Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis

Sophie Trouillet

▶ **To cite this version:**

Sophie Trouillet. Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis. Microbiologie et Parasitologie. 2011. hal-01482584

HAL Id: hal-01482584
https://ephe.hal.science/hal-01482584

Submitted on 3 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par

Sophie TROUILLET

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*

soutenu le 25 Octobre 2011 devant le jury suivant :

***Pr Christophe Terzian*- président du jury**
***Pr Jean-Marie Exbrayat* - tuteur pédagogique**
***Dr Frédéric Laurent*- tuteur scientifique**
***Dr Sylvestre Tigaud* - rapporteur (examinateur)**
***Dr Gérard Carret* – rapporteur (examinateur)**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Frédéric Laurent
Laboratoire de bactériologie, Centre National des Staphylocoques, INSERM U851
Laboratoire de Bactériologie - Hopital de la Croix Rousse
Centre National de Reference des Staphylocoques
Unite Inserm 851 - Faculte de Medecine Lyon Est
103 Grande Rue de la Croix Rousse
69317 Lyon Cedex 04
frederic.laurent@univ-lyon1.fr

Et de

***Pr Jean-Marie Exbrayat* - EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre) - Reproduction et développement comparé**
Université de Lyon, UMRS 449,
Laboratoire de Biologie Générale, UCLy;
Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, EPHE;
25, rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 02
jmexbrayat@univ-catholyon.fr

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

ABREVIATIONS **3**

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES **5**

I. Généralités sur le genre Staphylococcus *6*

I.1 Staphylococcus aureus *6*
I.1.2 Réservoir et niche écologique. 7
I.1.3 Infections à Staphylococcus aureus. 7

I.2 Staphylococcus epidermidis *8*

II. Le tissu osseux et les infections ostéo-articulaires *9*

II.1. Fonction et structure de l'os. *9*
II.1.1. Fonction. 9
II.1.2. Os cortical et os trabéculaire. 10

II.2. Les cellules osseuses. *10*
II.2.1. Les ostéoblastes. 10
II.2.2. Les ostéocytes. 12
II.2.3. Les cellules bordantes. 12
II.2.4. Les ostéoclastes. 12
II.2.5. Equilibre osseux 13

II.3. Infections ostéo-articulaires d'origine bactérienne. *13*
II.3.1. Les infections primitives. 14
II.3.2. Les infections secondaires. 15
II.3.3. Les infections sur matériel. 15

III. Mécanismes physiopathologiques des IOA à S. aureus et S. epidermidis *15*

III.1. Le caractère chronique et récidivant des IOA. *16*

III.2. La formation de biofilm *16*

III.3. L'internalisation de Staphylococcus *17*
III.3.1. Techniques d'études 17
III.3.2. Mécanismes d'internalisation 18

III.4. Le phénotype Small Colony Variant *19*

IV. Problématiques *21*

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

AFU : Unité Arbitraire de Fluorecence

ATB : Antibiotique

BCC : Bouillon Cœur Cervelle

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CBA : Cytometry Based Array

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : DiMéthylSulfOxide

DO : Densité Optique

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FCBA : Flow Cytometry Based Assay (nom donné à l'une des techniques mises au point dans le mémoire)

FnBP : Fibronectin Binding Protein

FSC : Forward Scatter (mesure de la taille de l'évènement en cytométrie en flux)

GPA : Gentamicin Protection Assay

IL: Interleukine

IOA : Infections Ostéo-Articulaires

LDH : Lactate DesHydrogenase

LPA : Lysostaphin Protection Assay

LPV : Leucocidine de Panton Valentine

MALDI-TOF-MS : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation -Time Of Flight – Mass Spectrometry

MCC : Milieu de Culture Complet

MOI : Multiplicity Of Infection (nombre de bactéries par cellule)

PBS : Phosphate Buffer Saline

RPM : Rotations Par Minute

SCoN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SCV : Small Colony Variant

SSC : Side Scatter (mesure de la granularité de l'évènement en cytométrie en flux)

SVF : Serum de Veau Fœtal

TSA : Trypticase Soja Agar

UFC : Unité Formant Colonie

VBFL: Vancomycin-Bodipy-FL® (molécule de vancomycine couplé au fluorochrome Bodipy-FL)

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralités sur le genre Staphylococcus

Sir Alexander Ogston et Louis Pasteur ont mis en évidence l'existence du « vibrion pyogénique » pour la première fois en 1880. Pasteur a ainsi observé, après la mise en culture de pus de furoncle, « un organisme unique, formé de petits points sphériques réunis en couple de 2 grains, rarement de 4 mais fréquemment associés en amas ».

Le chirurgien écossais Alexander Ogston est ensuite parvenu à différencier le genre *Staphylococcus* du genre *Streptococcus.* Le terme *Staphylococcus* provient de l'association du mot grec « *Staphyle* » qui signifie « grappe de raisin » et de « *Kokkos* » qui signifie « graine ».

I.1 Staphylococcus aureus

I.1.1 Propriétés.

Les bactéries de l'espèce *Staphylococcus aureus* appartiennent à la famille des *Staphylococcaceae* et au genre *Staphylococcus*. Ce sont des cocci Gram positives d'environ 1 µm de diamètre, asporulés, immobiles, aéro-anaérobie facultatifs, et habituellement disposés en amas ou en paires à l'examen microscopique (Brun, 2000).

Comme toutes les bactéries à Gram positif, la paroi de *S. aureus* est composée de peptidoglycane en l'absence de paroi externe, ce qui lui confère cette couleur violette après coloration de Gram.

La plupart des staphylocoques possèdent une microcapsule constituée de polysaccharides recouvrant la paroi bactérienne, qui lui confère une résistance élevée à la phagocytose (Roghmann, *et al*., 2005).

Les bactéries appartenant à l'espèce *S. aureus* possèdent des caractéristiques communes au genre *Staphylococcus* (catalase positive, oxydase négative,…), associées à un équipement enzymatique élaboré propre à cette espèce et permettant son identification. Elles disposent notamment d'une coagulase, d'une thermonucléase, de la protéine A et sont capables de dégrader le mannitol sur gélose Chapman. Pour les conditions de culture, il est à noter que cette espèce est à la fois mésophile (croissance dans des conditions de température modérée),

neutrophile (croissance dans des milieux à pH neutre) et halophile (croissance en présence de fortes concentrations en sel).

I.1.2 Réservoir et niche écologique.

Le principal réservoir naturel de *S. aureus* est l'Homme et les animaux à sang chaud tels que les ovins, bovins, caprins et canidés (Boerema, *et al*., 2006). *S. aureus* est un commensal de la peau et des muqueuses. Cette bactérie se retrouve préférentiellement au niveau du périnée, de l'intestin, du pharynx, des doigts et des cheveux, mais l'habitat préférentiel de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. Il est présent à l'état commensal chez 10% à 40% des individus en dehors de tout contact hospitalier (Lecomte, *et al*., 2001).

I.1.3 Infections à Staphylococcus aureus.

