



N° d'ordre NNT : 2017LYSE1115

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

Ecole Doctorale N° 341  
**Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation**

Spécialité de doctorat : **Science**  
Discipline : **Microbiologie**

Soutenue publiquement le 6 Juillet 2017, par :

**Jason TASSE**

---

**APPORT DE L'ANTIBIOFILMOGRAMME ET DE LA MESURE DE LA  
CAPACITE DE FORMATION DU BIOFILM DANS LA PRISE EN  
CHARGE DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A  
STAPHYLOCOQUES**

---

Devant le jury composé de :

Docteur **Jocelyne CAILLON** – MCU-PH – CHU de Nantes / Faculté de médecine - Rapporteur  
Professeur **Sophie GANGLOFF** – PU – Faculté de Pharmacie de Reims - Rapporteur  
Docteur **Paul VERHOEVEN** – MCU-PH – CHU St-Etienne / Université Jean Monnet - Examineur

Docteur **Thierry BERNARDI** – PDG – BioFilm Control – Co-directeur de thèse  
Professeur **Frédéric LAURENT** – PU – CHU de Lyon – Directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

**Président de l'Université**

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

Président du Conseil Académique

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Didier REVEL

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Vice-président de la Commission Recherche

M. Fabrice VALLÉE

Directrice Générale des Services

Mme Dominique MARCHAND

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

« Seul on va plus vite, ensemble on va plus loin »

Proverbe africain

## REMERCIEMENTS

---

### **Au Professeur Sophie Gangloff et au Docteur Jocelyne Caillon, rapporteur**

Je tenais à vous exprimer ici mes plus vifs remerciements pour avoir pris le temps de lire et juger mon travail. Votre expertise dans le domaine et vos avis valorisent grandement ce projet. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

### **Au docteur Paul Verhoeven, examinateur**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je suis très honoré de pouvoir bénéficier de votre expertise dans le domaine des staphylocoques.

### **Au Professeur Frédéric Laurent, directeur de thèse**

Je ne pourrais pas assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as redonné goût à la recherche à un moment où je pensais ne pas continuer. Tu as su me pousser, me soutenir et m'accompagner dans cette aventure. Je ne regrette rien. J'ai été très honoré et très content de suivre avec toi l'évolution de l'équipe ces 5 dernières années. Puissent nos façons de travailler et nos caractères continuer à collaborer ensemble.

### **À monsieur le PDG Thierry Bernardi, co-directeur de thèse**

Merci de m'avoir donné ma chance de pouvoir réaliser cette thèse avec vous. Travailler à vos côtés et au sein de votre entreprise a toujours été un plaisir. Je garderai de très bons souvenirs de mes visites à Clermont, de vos visites à Lyon et surtout, de tous les congrès que vous m'avez permis de faire : Rome, Copenhague, Chicago, Paris, Gand et j'en passe.

### **Au professeur François Vandenesch**

Merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire. Même si nos échanges étaient rares, je garderai en souvenir que vous avez toujours su répondre positivement à mes demandes.

### **Au professeur Sylvestre Tigaud**

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre service et de m'avoir transmis une partie de votre savoir. Je remercie également l'ensemble des **techniciennes du laboratoire** qui ont toujours fait en sorte que nous puissions travailler ensemble, et qui n'ont jamais hésité à m'aider quand cela était possible. Je garderai un très bon souvenir de mon passage dans ce service.

## À Christian Provot et Stéphanie Badel-Berchoux

Un grand merci à vous deux pour m'avoir guidé et soutenu tout au long des 3 années. Votre aide a été précieuse. Je n'oublierai pas tous ces bons moments passés ensemble au congrès, et j'espère bien en partager d'autres à l'avenir avec vous !

## À mes collègues

Tellement de personnes m'ont aidé pendant ces 3 années, un GRAND MERCI à tous. Grâce à vous, j'ai foi en l'humanité, vous êtes ma preuve que l'homme peut être bon envers son prochain !!

Tout d'abord, un grand merci à mes deux collègues CIFRE : **Elodie Olivares**, je suis vraiment content d'avoir pu apprendre à te connaître, malgré nos caractères bien différents !! Quel plaisir de t'avoir comme copilote pendant les congrès ! Une caresse à Ti Filou Tube ! **À Claire Marques**. C'était chouette de collaborer avec toi. Merci de m'avoir accueilli, guidé (j'irai même jusqu'à dire bichonné !) à Clermont-Ferrand. J'en garderai un très bon souvenir !

Un grand merci à mes collègues Croix-Roussiens, et pour commencer, aux « anciens » que j'ai connu en premier : à **Sophie Trouillet-Assant** que j'ai vu la première fois enceinte, puis maman, tour à tour « refaite » puis « au bout de sa vie », c'était cool de t'avoir au quotidien, j'ai adoré nos conversations, et ton ÉNERGIE !!!! **À Florent Valour**, the MASTER of the BJIs, merci pour tout ton aide sur l'aspect clinique de ma thèse, pour ton optimisme, pour ton humour, pour tout quoi ! **À Céline Dupieux**, quelle idée nous avons eue de nous lancer dans nos thèses ! Merci d'avoir partagé cette aventure à côté de moi, et courage pour la fin ! On va y arriver ! Merci à **Patricia Martin Simoes**, plus qu'une collègue, mon amie, avec le plus beau sourire que je connaisse. Ton Chouchou te remercie pour ta joie de vivre, tes conseils, tes avis, et tes rappels pour ne pas louper le repas de midi (mais il n'est que 11 h 10 Patricia ???). **À Marine Butin**, je suis vraiment content d'avoir pu croiser ta route et qu'on ait pu vivre cette aventure en même temps. Que de chemin depuis notre premier gel d'électrophorèse ensemble ! Je te souhaite beaucoup de bonheur pour l'avenir. Un grand merci à **Anaïs Sapin**, avec qui j'ai débuté mon aventure dans le laboratoire. Quelle tristesse que tu sois partie. J'aurais tellement aimé t'avoir à mes côtés ! Je ne t'oublie pas, il faut qu'on se recroise !! **À Jérémy Ranfaing**, toi aussi tu es parti trop vite ! J'espère te recroiser bientôt autour d'un jeu ou à ta thèse (cifre power !). **À Sacha Flammier**, à qui je pense tous les midis !! Dommage que tu n'aies pas eu ta thèse chez nous... **À Jean-Philippe Rasigade**, merci pour ton aide et ton point de vue toujours pertinent ! **À Yann Dumont**, toujours prêt à m'aider même quand il n'avait pas le temps !! Merci mon

