ostéo-articulaire.
- Post, V., Harris, L.G., Morgenstern, M., Mageiros, L., Hitchings, M.D., Méric, G., Pascoe, B., Sheppard, S.K., Richards, R.G., Moriarty, T.F., 2017. Comparative Genomics Study of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Orthopedic-Device-Related Infections Correlated with Patient Outcome. *J. Clin. Microbiol.* 55, 3089–3103. <https://doi.org/10.1128/JCM.00881-17>
- Prag, G., Falk-Brynhildsen, K., Jacobsson, S., Hellmark, B., Unemo, M., Söderquist, B., 2014. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS* 122, 961–967. <https://doi.org/10.1111/apm.12239>
- Rogers, K.L., Fey, P.D., Rupp, M.E., 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23, 73–98. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.10.001>
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Rangunath, C., Kaplan, J.B., Mack, D., 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28, 1711–1720. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.046>
- Rohde, H., Kalitzky, M., Kröger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Zander, A.R., Mack, D., 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5614–5619. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5614-5619.2004>
- Rosenstein, R., Götz, F., 2013. What distinguishes highly pathogenic *staphylococci* from medium- and non-pathogenic? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 33–89. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_286](https://doi.org/10.1007/82_2012_286)
- Roth, R.R., James, W.D., 1988. Microbial ecology of the skin. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.002301>

- Sabaté Brescó, M., Harris, L.G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., Richards, R.G., Moriarty, T.F., 2017. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Front Microbiol* 8, 1401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01401>
- Senneville, E., 2015. L'ostéite du pied diabétique.
- Senneville, E., Joulie, D., Legout, L., Valette, M., Dezèque, H., Beltrand, E., Roselé, B., d'Escrivan, T., Loïez, C., Caillaux, M., Yazdanpanah, Y., Maynou, C., Migaud, H., 2011. Outcome and Predictors of Treatment Failure in Total Hip/Knee Prosthetic Joint Infections Due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 53, 334–340. <https://doi.org/10.1093/cid/cir402>
- Senneville, E., Melliez, H., Beltrand, E., Legout, L., Valette, M., Cazaubiel, M., Cordonnier, M., Caillaux, M., Yazdanpanah, Y., Mouton, Y., 2006. Culture of percutaneous bone biopsy specimens for diagnosis of diabetic foot osteomyelitis: concordance with ulcer swab cultures. *Clin. Infect. Dis.* 42, 57–62. <https://doi.org/10.1086/498112>
- Senneville, E., Morant, H., Descamps, D., Dekeyser, S., Beltrand, E., Singer, B., Caillaux, M., Boulogne, A., Legout, L., Lemaire, X., Lemaire, C., Yazdanpanah, Y., 2009. Needle puncture and transcutaneous bone biopsy cultures are inconsistent in patients with diabetes and suspected osteomyelitis of the foot. *Clin. Infect. Dis.* 48, 888–893. <https://doi.org/10.1086/597263>
- Senneville, E., Robineau, O., 2017. Treatment options for diabetic foot osteomyelitis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 18, 759–765. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1316375>
- Sharkey, P.F., Hozack, W.J., Rothman, R.H., Shastri, S., Jacoby, S.M., 2002. Why Are Total Knee Arthroplasties Failing Today? *Clinical Orthopaedics and Related Research* 404, 7–13.
- Slater, R., Lazarovitch, T., Boldur, I., Ramot, Y., Buchs, A., Weiss, M., Hindi, A., Rapoport, M., 2004. Swab cultures accurately identify bacterial pathogens in diabetic foot wounds not involving bone. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 21, 705–9. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2004.01221.x>
- SPILF, 2007. Recommandations pour la pratique clinique - Prise en charge du pied diabétique infecté.
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K.-I., Tajima, A., Iwase, T., Mizunoe, Y., 2013. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* 195, 1645–1655. <https://doi.org/10.1128/JB.01672-12>
- Sutherland, I.W., 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9, 222–227. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1)

- Tande, A.J., Patel, R., 2014. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev* 27, 302–345. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-13>
- Titécat, M., Senneville, E., Wallet, F., Dezèque, H., Migaud, H., Courcol, R.-J., Loïez, C., 2013. Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 99, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2013.02.011>
- Tormo, M.A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., Penadés, J.R., 2005. Bap-dependent bio-film formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 2465–2475. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27865-0>
- Tornero, E., García-Oltra, E., García-Ramiro, S., Martínez-Pastor, J.C., Bosch, J., Climent, C., Morata, L., Camacho, P., Mensa, J., Soriano, A., 2012. Prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Int J Artif Organs* 35, 884–892. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000148>
- Tornero, E., Morata, L., Martínez-Pastor, J.C., Bori, G., Mensa, J., Soriano, A., 2013. Prosthetic joint infections due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococci treated with open debridement and retention of the prosthesis. *Rev Esp Quimioter* 26, 353–359.
- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, M., 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique 7.
- Triffault-Fillit, C., Ferry, T., Laurent, F., Pradat, P., Dupieux, C., Conrad, A., Becker, A., Lustig, S., Fessy, M.H., Chidiac, C., Valour, F., Lyon BJI Study Group, 2019. Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.035>
- Tsai, J.-C., Sheng, W.-H., Lo, W.-Y., Jiang, C.-C., Chang, S.-C., 2015. Clinical characteristics, microbiology, and outcomes of prosthetic joint infection in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 48, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.08.007>
- Uçkay, I., Pittet, D., Vaudaux, P., Sax, H., Lew, D., Waldvogel, F., 2009. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Medicine* 41, 109–119. <https://doi.org/10.1080/07853890802337045>
- Ulrich, S.D., Seyler, T.M., Bennett, D., Delanois, R.E., Saleh, K.J., Thongtrangan, I., Kuskowski, M., Cheng, E.Y., Sharkey, P.F., Parvizi, J., Stiehl, J.B., Mont, M.A., 2008. Total hip arthroplasties: What are the reasons for revision? *Int Orthop* 32, 597–604. <https://doi.org/10.1007/s00264-007-0364-3>