S. aureus est à l'origine de deux types de syndromes : les toxémies staphylococciques, et les infections suppuratives. Les syndromes toxémiques sont dus à des toxines produites par les souches *in vivo* (leucocidine de Panton-Valentine (LPV), toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), exfiolatines (ETA, ETB)) ou introduites préformées dans l'organisme (entérotoxines (SE) dans les aliments), l'ingestion de toxine en l'absence de la bactérie elle-même étant suffisante à reproduire la maladie. A l'inverse, les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction des tissus de l'hôte et une réponse inflammatoire locale et systémique.

I.1.3.1 Les infections toxiniques

Parmi les toxines staphylococciques, recensées au nombre de quarante (Jarraud, *et al*., 2002), trois types sont majoritairement impliqués dans les infections toxiniques dues à *Staphylococcus aureus*. La toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), codée par le gène *tst*, est responsable du choc toxique staphylococcique lié à une activité de type superantigénique. Décrit par Todd *et al* en 1978, ce syndrome associe fièvre, hypotension, hyperhémie des muqueuses, signes d'atteintes multi-viscérales et rash scarlatiniforme évoluant vers la desquamation (Todd, *et al*., 1978). Les chocs toxiques sont classiquement liés à l'utilisation de tampons vaginaux ou secondaires à une infection cutanée localisée.

La LPV est, elle, une toxine synergo-hyménotrope constituée de deux exoprotéines hydrosolubles nommées LukF-PV et LukS-PV. La PVL agit sur les membranes cellulaires des cellules cibles (polynucléaires, monocytes, macrophages) provoquant la formation de pores membranaires entraînant la fuite des cations divalents et conduisant à la mort cellulaire. Elle est classiquement retrouvée chez les souches isolées de lésions cutanées primitives nécrosantes et de pneumonies communautaires sévères nécrotiques et hémorragiques chez l'enfant et le jeune adulte.
Enfin les entérotoxines notamment l'entérotoxine A, codée par le gène *sea*, sont responsables de toxiinfections alimentaires par activation des récepteurs de la paroi cellulaire sur le modèle des neurotoxines.

I.1.3.2. Les infections suppuratives

Le pouvoir invasif de *S. aureus* implique l'invasion, la prolifération bactérienne, et enfin la destruction des tissus de l'hôte, entraînant une réponse inflammatoire locale et parfois systémique. Les infections suppuratives sont principalement des infections cutanéo-muqueuses se traduisant par l'apparition de furoncles, d'abcès, de folliculites ou encore de panaris. Toutefois, elles peuvent se compliquer ou entraîner des infections plus profondes telles que les endocardites, les pneumopathies, ainsi que les infections ostéo-articulaires (IOA) associées dans un certain nombre de cas à des bactériémies. De plus, *S. aureus* est l'un des principaux agents responsables d'infections nosocomiales sur matériel de type cathéters et de prothèses valvulaires, articulaires et endovacsulaires (Brun, 2000).

I.2 Staphylococcus epidermidis

S. epidermidis fait partie de la famille des staphylocoques à coagulase négative (SCoN). Il doit son nom à sa principale niche écologique. En effet *S. epidermidis* est une espèce très dispersée sur la peau et les muqueuses. Certains individus hébergent 10 à 24 souches différentes de cette espèce. *S. epidermidis* est une espèce résidente pouvant persister plusieurs mois ou années chez un même sujet. La muqueuse nasale est colonisée par *S. epidermidis*, présent en densité importante en l'absence de *S. aureus* (Otto, 2009).

S. epidermidis n'est plus considéré uniquement comme un commensal universel de la peau et des muqueuses, il est désormais reconnu comme un pathogène opportuniste majeur, notamment dans les infections nosocomiales et/ou sur matériel étranger (Otto, 2009, Schierholz et Beuth, 2001). *S. epidermidis* est à l'origine d'infections chez les sujets porteurs de matériel étranger (cathéter intra-vasculaires, prothèses ostéo-articulaires, boîtiers de stimulation cardiaque, valves de dérivation du liquide céphalo-rachidien…). Dans ce cadre, il est l'un des principaux agents étiologiques des IOA sur matériel orthopédique pour lesquelles les staphylocoques à coagulase négative, dont *S. epidermidis*, représentent 30 à 43% des agents étiologiques, devant *S. aureus* (Darouiche, 2004, Uckay, *et al*., 2009, Zimmerli, *et al*., 2004).

II. Le tissu osseux et les infections ostéo-articulaires

L'os est un tissu conjonctif dans lequel sont associées une phase minérale (60%) et une matrice organique (35%) composée essentiellement de collagène de type I. C'est un tissu possédant également des cellules spécifiques (5%) nécessaires à son remodelage : ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes (Giudicelli et Souberbielle, 1998).

II.1. Fonction et structure de l'os.

II.1.1. Fonction.

Les propriétés du tissu osseux lui permettent d'assurer plusieurs fonctions :

- une fonction mécanique en tant que support du poids de l'organisme
- une fonction de protection des organes vitaux (cage thoracique, boîte cranienne)
- une fonction métabolique avec le stockage des minéraux en particulier du calcium et du phosphore
- une fonction de contenance de la moelle osseuse

II.1.2. Os cortical et os trabéculaire.

Du point de vue anatomique, l'os est composé de deux parties distinctes : l'os cortical et l'os spongieux.

L'os cortical représente 80% de la structure osseuse et est localisé essentiellement dans les os longs et à la périphérie des os plats (Giudicelli et Souberbielle, 1998).
Il s'agit d'une juxtaposition d'ostéons cylindriques (les ostéones) de 200 à 300 µm de diamètre alignés parallèlement. Chaque ostéon est composé de lamelles concentriques disposées autour d'un canal où passe les éléments vasculo-nerveux. Ces canaux sont reliés entre eux, mais aussi avec la surface de l'os et avec la moelle osseuse par des canaux dits transversaux. Les fibres de collagènes sont orientées de façon à conférer au tissu cortical une résistance mécanique optimale une fois minéralisé.

L'os spongieux constitue les 20 % restant de la structure osseuse. Il est situé à l'extrémité des os longs (métaphyse), dans la partie centrale des os plats et des os courts. Il est organisé selon un système de lamelles osseuses irrégulières que l'on nomme les trabécules, ce qui lui confère une structure alvéolaire (Giudicelli et Souberbielle, 1998). C'est à cet endroit que l'on trouve la moelle osseuse et les vaisseaux sanguins. Son organisation tridimensionnelle lui donne un rôle important dans la résistance mécanique de l'os.

II.2. Les cellules osseuses.

II.2.1. Les ostéoblastes.

Les ostéoblastes prolifèrent le long des travées osseuses (Giudicelli et Souberbielle, 1998). Leur fonction principale est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, du renouvellement de cette matrice chez l'adulte et de la réparation osseuse tout au long de la vie.