petit ! On reste en contact de toute façon ! À **William Mouton**, merci d'être arrivé à un moment où je me sentais seul lol ! C'est un plaisir de travailler avec toi (fais péter la zik) et d'avoir partagé tellement de café !! À **Yousef Maali**, courage mec pour ta thèse, tu es sur la bonne voie ! Merci pour ton smile au quotidien, et merci pour tes connaissances sur les staphylocoques à coagulase négative qui comme nous le savons font partie du genre *Staphylococcus* et qui sont responsables de nombreuses ... À **Virginie Tafani**, la force tranquille, franchement tu gères trop, c'est rassurant de t'avoir comme collègue ! À **Alexandre Jammot**, pour ta bonne humeur et nos conversations où l'on refaisait le monde. À mon seigneur **Régis Villet**, je souris rien qu'en écrivant ton nom ! Merci pour tout, pour ton aide plus que précieuse lors de ma dernière année, pour ta façon de travailler, ton point de vue, ton optimisme... et ton humour !! C'était tellement agréable d'apprendre à tes côtés ! PS : Eugène va bien ! À **André Carra**, je remercie Régis de t'avoir trouvé et pris en stage ! Quel plaisir de bosser avec toi et de discuter au quotidien ! Vraiment, je te surkiffe lol ! À **Alice Monteix**, THE technicienne, la Lucky Luke de la pipette, aussi sympa qu'espiègle, c'est trop cool que tu sois là, j'espère qu'on continuera à bosser ensemble !! Aux deux nouveaux Master Chef, **Jérôme Josse** (merci pour ton aide, pour la relecture de la thèse, des articles, des résultats, des figures, des CR, des dossiers, des mails ....mais c'est abusé tout ce que je t'ai fait relire ! Je suis content de pouvoir bénéficier de ton expertise sur les biofilms...et sur les bières !) et **Alan Diot** (Merci pour ton aide récente, je suis vraiment content que tu aies rejoint le labo, entre joueurs, on se comprend ! ;-). Un IMMENSE merci à **Eugénie Mabrut**, ma copilote des études cliniques, qui a toujours su m'aider et m'expliquer avec le sourire toutes ces démarches obscures ! Merci beaucoup et bravo pour la chasse aux non-op, que de trophées obtenus ! Une petite pensée à **Anne-Gaëlle**, pour tes envois de souches avec le sourire, à **Pascale Riffard**, pour tes innombrables coups de main, à **Tristan Ferry**, pour ton point de vue éclairé, à **Hélène** et **Chantale** pour votre aide toujours souriante, à **Brigitte Sanchez**, pour votre réactivité, à **Jacques Bietrix** et **Guillaume Douay**, pour votre sympathie, à mes collègues internes virologues **Alexandre Gaymard** et **Maxime Pichon** (et leur screening des TCL !!), à **Claude-Alexandre**, bienvenu dans l'aventure ! Aux petits derniers arrivés, **Camille**, **Nicolas**, **Lélia**, **Marina** qui enrichissent l'expertise du laboratoire et les débats à midi (on rentre plus sur les grandes tables au self à cause de vous !!). Merci aux nombreux stagiaires qui ont croisé ma route et m'ont aidé ! **Maude Saglio** bien sûr, la pro du filtre et du Spirale, il faut qu'on se fasse un Seven Wonders ensemble à l'occasion ! À **Thomas Berniaud**, t'as fait un travail impeccable, c'était super de bosser avec toi, à **Tuan**, également un réel plaisir de travailler ensemble ! Mais également à **Laëtitia** (un tit café ?), **PA**, **Claire**, **Victoria**,

**Anne, Natacha, Lucie, Caroline...** et ce que je pourrais oublier... merci à tous pour votre aide et votre présence !

Je n'oublie pas non plus mes collègues Laennecois (on dit Laennecien ?), **Cédric, Florence, Jessica, Karen, Tom, Christophe** qui ont toujours su répondre présent quand c'était nécessaire ! Un grand merci à vous tous.

A mes collègues du CNR, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Un merci particulier à **Hélène** pour les *spa-types* et surtout à **Michèle**, pour son expertise et son aide précieuse.

**À tous mes collègues de BioFilm Control.** Merci pour votre bonne humeur et pour votre accueil. Vous êtes une super équipe, c'était un plaisir à chaque fois de venir vous voir.

**À mes amis,**

Quelle chance j'ai de vous avoir ! Un grand merci à vous tous, des plus proches amis Lyonnais : **Nico** (qui aurait cru qu'on finirait tous les deux-là !) et sa douce **Julie** (qui prend si bien soin de lui, merci !), **Sam** (merci pour les Mantes Evil Voice!!), **Gwen** (t'es trop sympa meuf !), **Margaux** (stp, ne te casses rien pendant ma soutenance), **Yo** (Hérisson Planant !!), **Anna** (merci de nous supporter les mardis lol !), **Flo** et **Floflo** (obligé de vous citer ensemble, putain je vous aime !), **Markou** (content que tu sois dans le coin copain !), **Amély** (content que tu sois dans le coin copine !!), **Wi** (wi) ; aux plus éloignés : **Cycy** (la famille !), **Anaëlle** (tkl j'ai prévu le jus de t...), **Memed** (HA ma c\*\*\*\*\*) et **Eve** (on partage on a dit !), **Morgan** (Summer is coming !), **Clément** (une petite menthol ?), **Mattia** (Clic !) **Alex, Emma, Toinou, Steph** (IUT POWA), **Anaïs** (collègue !!), à **Marion** et tous les autres !