- Valour, F., 2014. Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*: épidémiologie moléculaire et corrélation entre expression clinique et interactions hôte – bactérie. Université Claude Bernard.
- Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., R Merckx, R., Rijnders, B.J.A., Van Eldere, J., 2003. Reliability of the ica, aap and atlE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. Clin. Microbiol. Infect. 9, 114–119. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00544.x>
- Yao, Y., Sturdevant, D.E., Villaruz, A., Xu, L., Gao, Q., Otto, M., 2005. Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. Infect. Immun. 73, 1856–1860 <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1856-1860.2005>
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., Hacker, J., 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infect. Immun. 65, 890–896.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lössner, I., Götz, F., Hacker, J., 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Mol. Microbiol. 32, 345–356.



**DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE**

Nom et Prénom de l'étudiant : ..COULON .. Pauline..... INE : ..17.03.02.12.51P

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 

01	06	20
jour	mois	année

 à 18...h15.. Amphithéâtre ou salle : ..Pauling.....

**Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat**

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :   
P. 21/02/20

**Avis du directeur de thèse**

Nom : ..TITECAT..... Prénom : ..Marie.....

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : 21/2/20.

Signature: 

**Avis du président du jury**

Nom : ..CHABÉ..... Prénom : ..Tagali.....

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : 28.02.2020

Signature: 

**Décision du Doyen**

Favorable

Défavorable

7/5/2020  
Le Doyen

  
B. DÉCAUDIN



NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)  
Année Universitaire 2019/2020

**Nom :** COULON  
**Prénom :** Pauline

**Titre du mémoire / thèse :** Apport diagnostique de la détection par PCR des facteurs de virulence de *Staphylococcus epidermidis* dans les infections sur prothèses ostéo-articulaires

**Mots-clés :** *Staphylococcus epidermidis*, biofilm, PCR en temps réel, prothèses orthopédiques

---

### Résumé

**Introduction :** Le diagnostic des infections ostéo-articulaires (IOA) sur matériel à *S. epidermidis* (SE) constitue un réel défi tant pour les cliniciens que pour les microbiologistes. En effet, SE est une espèce commensale de la peau capable de coloniser l'implant en formant du biofilm. Sa seule mise en évidence dans les prélèvements peropératoires ne permet pas toujours d'affirmer son imputabilité dans l'infection. L'objectif principal de ce travail était donc d'évaluer la pertinence de la détection de gènes de virulence (notamment ceux impliqués dans la formation du biofilm) par PCR en tant qu'argument diagnostique supplémentaire dans les infections chroniques sur prothèses ostéo-articulaires.

**Matériel et Méthode :** La fréquence de gènes de virulence (*aap*, *embp*, *IcaA*, *IcaD*, *IS256*, *SE1875*, *SE2251*, *bap*, *bhp* et *QacA*) a été évaluée par la réalisation de PCR en temps réel au sein (i) de souches de SE isolées au décours de réelles IOA sur matériel à SE, (ii) de souches de SE considérées comme contaminantes au décours d'une IOA sur matériel, (iii) de souches de SE isolées chez des témoins et (iv) de souches isolées d'ostéite de pieds diabétiques.

**Résultats :** Seuls les gènes *IS256*, *QacA* et *bhp* permettent de discriminer les isolats du groupe IOA de ceux du groupe témoin. Les souches du groupe contamination ont un profil génétique proche de celles du groupe IOA.

**Conclusion :** Les gènes étudiés ne sont pas à même de différencier les isolats virulents des contaminants.

---

### Membres du jury :

**Président :** Madame le Docteur Magali CHABE (Faculté de Pharmacie de Lille)

**Assesseur(s) :** Madame le Docteur Anne VACHEE (CH de Roubaix)  
Monsieur le Professeur Henri MIGAUD (CHU de Lille)  
Monsieur le Professeur Éric SENNEVILLE (CH de Tourcoing)

**Directeur de mémoire :** Madame le Docteur Marie TITECAT (CHU de Lille)