Dans les os trabéculaires, les ostéoblastes se différencient à partir des cellules souches de la moelle osseuse (stroma médullaire). Ces précurseurs ostéoblastiques ou cellules ostéoprogénitrices proviennent de la prolifération de clones de cellules pluripotentes qui peuvent évoluer vers divers types de cellules (Couret, 2004). Après une prolifération initiale des cellules ostéoprogénitrices, un arrêt de la multiplication cellulaire est observé, puis les ostéoblastes se différencient. La différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de facteurs de transcription, d'interactions cellulaires et matricielles ainsi que de facteurs systémiques et locaux (Marie, 2001).

Plusieurs facteurs de croissance affectent la formation osseuse : les « insulin-like growth factors » (IGFs), les « fibroblasts growth factors » (FGFs) et spécifiquement les membres de la famille des « transforming growth factors beta » (TGF-_). Les ostéoblastes sont aussi la cible des hormones qui contrôlent la différenciation des ostéoclastes. Eux-mêmes sont capables de produire un large éventail de facteurs qui peuvent potentiellement agir comme des régulateurs autocrines ou paracrines de la fonction cellulaire osseuse. Ainsi plusieurs cytokines comme le RANK-Ligand, les interleukines (IL) -6 et 11 peuvent activer la différenciation des ostéoclastes (Marie, 2001).

Les ostéoblastes forment un tapis de cellules jointives et communiquent entre eux par des structures appelées jonction gap permettant le passage de certaines molécules. Le noyau est situé au pôle basal et la partie apicale de leur cytoplasme fortement basophile contient de nombreux organites : mitochondries, appareil de Golgi… Les ostéoblastes sécrètent d'abord la matrice organique structurée par les fibres de collagène où les protéines non collagéniques sont intriquées. Les ostéoblastes matures contrôlent ensuite la minéralisation de la matrice par dépôt de cristaux d'hydroxyapatite grâce notamment à la sécrétion de phosphatase alcaline osseuse, facteur important pour la minéralisation.

Une fois la déposition de la matrice terminée, trois destins sont possibles pour les ostéoblastes :

- soit il meurt par apoptose.
- soit l'ostéoblaste est emmuré dans la matrice minéralisée et évolue alors en ostéocyte (environ 10 à 20% des ostéoblastes),
- soit il s'aplatit et présente une activité métabolique très réduite et se transforme en une cellule bordante,

II.2.2. Les ostéocytes.

Ces cellules, les plus abondantes de l'os, sont incluses dans la matrice osseuse et sont reliées entre elles et avec les cellules de la surface osseuse par des extensions de la membrane cytoplasmique. Les ostéocytes sont probablement les cellules qui orientent dans l'espace l'activité des ostéoblastes et ainsi adaptent l'architecture osseuse afin d'assurer une résistance maximale aux contraintes physiques. Ils sont espacés régulièrement et forment un réseau de communication. Ils sont sensibles aux stimuli mécaniques et détectent aussi le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse dans le processus d'adaptation fonctionnelle ou en cas de micro-fractures (Couret, 2004).

II.2.3. Les cellules bordantes.

Ce sont des cellules plates *et al*longées situées à la surface de l'os à l'état quiescent et qui séparent l'espace osseux de l'espace médullaire. Ces cellules sont alignées sur une couche de matrice non minéralisée. Elles seraient capables d'évaluer le besoin de remodelage en un lieu spécifique. (Couret, 2004)

II.2.4. Les ostéoclastes.

Ce sont les principales cellules responsables de la résorption osseuse.
Les ostéoclastes se différencient à partir des cellules souches hématopoïétiques de la lignée monocyte/macrophage sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels des cytokines. La différenciation des précurseurs en ostéoclastes est initiée et reste sous le contrôle des cellules préostéoblastiques qui sécrètent deux facteurs : le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) et le RANK-L (Couret, 2004). Le système RANK/RANK-Ligand, découvert récemment, est l'un des principaux systèmes de régulation pour le recrutement des ostéoclastes.
La maturation des ostéoclastes se fait après migration vers la surface osseuse et fusion des proostéoclastes. Les ostéoclastes sont donc des cellules multinucléées de 50 à 100 µm de diamètre qui contiennent de grandes quantités de phosphatase acide tartrate résistante

nécessaire à l'ostéoclasie (résorption osseuse). La morphologie de ces cellules se caractérise par un pôle basal présentant une membrane plissée. Cette bordure en brosse est formée par des extensions en « doigts » (Couret, 2004).

II.2.5. Equilibre osseux

Le remodelage osseux et le renouvèlement harmonieux de la masse osseuse nécessitent un équilibre subtil entre l'activité de résorption osseuse assurée par les ostéoclastes et la minéralisation osseuse réalisée par les ostéoblastes. Un mauvais équilibre entre ces deux types cellulaires est responsable de nombreuses pathologies du remodelage osseux. Une activité ostéoclastique trop importante est responsable de l'ostéoporose, une activité ostéoblastique incontrôlée peut entrainer des pathologies osseuses telles que l'ostéopétrose ou l'ostéosclérose.

Le bon équilibre et la communication entre les cellules osseuses, notamment entre les ostéoclastes et les ostéoblastes, sont essentiels dans le contrôle de l'infection osseuse. En effet, les cellules osseuses jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'infection et l'éradication bactérienne. Les ostéoclastes sont des cellules phagocytaires et sont décrites comme cellules présentatrices d'antigènes.

Les IOA sont des modèles importants pour comprendre la physiopathologie des infections invasives à staphylocoques, premiers agents étiologiques des IOA, comme en témoigne le nombre croissant de publications dans la base de données Pubmed (en utilisant comme mots-clefs « *Staphylococcus* » et « osteomyelitis ») : 233 articles pour la période 1995-2000, 294 entre 2000 et 2005 et 504 pour la période 2005-2010.

II.3. Infections ostéo-articulaires d'origine bactérienne.

Les infections ostéo-articulaires (IOA) rassemblent : i) une diversité de situations cliniques en fonction du site ostéo-articulaire atteint, du ou des germes impliqués, du terrain, de la présence ou non de matériel (prothèses, ou matériel d'ostéosynthèse) et ii) une grande variété évolutive (aigüe, chronique, récidive, récurrence,…). Tous les os peuvent être atteints, principalement les os longs. Les IOA surviennent majoritairement au niveau des membres

inférieurs, avec en premier lieu le genou puis la hanche. Le développement d'une IOA est en fait multifactoriel et repose sur l'interaction entre l'organisme hôte et l'agent invasif.
S. aureus et les SCoN sont les deux familles d'agents bactériens qui prédominent dans ce type d'infections, qui regroupent différentes formes cliniques.

II.3.1. Les infections primitives.

Les IOA qui surviennent de manière primitive regroupent trois grands types de pathologies : les arthrites, les ostéomyélites et les spondylodiscites.

II.3.1.1. L'arthrite septique.