**À ma famille,**

**À mes parents**, qui m'ont toujours soutenu et aidé dans mes projets. Je vous aime. À mon **Frangin**, pour son optimisme à toute épreuve ! Continue comme ça. À mes grands-parents, **Manou**, la plus gentille des Manous, à **Papi**, à **Mamie**... À ma **super marraine**, pour sa gentillesse.

**À mon petit cœur**, que j'aime plus que tout.

Je remercie également le Fonds Unique Interministériel (FUI), et le dispositif de Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) mis en œuvre par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) pour les aides financières à ce projet.



## RESUME

---

Dans le cadre des infections ostéo-articulaires (IOA), l'utilisation de matériels étrangers peut, en cas de contamination, aboutir à la formation d'un biofilm associé à un risque plus important d'échec du traitement et de récurrence. Les bactéries sous forme de biofilm sont en effet protégées de l'action du système immunitaire et ont une tolérance plus importante aux antibiotiques. À l'heure actuelle, l'activité des antibiotiques est déterminée par la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), mais cette valeur ne tient pas compte de la forme sessile des bactéries. C'est pourquoi, la société BioFilm Control a développé un nouveau test, l'Antibiofilmogramme<sup>®</sup>, permettant de déterminer la CMI biofilm (CMIf) reflétant la capacité préventive des antibiotiques sur l'installation des microorganismes en biofilm. L'objectif de ma thèse a été dans un premier temps de participer à la démonstration de la valeur clinique de ce nouveau test dans le cadre des IOA à *Staphylococcus aureus*. Nous avons pu mettre en place un recueil prospectif et réaliser les premiers essais *in vitro*. Nos résultats obtenus pour la cloxacilline ont pu, par la suite, être confirmés sur un modèle *in vivo* d'infection sur matériel. Dans un second temps, nous avons pu caractériser la capacité de formation de biofilm des souches cliniques et avons pu mettre en évidence des profils différents liés à la clonalité des souches. Enfin, nous avons pu mettre au point une nouvelle méthode de rinçage et de quantification des biofilms pour les modèles en microplaques via l'utilisation originale de vapeur. Cette approche simple améliore grandement la reproductibilité des résultats et préserve l'intégrité structurelle des biofilms.

## SUMMARY

---

In the context of Bone and Joint Infections (BJIs), the orthopedic devices are preferential surface for microorganisms to adhere and form biofilm associated with high rates of failures and relapses. Within biofilm, bacteria are protected from the host immune response and are able to survive in the presence of high concentration of antibiotics. The standard Minimal Inhibitory Concentration (MIC) informs on the antibiotic susceptibility of planktonic bacteria, but is not suited for biofilm. The company BioFilm Control developed a new test named Antibiofilmogram<sup>®</sup>, which measures early-stage biofilm growth in presence of antibiotics, and provides a biofilm Minimal Inhibitory Concentration (bMIC). The aim of my PhD research was first to take part in the demonstration of the clinical value of this new test for *Staphylococcus aureus* BJIs. We established a prospective collection of data and strains and performed the first *in vitro* assays. Our results for cloxacillin were confirmed in an *in vivo* model of catheter-associated infection. Second, we characterized the biofilm formation capacity of various *S. aureus* clinical isolates involved in BJIs and we showed that the biofilm formation capacity is correlated with clonal lineages. Finally, we were able to develop a new and original method of washing and quantifying biofilms for microplate system using steam. This simple approach preserves the biofilm integrity and leads to highly reproducible data.

## **LABORATOIRE DE RATTACHEMENT**

---

Cette thèse a été préparée au sein du Centre International de Recherche en Infectiologie - INSERM U1111 - CNRS UMR5308 - ENS Lyon – Université Lyon 1, équipe "Pathogénie des staphylocoques"

### Adresse postale du laboratoire :

CIRI – INSERMU1111

Faculté de Médecine Lyon-Est

7, rue Guillaume Paradin

69372 LYON CEDEX 8 - France

**Téléphone** : 04 78 77 86 57

## **ENTREPRISE DE RATTACHEMENT**

---

Cette thèse a été réalisée en collaboration avec l'entreprise BioFilm Control

### Adresse postale de l'entreprise :

BioFilm Control

Rue Emile Duclaux

Biopôle Clermont Limagne

63360 Saint-Beauzire – France

**Téléphone** : 04 73 33 39 80

## SOMMAIRE

---

<b>TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>19</b>
<b>1 LES INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Généralités .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Classification.....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Classification selon la localisation anatomique.....	21
1.2.1 Classification en fonction du matériel orthopédique.....	23
1.2.2 Classification selon le délai d'évolution .....	23
<b>1.3 Épidémiologie .....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Données démographiques .....	24
1.3.2 Prévalence des différentes espèces bactériennes .....	25
<b>1.4 Diagnostic.....</b>	<b>25</b>
1.4.1 Clinique.....	25
1.4.2 Microbiologique .....	26
1.4.3 Imagerie .....	27
<b>1.5 Prise en charge.....</b>	<b>29</b>
1.5.1 Traitement chirurgical .....	30
1.5.2 Antibiothérapie .....	32
<b>2 LE BIOFILM .....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Généralités .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Etapes de formation.....</b>	<b>38</b>
2.2.1 Adhésion.....	38
2.2.2 Maturation .....	39
2.2.3 Dispersion.....	41
<b>2.3 Composition des biofilms .....</b>	<b>41</b>
2.3.1 Les polysaccharides .....	42
2.3.2 Les protéines .....	43
2.3.3 L'ADN extracellulaire.....	44
<b>2.4 Méthodes de mesure .....</b>	<b>46</b>
2.4.1 Méthodes <i>in vitro</i> .....	47
2.4.1.1 Les modèles en microplaques .....	47