L'arthrite septique est une infection d'une articulation due à la présence et au développement d'une bactérie au sein même de celle-ci. Elle se différencie des arthrites post-infectieuses ou réactionnelles au cours desquelles le germe se développe à distance de l'articulation. La multiplication du germe dans l'articulation engendre un épanchement purulent qui contient des enzymes protéolytiques libérées par les polynucléaires neutrophiles, responsables de la destruction articulaire. En l'absence d'un traitement antibiotique adapté, le risque d'envahissement septique local voire général est élevé. La mortalité est estimée à près de 11 % et la morbidité atteint 40 à 50 % (Goldenberg, 1998, Shirtliff et Mader, 2002).

II.3.1.2. L'ostéomyélite.

C'est une infection des métaphyses ou des épiphyses au contact des cartilages de croissance, touchant n'importe quel os en croissance dont le foyer infectieux est le plus souvent unique et au voisinage des cartilages fertiles. Dans sa forme aigüe, l'ostéomyélite se localise surtout au niveau des métaphyses fertiles des os longs à la suite d'une bactériémie. La guérison est obtenue si un traitement antibiotique est débuté précocement, associé à une immobilisation. Dans le cas contraire, l'infection peut s'étendre en direction de la diaphyse.

II.3.1.3.La spondylodiscite.

La spondylodiscite infectieuse est une infection d'un ou plusieurs disques intervertébraux et des deux vertèbres adjacentes. Primitives, ces infections sont généralement secondaires à une bactériémie ou à une infection de voisinage. En absence de traitement (habituellement une antibiothérapie adaptée et une immobilisation), cette infection peut évoluer vers l'extension locale et être associée à des lésions neurologiques parfois irréversibles.

II.3.2. Les infections secondaires.

Ces infections sont issues d'un traumatisme (fracture ouverte, par exemple) ou surviennent après un geste invasif (ponction, infiltration, chirurgie). Selon le segment de squelette atteint, il peut s'agir d'une ostéite, d'une arthrite ou d'une spondylodiscite infectieuse. Les ostéites résultent donc d'une inoculation directe du germe et, en cas de mise en place de matériel, la pathogénie rejoint celle des infections sur prothèse.

II.3.3. Les infections sur matériel.

Ces IOA, surviennent sur un matériel orthopédique implanté ((prothèse de genou, hanche,…) ou matériel d'ostéosynthèse (plaque, vis,…)). Ce sont des pathologies graves qui peuvent engager le pronostic fonctionnel et le pronostic vital du patient. Ces infections sont sources de difficultés de diagnostic et thérapeutiques, et sont associées à une importante morbidité et à un coût médical élevé dû à la nécessité d'interventions, d'hospitalisations et d'antibiothérapies de longue durée. L'attitude thérapeutique (antibiothérapie, chirurgie en un ou deux temps) lors d'une infection sur matériel dépend du délai de survenue de l'infection, de la nature du germe en cause et de la nature du terrain.

III. Mécanismes physiopathologiques des IOA à S. aureus *et* S. epidermidis

S. aureus et *S. epidermidis* sont à la fois les bactéries les plus fréquemment responsables des IOA mais aussi celles qui sont les plus difficiles à éradiquer. Ces IOA ont un taux de morbidité particulièrement important, et les difficultés d'éradication bactérienne sont

classiquement rattachées dans la littérature à l'existence de résistances aux antibiotiques acquises par les staphylocoques (Ellington *et al.,* 1999) et/ou au caractère potentiellement chronique de ces infections.

III.1. Le caractère chronique et récidivant des IOA.

Le problème majeur des IOA, notamment celles causées par les staphylocoques, est le passage à la chronicité observé chez de nombreux patients. A titre d'exemple, en 2005, un cas a été rapporté aux Etats-Unis dans lequel un homme de 40 ans a présenté une ostéomyélite à *S. aureus* récidivant 12 ans après le premier épisode, les deux souches étant génétiquement identiques (Stevens *et al*., 2007).

Plusieurs travaux ont été menés pour comprendre ce passage à la chronicité, avançant plusieurs propriétés staphylococciques pour expliquer ce phénomène, parmi lesquelles i) l'existence de résistances acquises aux antibiotiques chez les staphylocoques (Ellington *et al*., 1999), ii) la capacité de ce pathogène à développer du biofilm, iii) la sanctuarisation des staphylocoques à l'intérieur des cellules.

III.2. La formation de biofilm

Le biofilm est une structure dynamique, composée de nombreuses molécules polysaccharidiques comprenant entre autre des débris cellulaires et bactériens, des composants de la matrice extra-cellulaire et de molécules d'ADN. Cette structure tridimensionnelle en forme de champignon favorise le développement bactérien et la communication inter-bactérienne appelée *quorum sensing* (Ader *et al*., 2004). Le biofilm créé un microclimat favorable au développement des staphylocoques dans un milieu hostile.

La structure et la composition du biofilm permettent un échappement au système immunitaire de l'hôte et empêchent l'action de nombreux antibiotiques (Brady, *et al*., 2008, Costerton, *et al*., 1999, Hall-Stoodley et Stoodley, 2009). En effet, les cellules phagocytaires pénètrent mal dans le biofilm, et peuvent perdre, en présence de biofilm, leur capacité de mobilité et de phagocytose. De même, les bactéries empactées dans le biofilm sont peu accessibles aux

anticorps (Costerton, *et al*., 1999, Hall-Stoodley et Stoodley, 2009). Enfin, du fait de la faible pénétration des agents anti-bactériens dans le biofilm (Costerton, *et al*., 1999) associée à leur inactivation par certaines enzymes matricielles (Hall-Stoodley et Stoodley, 2009), à la diminution de l'activité métabolique des bactéries vivant en phase stationnaire (Hall-Stoodley et Stoodley, 2009), et à l'expression spécifique de certains mécanismes de résistance aux antibiotiques au sein du biofilm (Hall-Stoodley et Stoodley, 2009), l'activité de la plupart des antibiotiques apparaît réduite dans les biofilms bactériens. La formation de biofilm par les staphylocoques serait en partie responsable de la persistance et de la chronicisation des infections sur matériel.

III.3. L'internalisation de Staphylococcus

Longtemps considéré comme un pathogène extracellulaire, de récents travaux ont démontré que les staphylocoques ont la capacité d'être internalisés dans des cellules-hôtes. A l'abri des cellules immunitaires et des antibiotiques, les bactéries intracellulaires constituent un réservoir bactérien pouvant expliquer la chronicité et les rechutes des IOA observées cliniquement. L'internalisation est un phénomène observé *in vitro* mais, également *in vivo.* En effet, Bosse *et al*. ont rapporté dans la littérature le cas d'un homme de 73 ans présentant une ostéite chronique du péroné, chez lequel une biopsie osseuse a été réalisée. Par microscopie électronique, cette biopsie a révélé la présence de *S. aureus* internalisés au sein d'ostéocytes et d'ostéoblastes (figure 11) (Bosse, *et al*., 2005).

III.3.1. Techniques d'études

Différentes techniques ont été décrites pour quantifier l'adhésion et l'internalisation des staphylocoques dans les cellules :

- Technique « gentamicin protection assay » (GPA) :

L'une des plus utilisées repose sur l'utilisation de gentamicine. Cet antibiotique, inactif dans le compartiment cytosolique des cellules, permet l'élimination des bactéries extracellulaires en préservant les bactéries intracellulaires. Après une étape de co-culture bactéries/cellules, l'ajout d'antibiotique permet d'éliminer les bactéries extracellulaires sans

impacter la survie des bactéries internalisées. Après rinçage des puits et élimination des antibiotiques résiduels, les bactéries intracellulaires sont dénombrées après étalement des lysats cellulaires sur gélose (Jevon, *et al*., 1999, Wright et Friedland, 2004).

• Utilisation de bactéries modifiées génétiquement

D'autres méthodes reposent sur l'utilisation de bactéries modifiées génétiquement dans le but d'exprimer une molécule fluorescente. Classiquement, les bactéries sont transfectées avec le gène codant la *gfp* (green fluorescent protein) qui confère une fluorescence verte constitutivement exprimée par les bactéries. Après contact bactéries/cellules, les bactéries extracellulaires et/ou intracellulaires peuvent être localisées grâce à l'utilisation d'un microscope à fluorescence ou quantifiées par cytométrie en flux (Deloid, *et al*., 2009).

• Utilisation de bactéries modifiées chimiquement

Certaines approches utilisent des staphylocoques marqués à l'aide de marqueurs fluorescents tels que la phycoérythrine, l'isothiocyanate de fluorescéine par exemple, avant l'étape d'infection afin qu'ils soient détectables par cytométrie en flux ou sous un microscope à fluorescence (Agerer, *et al*., 2004).

III.3.2. Mécanismes d'internalisation

Ces différentes techniques ont permis de démontrer le caractère invasif des staphylocoques dans différents types cellulaires comme les cellules endothéliales et épithéliales humaines et bovines (Almeida et Oliver, 2001, Anaya-Lopez, *et al*., 2006, Hirschhausen, *et al*., 2010, Lammers. S, *et al*., 1999, Oviedo-Boyso, *et al*., 2009), ou plus rarement les ostéoblastes humains (Jevon, *et al*., 1999).

Le mécanisme d'internalisation des staphylocoques repose sur un processus passif sur le versant bactérien. En effet, des staphylocoques vivants ou tués par la chaleur ont la même capacité d'internalisation. En revanche, il s'agit d'un processus actif sur le versant cellulaire. L'internalisation des bactéries s'apparente en fait à un phénomène de phagocytose faisant intervenir les microfilaments d'actine comme l'ont montré Ellington *et al*. (1999) en utilisant différents inhibiteurs du cytosquelette comme la colchicine, la cytochalasine ou le monodansylcadaverine qui empêchent l'internalisation des bactéries.

Bien que les staphylocoques aient un rôle passif dans le processus d'internalisation, la présence de plusieurs constituants staphylococciques membranaires leur est indispensable. En fait, *S. aureus* possède un grand nombre de protéines exprimées à sa surface, parmi lesquelles celles appartenant à la famille des MSCRAMMs (Microbial Surface component Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Ces facteurs d'adhésion, liés de façon covalente au peptidoglycane, ont la capacité de lier les protéines de la matrice extracellulaire comme la laminine, l'élastine, le collagène, ou encore le fibrinogène et la fibronectine (Foster et Hook, 1998). Les protéines liant la fibronectine (appelées Fibronectin binding protein (FnBP)), les mieux caractérisées, sont nécessaires et suffisantes à l'internalisation de la bactérie par la cellule hôte. Les gènes *fnb*A et *fnb*B codant pour les protéines FnBPA et FnBPB sont retrouvés respectivement chez 98 % et 99 % des souches d'IOA(Wright et Nair, 2010).

Sinha *et al*. (2000) ont montré à l'aide de couples isogéniques (Δ*fnb*A/B) que l'internalisation de *S. aureus* est totalement inhibée en l'absence des protéines FnBP A et B à leur surface (Sinha, *et al*., 2000). Ils ont également démontré que l'intégrine humaine $\alpha_5\beta_1$ présente sur la membrane cellulaire, fonctionne comme un co-ligand pour permettre une internalisation efficace. Cette liaison semble spécifique de *S. aureus* comme l'ont prouvé les travaux de Khalil *et al*. (2007) démontrant que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ n'est pas impliquée dans le processus d'invasion de *S. epidermidis* (Khalil, *et al*., 2007).

III.4. Le phénotype Small Colony Variant

III.4.1. Qu'est-ce que le phénotype Small Colony Variant ?

Une fois internalisés, les staphylocoques se trouvent à l'abri du système immunitaire et des antibiotiques. Cette sanctuarisation des souches de *S. aureus* est classiquement proposée pour expliquer la chronicité et les échecs de traitement observés au cours des IOA. Plusieurs cas cliniques ont été décrits dans la littérature rapportant des récidives d'IOA des années après le premier épisode avec la même souche de staphylocoque. Ceci témoigne de l'adaptation possible des staphylocoques à la vie dans le compartiment intracellulaire. Des formes mutantes de ces bactéries ont été retrouvées chez des patients atteints d'infections persistantes (Acar, *et al*., 1978, Borderon et Horodniceanu, 1976). Les premiers phénotypes mutants ont été décrits il y a 1 siècle par Kolle et Hetsch en 1911. Ces mutants, formant des microcolonies, ont été appelés small colony variant (SCV). Depuis, différentes études ont

montré que des phénotypes SCV existaient chez différentes espèces de staphylocoques parmi lesquelles des staphylocoques à coagulase négative tels que *S. capitis, S. epidermidis* et *S. lugdunensis,* mais aussi chez *S. aureus*. Des espèces non staphylococciques sont également capables de former des phénotypes SCV parmis lesquelles *Escherichia. coli* (Colwell, 1946), *Pseudomonas. aeruginosa* (Haussler, *et al*., 1999), *Burkholderia cepacia* (Haussler, *et al*., 2003), …Toutefois, les variants SCV de *S. aureus* restent à ce jour les mieux documentés.

Différentes caractéristiques phénotypiques ont été associées aux formes SCV chez *S. aureus* :

- une croissance ralentie aboutissant à la formation de colonies 10 fois plus petites que celles formées par le phénotype sauvage,
- une réduction de l'activité hémolytique,
- une perte de coloration des colonies,
- une résistance accrue aux aminosides,
- l'altération du métabolisme bactérien (Wright et Nair, 2010).