2.4.1.2	Les modèles en flux .....	50
2.4.2	Microscopie.....	52
2.4.2.1	La microscopie optique .....	52
2.4.2.2	La microscopie confocale .....	53
2.4.2.3	La microscopie électronique à balayage .....	53
2.4.2.4	La microscopie à force atomique .....	54
2.4.3	Méthodes <i>in vivo</i> .....	54
2.4.3.1	Le modèle <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	54
2.4.3.2	Les modèles sur cathéters veineux centraux.....	55
2.4.3.3	Les modèles d'implants sous-cutanés .....	55
2.4.3.4	Les modèles d'implants intrapéritonéaux .....	55
2.4.3.5	Les modèles d'infections urinaires .....	56
2.4.3.6	Les modèles d'infections ostéoarticulaires .....	56
<b>2.5</b>	<b>Physiopathologie du biofilm dans les infections ostéo-articulaires.....</b>	<b>57</b>
2.5.1	Initiation du biofilm.....	57
2.5.2	Réponse immunitaire .....	59
2.5.3	Impact dans le diagnostic.....	60
<b>2.6</b>	<b>Prévention de la formation de biofilm .....</b>	<b>61</b>
<b>3</b>	<b>LES ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Généralités .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2</b>	<b>Classification.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3</b>	<b>Efficacité de l'antibiothérapie.....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Spectre d'activité microbien .....	65
3.3.2	Principe de l'antibiogramme .....	68
3.3.3	Méthodes d'antibiogramme manuelles .....	70
3.3.3.1	L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé .....	70
3.3.3.2	Détermination des CMI en macro-dilution et micro-dilution.....	72
3.3.4	Méthodes automatisées .....	72
3.3.5	Pharmacodynamie des antibiotiques.....	74
3.3.5.1	Temps supérieur à la CMI ( $T > CMI$ ) .....	76
3.3.5.2	Aire sous les courbes rapportées à la CMI (ASC/CMI) .....	77
3.3.5.3	Les quotients inhibiteurs (QI) .....	77
3.3.5.4	La concentration préventive de l'apparition de mutant (CPM) .....	78
3.3.5.5	L'effet post-antibiotique (EPA) .....	79

3.3.5.6	La résistance adaptative .....	80
3.3.6	Efficacité des antibiotiques sur les bactéries sessiles .....	80
3.3.6.1	Introduction sur la tolérance aux antibiotiques .....	80
3.3.6.2	La concentration minimale éradicatrice du biofilm (CMEB).....	80
3.3.6.3	Mécanismes de la tolérance aux antibiotiques .....	81
3.3.6.3.1	Diffusion altérée des antibiotiques – rôle de la matrice extracellulaire .....	81
3.3.6.3.2	Microenvironnement et croissance bactérienne ralentie.....	83
3.3.6.3.3	Les bactéries persistantes, une sous-population tolérante .....	83
3.3.6.3.4	La tolérance, un processus multifactoriel .....	86
3.3.6.4	Effet d’induction .....	86
3.3.6.5	L’antibiofilmogramme : mesure de la capacité de prévention du biofilm des antibiotiques	90
3.3.6.5.1	Généralités .....	90
3.3.6.5.2	Principe .....	90
3.3.6.5.3	Applications cliniques.....	91

## **TRAVAIL PERSONNEL.....93**

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>94</b>
1.1	<b>Première Publication: Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram® .....</b>	<b>96</b>
1.2	<b>Deuxième Publication: Association between biofilm formation and clonal lineage in <i>Staphylococcus aureus</i> from prosthetic joint infections .....</b>	<b>106</b>
1.3	<b>Troisième Publication: A steam-based method to preserve structural integrity of biofilm 122</b>	
<b>2</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>135</b>
<b>3</b>	<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>144</b>
<b>4</b>	<b>ANNEXE.....</b>	<b>148</b>
4.1	<b>Premier article: Adaptive processes of <i>Staphylococcus aureus</i> isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients. ....</b>	<b>148</b>
4.2	<b>Deuxième article: Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical <i>Staphylococcus aureus</i> isolate from bone and joint infection.....</b>	<b>158</b>
4.3	<b>Troisième article: Antimicrobial activity against intraosteoblastic <i>Staphylococcus aureus</i>. 164</b>	

<b>4.1</b>	<b>Quatrième article: Rapid bench identification of methicillin-sensitive and methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>: A multicenter comparative evaluation of Alere PBP2a Culture Colony Test (Alere) Versus Slidex MRSA detection (bioMérieux).....</b>	<b>172</b>
<b>4.2</b>	<b>Protocole de l'étude clinique prospective .....</b>	<b>175</b>
<b>4.3</b>	<b>Mécanismes d'action des antibiotiques et mécanisme de résistance staphylococcique</b>	<b>201</b>
4.3.1	Les bêta-lactamines.....	201
4.3.1.1	Mécanisme d'action des bêta-lactamines .....	201
4.3.1.2	Résistance aux bêta-lactamines .....	201
4.3.2	Les glycopeptides .....	202
4.3.2.1	Mécanisme d'action des glycopeptides .....	202
4.3.2.2	Résistance aux glycopeptides .....	202
4.3.3	Les phosphonopeptides .....	202
4.3.3.1	Mécanisme d'action des phosphonopeptides.....	202
4.3.3.2	Résistance aux phosphonopeptides .....	202
4.3.4	La daptomycine .....	203
4.3.4.1	Mécanisme d'action de la daptomycine.....	203
4.3.4.2	Résistance à la daptomycine .....	203
4.3.5	Les aminosides .....	203
4.3.5.1	Mécanisme d'action des aminosides.....	203
4.3.5.2	Résistance aux aminosides .....	204
4.3.6	Les cyclines .....	204
4.3.6.1	Mécanisme d'action des cyclines .....	205
4.3.6.2	Résistance aux cyclines.....	205
4.3.7	Les macrolides, lincosamides, streptogramines, kétolides (MLSK) .....	205
4.3.7.1	Mécanisme d'action des MLSK.....	206
4.3.7.2	Résistance aux MLSK .....	206
4.3.8	Les phénicolés .....	207
4.3.8.1	Mécanisme d'action des phénicolés .....	207
4.3.8.2	Résistance aux phénicolés .....	207
4.3.9	L'acide fusidique.....	207
4.3.9.1	Mécanisme d'action de l'acide fusidique .....	207
4.3.9.2	Résistance à l'acide fusidique .....	207
4.3.10	Les oxazolidinones .....	208
4.3.10.1	Mécanisme d'action des oxazolidinones.....	208
4.3.10.2	Résistance aux oxazolidinones .....	208

4.3.11	Les quinolones .....	208
4.3.11.1	Mécanisme d'action des quinolones .....	208
4.3.11.2	Résistance aux quinolones .....	209
4.3.12	Les rifamycines.....	209
4.3.12.1	Mécanisme d'action des rifamycines .....	209
4.3.12.2	Résistance aux rifamycines.....	209
4.3.13	Les nitrofuranes .....	209
4.3.13.1	Mécanisme d'action des nitrofuranes .....	210
4.3.13.2	Résistance aux nitrofuranes .....	210
4.3.14	Les sulfamides et diaminopyrimidines.....	210
4.3.14.1	Mécanisme d'action des sulfamides et diaminopyrimidines .....	210
4.3.14.2	Résistance aux sulfamides et diaminopyrimidines .....	210
<b>5</b>	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>211</b>



## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Classification de Cierny et Mader d'après (13).....	22
Figure 2 : Infection d'une PTH droite de face montrant des lisérés clairs aux interfaces os/prothèse (flèches). ...	28
Figure 3 : Stratégie diagnostic en cas d'infection sur matériel, selon les recommandations de la SPLIF 2009. ....	29
Figure 4 : Principales stratégies médico-chirurgicales curatives dans les infections sur prothèse articulaire, d'après une communication orale de Florent Valour. ....	32
Figure 5 : Représentation des différentes étapes de la formation d'un biofilm d'après Lebeaux et Ghigo (113). ...	38
Figure 6 : Représentation des différents types de biofilm staphylococciques adaptée de Zapotoczna et al (138). ..	41
Figure 7 : Représentation schématique du PIA chez <i>S. epidermidis</i> d'après Rohde et al (146). ....	42
Figure 8 : Schéma illustrant la régulation de l'autolyse impliquée dans la formation de biofilm de <i>S. aureus</i> . ....	46
Figure 9 : photos d'une microplaque (à l'arrière) et du système Calgary (à l'avant). ....	48
Figure 10 : Protocole de la méthode BioFilm Ring Test®. ....	50
Figure 11 : Illustration des différents modèles de réacteurs rotatifs d'après (227,229): a) le réacteur rotatif annulaire ; b) le réacteur rotatif à disques ; c) le réacteur à cylindres concentriques ; d) le CDC biofilm reactor®. ....	52
Figure 12 : Adhésion et formation d'un biofilm de <i>S. aureus</i> sur du polystyrène observées par A) microscopie optique d'après (193); B) CLSM d'après (182); C) SEM d'après (193); D) AFM d'après (192). ....	54
Figure 13 : Radiographie d'une ostéomyélite chronique d'après une présentation du Dr. Faran Mahmood publié dans Health & Medicine, Technology. ....	58
Figure 14 : Impact de la formation d'un biofilm sur la réponse phagocytaire. D'après Costerton et al (74). ....	60
Figure 15 : Schéma de la catégorisation clinique en fonction des CMI et des diamètres d'inhibitions. ....	68
Figure 16 : Distribution internationale des CMI à l'oxacilline de <i>Staphylococcus aureus</i> d'après les données de l'EUCAST de janvier 2017. Exemple d'une distribution bimodale. <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> .....	69
Figure 17 : Antibiogramme d'une souche de <i>S. aureus</i> avec un phénotype MLSB inducible isolé au laboratoire en 2015. ....	71
Figure 18 : E-test céfoxitine d'une souche de <i>S. aureus</i> isolée au laboratoire en 2017. ....	72
Figure 19 : Photos des différents automates d'antibiogramme et leur support. ....	74
Figure 20 : Schéma de la mesure du temps pendant lequel la concentration sérique d'un antibiotique est supérieure à la CMI ( $T > CMI$ ). Exemple pour deux souches avec une CMI = 2 mg/mL ou CMI = 5 mg/mL pour une administration d'antibiotique journalière. ....	76
Figure 21 : Schéma de la mesure de l'aire sous la courbe de la concentration sérique d'un antibiotique divisée par la CMI (ASC/CMI). Exemple pour deux souches avec une CMI = 2 mg/mL ou CMI = 5 mg/mL pour une administration d'antibiotique journalière. ....	77

<i>Figure 22 : Schéma de la concentration de prévention des mutants résistants (CPM) pour une population bactérienne donnée.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 23 : Schéma de l'effet post-antibiotique (EPA). La population bactérienne contrôle (violet) a été diluée aux 1/1000 à t=1 h. La population bactérienne « orange » a été mise en contact avec un antibiotique à t=1 h. L'EPA correspond au délai entre les deux populations pour recroître d'un log.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 24 : Schéma de la détermination de CMEB via le système Calgary Biofilm Device. ....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 25 : Représentation des bactéries persistantes et de la tolérance bactérienne à un antibiotique.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 26 : Augmentation de l'adhésion d'une souche de S. hominis au contact de la rifampicine. D'après Christensen et al (116).....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 27 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice du biofilm (CMIb) via l'Antibiofilmogramme®. ....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 28 : Exemple du calcul de la différence relative d'un biofilm formé en présence de DNase pour une souche, reflétant le rôle de l'ADNe dans la formation du biofilm. ....</i>	<i>107</i>

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Recommandation de l'antibiothérapie des IOA à staphylocoques sensibles à la méticilline (SASM) selon (2,52) .....	34
Tableau 2 : Recommandation de l'antibiothérapie des IOA à staphylocoques résistant à la méticilline selon (2,52) .....	35
Tableau 3 : Résumé de l'activité des antibiotiques sur les staphylocoques d'après le rapport de l'ANSM .....	67
Tableau 4 : Effet bactéricides des principaux anti-staphylococciques .....	75
Tableau 5 : Liste des données bibliographiques ayant montré l'induction de la formation de biofilm staphylococciques en présence de concentrations sub-inhibitrices de différentes familles d'antibiotiques.....	89
Tableau 6 : Plan de la plaque Antibiofilmogramme® pour les IOA à staphylocoques représentant les concentrations d'antibiotiques testées. Les lignes rouges représentent les concentrations critiques définies selon les recommandations EUCAST-CASFM 2016.....	145
Tableau 7 : Répartition en pourcentage des résultats d'Antibiofilmogramme® obtenus sur la collection de 29 <i>S. aureus</i> d'IOA en fonction du plan de la plaque Antibiofilmogramme® pour les IOA. Les lignes rouges représentent les concentrations critiques définies selon les recommandations EUCAST-CASFM 2016. ....	145
Tableau 8 : Phénotypes de résistance des staphylocoques aux aminosides .....	204