Cette dernière caractéristique semble jouer un rôle central. Ainsi, plusieurs types de modification du métabolisme bactérien ont été décrits et sont à l'origine d'un ralentissement de la croissance bactérienne. Parmi les souches cliniques de staphylocoques présentant un phénotype SCV se distinguent : i) celles présentant une interruption du fonctionnement de la chaîne de transport d'électron, et ii) celles présentant une inhibition de la biosynthèse de la thymidine. L'interruption de la chaîne de transport d'électron est causée par l'inhibition de la biosynthèse de la ménadione ou de l'hémine liées respectivement à l'expression des gènes *menD* et *hemB* (figure 14). En fait, ces SCV peuvent s'exprimer de deux façons. La plus courante correspond à une dysrégulation de l'expression des gènes *menD* et *hemB* probablement sous la dépendance de stimuli extérieurs qui restent actuellement mal connus, mais qui serait vraisemblablement liée au passage intracellulaire des bactéries. De ce fait, ces formes SCV sont capables de réverter vers une forme normale après subculture sur milieux gélosés en raison de l'absence de ces mêmes stimuli inducteurs. Plus rarement, l'apparition de ces SCV correspond à l'apparition de mutations dans les gènes *menD* et *hemB*, induisant de façon stable le phénotype. Après subculture, ces SCV conservent donc leurs phénotypes avec transmission horizontale à l'ensemble de la descendance. Ces souches deviennent dès lors auxotrophes pour l'hémine et la ménadione. En présence de ménadione, d'hémine ou de thymidine, les souches retrouvent un phénotype sauvage. Cette faculté de réversion observée

chez les staphylocoques SCV associée à une pousse lente et l'obtention de colonie atypique compliquent l'identification des bactéries présentant un phénotype SCV.

III.4.2. Etudes in vitro menées sur le phénotype SCV

Différentes études ont été réalisées pour comprendre les interactions entre les cellules eucaryotes et les SCV-*S. aureus* (Nguyen, *et al*., 2009). Afin de s'affranchir de la capacité des bactéries possédant un phénotype SCV à réverter en phénotype sauvage, des mutants stables de *S. aureus* ont été créés *in vitro* pour comprendre les mécanismes physiopathologiques liés aux SCV. Chez ces mutants stables, les gènes *hemB* ou *menD* ont été inactivés (Von Eiff, *et al*., 2006, Von Eiff, *et al*., 2006).

Des études *in vitro* ont été réalisées sur des cellules endothéliales, épithéliales et sur des kératinocytes. Les SCV-*S. aureus* semble avoir un phénotype adapté à la vie intracellulaire, les souches s'internalisent mieux, provoquent moins de mort cellulaire, et persistent plus longtemps dans ces types cellulaires par rapport au phénotype sauvage.

A ce jour, alors que la présence de *S. aureus*-SCV est classiquement rapportée lors des isolements à partir de prélèvement d'IOA et semble associée à des échecs cliniques, aucune étude *in vitro* n'a été construite afin d'explorer le comportement des variants SCV vis-à-vis des cellules.

IV. Problématiques

Afin de mieux connaître la physiopathologie des IOA et de comprendre le passage à la chronicité observé chez de nombreux patients, la première étape de notre travail consiste à mettre au point une technique permettant de quantifier précisément à la fois la capacité d'adhésion et d'internalisation des staphylocoques sur et dans les ostéoblastes, cellules de soutien du tissu osseux. La maîtrise d'un outil robuste de mesure était un prérequis pour la mise en place de notre projet. Pour quantifier l'internalisation bactérienne, les méthodes classiques de dénombrement sur gélose ont pour limites une lourdeur de réalisation, et une précision imparfaite. Les méthodes de cytométrie en flux déjà décrites, quant à elles,

nécessitent de travailler soit sur des bactéries modifiées génétiquement pour exprimer une molécule fluorescente (ce qui limite le nombre de souches étudiées), soit sur des bactéries préalablement marquées (et donc modifiées) par un fluorophore en amont de l'étape d'infection (ce qui pourrait modifier les intéractions hôte/pathogène). Cette nouvelle méthode que nous avons cherchée à développer devrait permettre de s'affranchir de ses différentes limites en utilisant la cytométrie en flux avec un marquage universel de l'ensemble des staphylocoques en aval de l'étape d'infection. Cette approche devrait en outre permettre de mesurer simultanément l'adhésion et l'internalisation de *S. aureus* par les cellules eucaryotes.

L'une des hypothèses proposées pour comprendre le passage à la chronicité des IOA à *Staphylococcus aureus* est la capacité de ce pathogène à être internalisé par les ostéoblastes. Cette internalisation peut être suivie par l'apparition de variants présentant un phénotype microcolonies ou Small Colony Variant (SCV), forme adaptée à la vie bactérienne dans le compartiment intracellulaire. Le comportement des ostéoblastes face à ces staphylocoques SCV n'ayant jamais été exploré ; dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié l'impact du phénotype SCV sur l'interaction *S. aureus*-ostéoblastes en culture en termes de capacité d'adhésion et d'internalisation, de cytotoxicité, de réponse cytokinique, grâce à l'utilisation de mutants stables construits *in vitro*.

Enfin, bien que *S. aureus* soit la bactérie la plus fréquemment responsable des IOA, le groupe des staphylocoques à coagulase négative représente environ 30 à 43% des étiologies dans le cas particulier des IOA sur matériel, au sein desquelles *S. epidermidis* est très largement majoritaire. Dans une troisième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés aux IOA sur matériel à *S. epidermidis* qui sont aujourd'hui principalement expliquées par l'inoculation bactérienne, lors de la chirurgie, des souches responsables de portage chez le patient. Or, si le portage de *S. epidermidis* est décrit comme universel, les infections sur matériel orthopédique restent peu fréquentes. En dehors du rôle indéniable des facteurs liés à l'hôte (immunodépression par exemple) ou à l'environnement (non-respect d'une asepsie chirurgicale stricte notamment), la question de l'expression de facteurs bactériens chez certaines souches favorisant la survenue des IOA sur matériel parait légitime. Les souches de *S. epidermidis* responsables d'IOA pourraient alors représenter une sous-population particulière des souches de portage, que l'on pourrait distinguer par la présence de caractères de virulence particuliers. L'objectif de ce travail a ainsi été de comparer deux populations de

S. epidermidis, l'une regroupant des souches responsables d'IOA et la seconde des souches de portage nasal vis-à-vis de leurs capacités d'internalisation par les ostéoblastes.

BIBLIOGRAPHIE

ACAR J.F., GOLDSTEIN F.W., LAGRANGE P., (1978). Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 8, 142-147.

ADER F., SALOMON J., PERRONNE C., BERNARD L., (2004). Is bone infection of endogenous or exogenous origin? A pathophysiological approach. *Médecine et maladies infectieuses*, 34, 530-537.

AGERER F., WAECKERLE S., HAUCK C.R., (2004). Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 23-32.

ALMEIDA R.A., OLIVER S.P., (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 31, 205-212.

ANAYA-LOPEZ J.L., CONTRERAS-GUZMAN O.E., CARABEZ-TREJO A., BAIZABAL-AGUIRRE V.M., LOPEZ-MEZA J.E., VALDEZ-ALARCON J.J., OCHOA-ZARZOSA A., (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in veterinary science*, 81, 358-361.

ARNOLD R., KONIG B., GALATTI H., WERCHAU H., KONIG W., (1995). Cytokine (IL-8, IL-6, TNF-alpha) and soluble TNF receptor-I release from human peripheral blood mononuclear cells after respiratory syncytial virus infection. *Immunology*, 85, 364-372.