## ABREVIATIONS

---

β-lactamines : Bêta-lactamines

ADEP : Acyldepsipeptide

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNe : Acide désoxyribonucléique extracellulaire

AFM : Atomic force microscopy

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ATP : Adénosine triphosphate

Bap : Biofilm-associated protein

BFI : Biofilm formation index

BGN: Bacille à Gram négatif

BRT : BioFilm Ring Test®

cBRT: Clinical BioFilm Ring Test®

CC : Complexe clonal

*C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*

CLSM : Confocal laser scanning microscopy

CMEB : Concentration minimale d'éradication du biofilm

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CNIL : Commission national de l'informatique et des libertés

CPP : Comité de protection des personnes

CRIOAC : Centre de référence inter-régional pour la prise en charge des Infections ostéo-articulaires complexes

DO : Densité optique

EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique

Fc : Fragment constant

FISH : *Fluorescence in situ hybridization*

GFP : *Green fluorescent protein*

IM : Intra-musculaire

IOA : Infection ostéo-articulaire

IV : Intraveineuse

IVSE : Intraveineuse à la seringue électrique

MSCRAMMs : *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

NEAT : Near iron transporter

*P. acnes* : *Propionibacterium acnes*

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

PBS : *Phosphate buffer saline* (Tampon phosphate salin)

PD : Pharmacodynamique

PIA : *Polysaccharide intercellular adhesin*

PK : Pharmacocinétique

PMMA : polyméthylméthacrylate

PNAG : Poly-N-acetyl glucosamine

PO : per os

PSM : Phenol-soluble modulín

RNAIII : Acide ribonucléique III

RR : Risque relatif

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SC : Sous-cutanée

SCV : *Small colony variant* (variant formant de petites colonies)

SCN : Staphylocoque à coagulase négatif

SERAM : Secretable expanded repertoire adhesive molecules

SEM : Scanning electron microscopy

TBK : *Tolerant-but-killable* (bactérie tolérantes mais pouvant être tuée)

VBNC : Viable but non culturable (Bactérie viable non cultivable)

---

# Travail Bibliographique

---

# **1 LES INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES**

## **1.1 Généralités**

Les infections ostéo-articulaires (IOA) se définissent par une invasion et une destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par un ou plusieurs micro-organismes. Le plus souvent d'origine bactérienne, ces infections regroupent un ensemble hétérogène de situations cliniques (1–4). Sont ainsi regroupées sous le terme d'IOA les arthrites septiques, les ostéomyélites aiguës, les ostéites chroniques, les spondylodiscites, ainsi que les infections sur matériel orthopédique (infection sur prothèse articulaire ou matériel d'ostéosynthèse). Avec une prévalence de 54,6 pour 100 000 habitants par an en France, cette pathologie grave est associée à un taux de mortalité de 4,6 %, mais surtout à des séquelles fonctionnelles dans près de 40 % des cas (5). En 2008, le total des coûts directs pour les séjours suite à une IOA s'élevait à 259 millions d'euros en France, sous-estimation probable puisque ce chiffre ne représente que les coûts directs d'hospitalisation de soins aigus et ne tient pas compte du coût global et sociétal (arrêt de travail, invalidité partielle ou totale, hospitalisation en service de soins de suite et de réadaptation). Une grande partie de ces IOA correspond à des infections post-chirurgicales après pose de prothèse se compliquant d'une infection du site opératoire dans 0,5 à 2 % des cas. Même si le risque d'infection est faible, le nombre de cas est amené à augmenter proportionnellement au nombre de poses de prothèse. En effet, le vieillissement de la population dans les pays développés, ainsi que les nouveaux modes de vie des seniors (voyages, sports, etc.), mais aussi des plus jeunes (sports extrêmes, motos, etc.), laisse présager une augmentation exponentielle du recours à l'implantation de matériel orthopédique, et donc de ce type d'infections (6,7).

La prise en charge de ces infections complexes nécessite des compétences pluridisciplinaires et donc un consortium regroupant médecins infectiologues, chirurgiens, anesthésistes, réanimateurs, rhumatologues, radiologues, rééducateurs et microbiologistes. C'est pourquoi en 2008, 9 centres de référence interrégionaux pour la prise en charge des Infections ostéo-articulaires complexes (CRIOAc) ont été créés en France sous l'impulsion du ministère de la Santé, dans le contexte du plan de lutte contre les infections nosocomiales. L'objectif a été d'améliorer l'orientation, la prise en charge et le traitement des patients, mais également de favoriser la recherche clinique et fondamentale dans ce domaine.

## 1.2 Classification

Du fait de la grande hétérogénéité clinique des IOA, plusieurs classifications ont été proposées, basées sur la localisation de l'infection, son origine, le délai d'évolution ou encore la présence ou non de matériel orthopédique (1–4).

### 1.2.1 Classification selon la localisation anatomique

L'arthrite septique correspond à une infection bactérienne touchant une ou plusieurs articulations (1,8,9). Le genou reste le site le plus fréquemment atteint, suivi de la hanche et de l'épaule. Il s'agit d'une urgence car, même si le siège premier de l'infection ne concerne que le liquide articulaire, l'infection peut rapidement s'étendre, entraînant une destruction irréversible de l'ensemble de l'articulation avec un risque de séquelles fonctionnelles majeur.

L'ostéomyélite est un trouble inflammatoire dû à une infection entraînant une nécrose et une destruction d'un tissu osseux (3,10–12). Elle peut survenir à tout âge et toucher n'importe quel os. L'infection peut se limiter à une portion restreinte de l'os ou toucher à la fois la moelle, le cortex, le périoste ou les tissus mous environnants. *Cierny et Mader* ont proposé une classification pour le traitement de ces infections en fonction du stade anatomique et de l'état physiologique du patient (13).





Stades anatomiques			
	<p><b>Stade 1</b> : ostéomyélite intramédullaire, nécrose limitée à la médullaire</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Étiologie : hématogène</li> </ul> <p>Traitement : antibiotique, drainage chirurgical</p>		
	<p><b>Stade 2</b> : ostéomyélite superficielle, nécrose à la surface exposée</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Étiologie : infection de contiguïté</li> </ul> <p>Traitement : antibiotique, débridement superficiel, couverture</p>		
	<p><b>Stade 3</b> : ostéomyélite localisée (séquestre cortical), nécrose bien individualisable, atteinte localisée de la corticale, instabilité osseuse avant ou après débridement</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Étiologie : traumatisme, évolution de stade 1 ou 2, iatrogène (vis, plaque)</li> </ul> <p>Traitement : antibiotique, débridement, séquestrectomie immobilisation ± greffe osseuse</p>		
	<p><b>Stade 4</b> : ostéomyélite diffuse, atteinte circonférentielle de la corticale, instabilité osseuse avant ou après débridement</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Étiologie : traumatisme, évolution de stade 1-2 ou 3, iatrogène (clou)</li> </ul> <p>Traitement : antibiotique, débridement, séquestrectomie ± greffe osseuse stabilisation (ORIF, fixateur externe [Ilizarov], amputation)</p>		
État physiopathologique			
<p><b>A</b> : Absence d'anomalie</p> <p><b>B</b> : Anomalies</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p><b>Bs : généralisées</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dénutrition</li> <li>- insuffisance hépatique et/ou rénale</li> <li>- diabète</li> <li>- hypoxémie chronique</li> <li>- maladie auto-immune</li> <li>- néoplasie</li> <li>- immunodéprimé ou immunosuppresseurs</li> <li>- extrémité des âges de la vie</li> <li>- tabagisme</li> </ul> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p><b>B1 : localisées</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- lymphœdème chronique</li> <li>- insuffisance veineuse</li> <li>- fibrose postradique</li> <li>- escarre</li> <li>- neuropathie</li> </ul> </td> </tr> </table> <p><b>C</b> : État général précaire</p>		<p><b>Bs : généralisées</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dénutrition</li> <li>- insuffisance hépatique et/ou rénale</li> <li>- diabète</li> <li>- hypoxémie chronique</li> <li>- maladie auto-immune</li> <li>- néoplasie</li> <li>- immunodéprimé ou immunosuppresseurs</li> <li>- extrémité des âges de la vie</li> <li>- tabagisme</li> </ul>	<p><b>B1 : localisées</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- lymphœdème chronique</li> <li>- insuffisance veineuse</li> <li>- fibrose postradique</li> <li>- escarre</li> <li>- neuropathie</li> </ul>
<p><b>Bs : généralisées</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dénutrition</li> <li>- insuffisance hépatique et/ou rénale</li> <li>- diabète</li> <li>- hypoxémie chronique</li> <li>- maladie auto-immune</li> <li>- néoplasie</li> <li>- immunodéprimé ou immunosuppresseurs</li> <li>- extrémité des âges de la vie</li> <li>- tabagisme</li> </ul>	<p><b>B1 : localisées</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- lymphœdème chronique</li> <li>- insuffisance veineuse</li> <li>- fibrose postradique</li> <li>- escarre</li> <li>- neuropathie</li> </ul>		

Figure 1 : Classification de Cierny et Mader d'après (13).

Enfin, la spondylodiscite correspond à une infection d'un disque intervertébral et des corps vertébraux adjacents par un micro-organisme (2,14). Il s'agit d'une urgence diagnostique et thérapeutique pouvant entraîner des déformations (gibbosités), des compressions radiculo-médullaires, et une cachexie. Le rachis lombaire est le site le plus souvent touché, suivi des vertèbres thoraciques et cervicales (15).



### 1.2.1 Classification en fonction du matériel orthopédique

Les IOA sur matériel regroupent les infections sur prothèse (majoritairement de hanche, genou ou coude) et sur matériel d'ostéosynthèse (vis, clous et plaques).

La présence de matériel augmente le risque d'infection par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, l'absence de microcirculation au niveau du matériel diminue l'efficacité du système immunitaire et la libération locale des antibiotiques. Ensuite, l'interaction d'un matériel étranger avec les polynucléaires neutrophiles induit une libération de peptides neutrophiles empêchant localement la phagocytose (16). Enfin, la présence de matériel offre une surface sur laquelle les bactéries vont pouvoir adhérer puis former un biofilm (17). Ces différents facteurs réduisent de façon importante la taille de l'inoculum bactérien requis pour induire une infection (18). Le risque de greffe sur prothèse en cas de bactériémie à *S. aureus* est très important, estimé entre 30 % et 40 % des cas selon les études contre 1-2 % pour les autres espèces bactériennes (19–22). Il est rattaché à l'affinité importante de *S. aureus* pour le tissu osseux et les protéines de la matrice recouvrant le matériel, notamment grâce à ces adhésines (voir 2.2.1 Adhésion). Le risque d'infection ne se limite donc pas au bloc opératoire, mais peut avoir lieu tout au long de la vie des patients porteurs de prothèses.

### 1.2.2 Classification selon le délai d'évolution

La durée d'évolution des IOA est un élément important qui impacte de façon majeure la prise en charge de ces infections. Classiquement, les IOA se définissent comme aiguës (délai d'évolution inférieur à 3 semaines entre l'inoculation bactérienne et la prise en charge) ou chroniques (délai d'évolution supérieur à 3 semaines), même si les périodes d'évolution retenues par les différents auteurs peuvent varier selon les études (23,24).