BERGERON M., DAUWALDER O., GOUY M., FREYDIERE A.M., BES M., MEUGNIER H., BENITO Y., ETIENNE, J., , LINA G., VANDENESCH, F., , BOISSET S., (2011). Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30, 343-354.

BOEREMA J.A., CLEMENS R., BRIGHTWELL G., (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, 107, 192-201.

BORDERON E., HORODNICEANU T., (1976). [Dwarf colony mutants of "*staphylococcus*": study of three strains isolated from patients with osteosynthesis (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)*, 127, 503-514.

BOSSE J., GRUBER H., RAMP W., (2005). Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent , long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg*, 87, 1343-1347.

BRADY R.A., LEID J.G., CALHOUN J.H., COSTERTON J.W., SHIRTLIFF M.E., (2008). Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS immunology and medical microbiology*, 52, 13-22.

BRUN Y. B.M., (2000). *Staphylococcus*. In «Précis de bactériologie clinique», FRENEY J. R.F., HANSEN W., BOLLET C. (eds).

COLWELL C.A., (1946). Small colony variants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 52, 417-422.

COSTERTON J.W., STEWART P.S., GREENBERG E.P., (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y*, 284, 1318-1322.

COURET I., (2004). Biologie de remodelage osseux. *Médecine nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique* 28,

DAROUICHE R.O., (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*, 350, 1422-1429.

DASSY B., STRINGFELLOW W.T., LIEB M., FOURNIER J.M., (1991). Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. *J Gen Microbiol*, 137, 1155-1162.

DEHART H.P., HEATH H.E., HEATH L.S., LEBLANC P.A., SLOAN G.L., (1995). The Lysostaphin Endopeptidase Resistance Gene (epr) Specifies Modification of Peptidoglycan Cross Bridges in *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 61, 2811.

DELOID G.M., SULAHIAN T.H., IMRICH A., KOBZIK L., (2009). Heterogeneity in macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* strains: high-throughput scanning cytometry-based analysis. *PLoS One*, 4, e6209.

ELLINGTON J.K., REILLY S.S., RAMP W.K., SMELTZER M.S., KELLAM J.F., HUDSON M.C., (1999). Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog*, 26, 317-323.

FOSTER T.J., HOOK M., (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 6, 484-488.

GEIPEL U., (2009). Pathogenic organisms in hip joint infections. *Int J Med Sci*, 6, 234-240.

GIUDICELLI J., SOUBERBIELLE J.-C., (1998). Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose. *Revue de l'ACOMEN*, 4,

GOLDENBERG D., (1998). Septic arthritis. *Lancet*, 351, 197-202.

GREENE C., MCDEVITT D., FRANCOIS P., VAUDAUX P.E., LEW D.P., FOSTER T.J., (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. *Mol Microbiol*, 17, 1143-1152.

HALL-STOODLEY L., STOODLEY P., (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11, 1034-1043.

HAUSSLER S., LEHMANN C., BRESELGE C., ROHDE M., CLASSEN M., TUMMLER B., VANDAMME P., STEINMETZ I., (2003). Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the *Burkholderia cepacia* complex. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22, 249-253.

HAUSSLER S., TUMMLER B., WEISSBRODT H., ROHDE M., STEINMETZ I., (1999). Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis*, 29, 621-625.

HIRSCHHAUSEN N., SCHLESIER T., SCHMIDT M.A., GOTZ F., PETERS G., HEILMANN C., (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol*, 12, 1746-1764.

HUDSON M.C., RAMP W.K., NICHOLSON N.C., WILLIAMS A.S., NOUSIAINEN M.T., (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog*, 19, 409-419.

HURTEL-LEMAIRE A.S., MENTAVERRI R., CAUDRILLIER A., COURNARIE F., WATTEL A., KAMEL S., TERWILLIGER E.F., BROWN E.M., BRAZIER M., (2009). The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *J Biol Chem*, 284, 575-584.

JARRAUD S., LINA G., VANDENESCH F., ETIENNE J., (2002). The epidemiology of toxemic infections caused by *Staphylococcus aureus* in an intensive care setting. *Ann Fr Anesth Reanim*, 21, 370-374.

JEVON M., GUO C., MA B., MORDAN N., NAIR S.P., HARRIS M., HENDERSON B., BENTLEY G., MEGHJI S., (1999). Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infection and immunity*, 67, 2677-2681.

KHALIL H., WILLIAMS R.J., STENBECK G., HENDERSON B., MEGHJI S., NAIR S.P., (2007). Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect*, 9, 460-465.

KUSUMA C., JADANOVA A., CHANTURIYA T., KOKAI-KUN J.F., (2007). Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 475-482.

LAMMERS. S, NUIJTEN. PJ, HE. S., (1999). The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS microbiology letters*, 180, 103-109.

LECOMTE F., NOUVELLON M., LEVESQUE H., (2001). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, 344, 1399-1400; author reply 1400-1391.

LEW D.P., WALDVOGEL F.A., (2004). Osteomyelitis. *Lancet*, 364, 369-379.

MARIE P., (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/science* 17, 1252-1259.

MOISAN H., BROUILLETTE E., JACOB C.L., LANGLOIS-BEGIN P., MICHAUD S., MALOUIN F., (2006). Transcription of virulence factors in *Stahylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *Journal of Bacteriology*, 188, 64-76.

NGUYEN H.A., DENIS O., VERGISON A., THEUNIS A., TULKENS P.M., STRUELENS M.J., VAN BAMBEKE F., (2009). Intracellular activity of antibiotics in a model of human THP-1 macrophages infected by a *Staphylococcus aureus* small-colony variant strain isolated from a cystic fibrosis patient: pharmacodynamic evaluation and comparison with isogenic normal-phenotype and revertant strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 1434-1442.

OTTO M., (2009). *Staphylococcus epidermidis*-the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7, 555-567.

OVIEDO-BOYSO J., BRAVO-PATINO A., CAJERO-JUAREZ M., VALDEZ-ALARCON J.J., BAIZABAL-AGUIRRE V.M., (2009). TNF-alpha reduces the level of *Staphylococcus epidermidis* internalization by bovine endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett*, 292, 92-99.

PAUTKE C., SCHIEKER M., TISCHER T., KOLK A., NETH P., MUTSCHLER W., MILZ S., (2004). Charactrization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 in comparison to human osteoblasts. *Anticancer research*, 24, 3743-3748.

PROCTOR. RA, VON EIFF. C, KAHL. B, BECKER K, MCNAMARA. P, HERRMANN. M, PETERS. G, (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiol*, 4, 295-305.

ROGHMANN M., TAYLOR K.L., GUPTE A., ZHAN M., JOHNSON J.A., CROSS A., EDELMAN R., FATTOM A.I., (2005). Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *J Hosp Infect*, 59, 27-32.

ROHDE H., KALITZKY M., KROGER N., SCHERPE S., HORSTKOTTE M.A., KNOBLOCH J.K., 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. *Journal of clinical microbiology*, 42, 5614-5619.

SCHIERHOLZ J.M., BEUTH J., (2001). Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect*, 49, 87-93.

SCHRODER A., KLAND R., PESCHEL A., VON EIFF C., AEPFELBACHER M., (2006). Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells : small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol*, 195, 185-194.

SENDI P., PROCTOR R., (2009). *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen : the role of small colony variants in prosthetic joint infection. *Trends in Microbiology*, 17, 54-58.

SFM. 2011. Recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Available from: www.sfm-microbiologie.org.

SHIRTLIFF M., MADER J., (2002). Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev*, 527-544.

SINHA B., FRANCOIS P., QUE Y.A., HUSSAIN M., HEILMANN C., MOREILLON P., LEW D., KRAUSE K.H., PETERS G., HERRMANN M., (2000). Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun*, 68, 6871-6878.

STEVENS Q.E., SEIBLY J.M., CHEN Y.H., DICKERMAN R.D., NOEL J., KATTNER K.A., (2007). Reactivation of dormant lumbar methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis after 12 years. *J Clin Neurosci*, 14, 585-589.

STRINGFELLOW W.T., DASSY B., LIEB M., FOURNIER J.M., (1991). *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl Environ Microbiol*, 57, 618-621.

TODD J., FISHAUT M., KAPRAL F., WELCH T., (1978). Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I *Stahylococci*. *Lancet*, 25, 1116-1118.

TROUILLET S., RASIGADE J., LHOSTE Y., FERRY T., VANDENESCH F., ETIENNE J., LAURENT F., (2011). A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J. Microb. Methods*, 86,

TUCHSCHERR L., HEITMANN V., HUSSAIN M., VIEMANN D., ROTH J., VON EIFF C., PETERS G., BECKER K., LOFFLER B., (2010). *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.*, 202, 1031-1040.

UCKAY 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.

VON EIFF C., BECKER K., METZE D., LUBRITZ G., HOCKMANN J., SCHWARZ T., G P., (2001). Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotics treatment failure in a patient with darier's disease. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1643-1647.

VON EIFF C., HEILMANN C., PROCTOR R.A., WOLTZ C., PETERS G., GOTZ F., (1997). A site-directed *Staphylococcus aureus hem*B mutant is a small colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol*, 179, 4706-4712.

VON EIFF C., MCNAMARA P., BECKER K., BATES D., LEI X.H., ZIMAN M., BOCHNER B.R., PETERS G., PROCTOR R.A., (2006). Phenotype microarray profiling of *Staphylococcus aureus men*D and *hem*B mutants with the small-colony-variant phenotype. *J Bacteriol*, 188, 687-693.

VON EIFF C., PETERS G., BECKER K., (2006). The small colony variant (SCV) concept - the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*, 37 Suppl 2, S26-33.

WRIGHT J.A., NAIR S.P., (2010). Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol*, 300, 193-204.

WRIGHT K.M., FRIEDLAND J.S., (2004). Regulation of chemokine gene expression and secretion in *Staphylococcus aureus*-infected osteoblasts. *Microbes Infect*, 6, 844-852.

ZIMMERLI W., TRAMPUZ A., OCHSNER P.E., (2004). Prosthetic-joint infections. *The New England journal of medicine*, 351, 1645-1654.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ECOLES
SCIENCES ET VIE DE LA TERRE

Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*

Sophie TROUILLET

Soutenu le 25 Octobre 2011

RESUME

***Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis* constituent les principaux agents étiologiques des infections ostéo-articulaires (IOA), infections sévères, volontiers chroniques et récidivantes. L'objectif de notre travail était de mieux comprendre la physiopathologie des IOA en étudiant les interactions entre les staphylocoques et les ostéoblastes (cellules spécialisées dans l'appositionosseuse) et plus particulièrement, les phénomènes d'internalisation, de persistance et de transition phénotypique des bactéries intracellulaires.**

La première étape de notre travail a consisté à développer et à valider i) un modèle d'infection cellulaire à *S. aureus in vitro* (lignée ostéoblastique MG-63) et ii) des techniques originales permettant de quantifier simultanément la capacité d'adhésion et d'internalisation des staphylocoques dans les ostéoblastes par cytométrie en flux en utilisant un antibiotique ciblant la paroi des bactéries Gram positive couplé avec un fluorochrome.

A l'aide des outils mis en place, nous avons étudié l'impact de la transition phénotypique des bactéries intracellulaires conduisant à l'expression du phénotype microcolonie ou Small Colony Variant (SCV), forme adaptée à la survie intracytoplasmique, sur l'interaction bactéries/ostéoblastes *ex vivo* en culture cellulaire. Des mutants stables ont été générés *in vitro* en invalidant les gènes codant pour la biosynthèse de l'hémine (*hem*B) ou de la ménadione (*men*D). Les résultats obtenus avec un couple de souches isogéniques (*men*D/D*men*D), indiquent que les taux d'internalisation, d'adhésion, de cytotoxicité et de sécrétion cytokinique sont plus faibles avec le variant SCV qu'avec la souche sauvage. Ces résultats qui s'opposent à ceux rapportés par certains auteurs, soulignent la complexité des interactions hôtes-pathogènes dans les modèles *ex vivo*, l'influence du modèle cellulaire utilisé et de la voie métabolique inactivée dans le cas des SCV. Afin de compléter nos résultats, les mêmes expériences devraient être reproduites avec un couple de souches isogéniques inactivées pour le gène *hem*B.

Enfin nous nous sommes intéressés aux IOA sur matériel à *S. epidermidis* qui sont aujourd'hui principalement expliquées par l'inoculation bactérienne, lors de la chirurgie, des souches responsables de portage chez le patient. Or, si le portage de *S. epidermidis* est décrit comme universel, les infections sur matériel orthopédique restent peu fréquentes. Les souches de *S. epidermidis* responsables d'IOA pourraient donc représenter une sous-population particulière au sein des souches de portage, présentant des facteurs de virulence particuliers favorisant l'apparition d'une IOA. La mesure des niveaux d'adhésion et d'internalisation de souches de *S. epidermidis* issues de portage nasal et d'IOA sur matériel n'a pas permis de distinguer les deux populations étudiées suggérant que i) les souches de *S epidermidis* constitue une seule population Homogène, ii) les souches de S. epidermidis sont accidentels. Nos résultats démontrent également que les souches de *S. epidermidis* présentent une capacité d'adhésion et d'invasion nettement plus faible que les souches de *S. aureus*, suggérant que l'internalisation au sein des ostéoblastes joue probbalementun rôle moins important dans la physiopathologie des IOA à *S. epidermidis* que dans les IOA à *S. aureus*. La capacité de formation de biofilm, élément essentiel dans la chronicisation des IOA sur matériel à *S. epidermidis*, mériterait d'être explorée et pourrait être un facteur plus discriminant pour distinguer les souches invasives parmi les souches de portage.

MOTS CLES : *Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus*, ostéoblastes, adhésion, *i n v a s i o n , s m a l l c o l o n y v a r i a n t*