Les infections aiguës sont généralement bruyantes et se présentent sous la forme de signes cliniques importants, d'une inflammation au niveau local (douleur, rougeur, chaleur) et/ou général (fièvre, syndrome inflammatoire biologique). À l'inverse, les infections chroniques évoluent souvent à bas bruit, et sont associées à la présence de fistules, de lésions osseuses radiologiques et de séquestres osseux, zones de tissus osseux nécrotiques inaccessibles à l'action des antibiotiques et du système immunitaire de l'hôte. De plus, les infections chroniques sont associées à la présence de biofilm qui se définit comme une communauté bactérienne adhérant à une surface et enchâssée dans une matrice extracellulaire autoproduite, protégeant les bactéries des antibiotiques et de l'action du système immunitaire. Tous ces éléments rendent le diagnostic et le traitement des infections

chroniques complexe. Au final, la démarcation entre l'infection aiguë et l'infection chronique reste parfois difficile à préciser et objectiver; il s'agit d'une évolution d'une forme vers l'autre. Il est important de garder en tête que le délai au-delà duquel une infection sur matériel devient chronique reste une question non définitivement résolue, demeure l'objet de nombreux travaux et est vraisemblablement variable selon les situations.

Les IOA sur matériel orthopédique peuvent également être classées en fonction du délai entre le diagnostic et la mise en place chirurgicale du matériel. Ce classement reste très débattu et plusieurs délais sont proposés dans la littérature. On définit généralement les infections comme précoces (délai inférieur à 1 ou 3 mois entre la pose du matériel et le diagnostic selon les études), retardées (entre le 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> ou 24<sup>ème</sup> mois), ou tardives (après le 6<sup>ème</sup> ou 24<sup>ème</sup> mois) (25–27). Cette classification permet d'orienter le diagnostic et la porte d'entrée du micro-organisme. En effet, les infections précoces sont le plus souvent liées à une inoculation *per* opératoire de germes virulents de type *S. aureus* ou bacille à Gram négatif (BGN). Les infections retardées sont liées également à une inoculation *per* opératoire mais de germes moins virulents tels que les staphylocoques à coagulase négative (SCN) et *Cutibacterium/Propionibacterium acnes*. Enfin, les infections tardives sont généralement d'origine hématogène.

## 1.3 Épidémiologie

### 1.3.1 Données démographiques

Il existe peu d'études ayant évalué l'incidence globale des IOA, la littérature se limitant en général à quelques hôpitaux dans un pays ou une région. En France, chaque séjour hospitalier est enregistré dans la base nationale médico-administrative du programme médicalisé des systèmes d'information (PMSI), permettant une estimation globale de l'incidence des IOA. En 2013, *Grammatico-Guillon et al* ont publié une analyse des données de 2008 (5). Dans cette étude, 36 091 cas d'IOA ont été répertoriés sur les 16 millions de séjours hospitaliers annuels en France en 2008, correspondant à une prévalence globale de 54,6 /100 000 habitants. La majorité des cas concernaient des arthrites septiques (52 %), suivies par les ostéomyélites (34 %), les spondylodiscites (10 %) et les IOA non précisés (4 %). Les hommes apparaissaient plus touchés que les femmes (sexe-ratio H/F = 1,54) et l'âge moyen était de 63,1 ans. La moitié des patients présentaient au moins une comorbidité, les plus prévalentes étant le diabète, les troubles vasculaires périphériques et les affections des parties molles. Enfin, le taux de létalité était estimé à 4,6 %.

Un tiers des cas concernaient des infections sur matériel, dont 58 % sur prothèse articulaire. Dans ce type d'infection, le sex-ratio était plus équilibré, la fréquence était plus élevée chez les personnes obèses et les patients de plus de 65 ans.

### 1.3.2 Prévalence des différentes espèces bactériennes

La distribution des étiologies bactériennes des IOA varie en fonction du type d'infection, de la zone géographique et de l'âge des patients. Le genre *Staphylococcus* reste le plus prévalent, suivi des BGN (5,8,15,28–30). Ainsi, en fonction des études et du type de populations étudiées, *S. aureus* est responsable de 30 à 80 % des IOA, et de 12 à 25 % des infections sur matériel. Les SCN représentent entre 5 et 17 % des IOA, mais 25 à 40 % des infections sur matériel. Les BGN sont eux retrouvés dans 10 à 30 % des IOA, et 3 à 17 % des infections sur matériel. Les streptocoques et entérocoques représentent pour leur part entre 10 et 20 % des IOA, et sont majoritairement associés à des portes d'entrée dentaires et digestives. La grande majorité des infections sont monomicrobiennes (44 à 90 % des cas).

Il n'est pas étonnant de retrouver les staphylocoques comme agent étiologique principal de ces infections en raison du portage asymptomatique chez l'homme. En effet, les SCN sont présents au niveau de la peau et des muqueuses de l'ensemble de la population. *S. aureus* est, quant à lui, présent au niveau nasal de façon permanente chez 20 % de la population, et de façon intermittente chez 30 à 60 % de la population (31,32). Les raisons expliquant ce niveau élevé de portage ne sont pas encore totalement connues, même si les facteurs de l'hôte semblent jouer un rôle important comme l'ont montré *Jan Nouwen et al* sur un modèle humain de portage nasal (33). Plusieurs études ont mis en avant l'intérêt de détecter et de décoloniser les patients porteurs avant un acte chirurgical en orthopédie, afin de diminuer le risque d'infection staphylococcique post-chirurgicale (34,35).

## 1.4 Diagnostic

### 1.4.1 Clinique

Le diagnostic est une étape clef dans la prise en charge des IOA. Un diagnostic précoce est associé à un taux de succès du traitement significativement augmenté. Cependant, du point de vue clinique, la grande variabilité des symptômes et leur manque de spécificité peuvent rendre le diagnostic complexe.

Les IOA se manifestent généralement par la présence de fièvre, de douleurs associées à une raideur locale et une impotence fonctionnelle, ainsi qu'à des signes inflammatoires locaux (1–4). En présence de matériel, l'existence d'une fistule à proximité et/ou la présence d'un sepsis en l'absence d'un autre point d'appel infectieux évoque une infection. Dans les mois suivant la mise en place d'une prothèse, une anomalie de la cicatrisation (écoulement purulent de la plaie opératoire, désunion ou nécrose ou inflammation cicatricielle) ainsi que des douleurs anormales sont les signes d'une infection probable (36). Les spondylodiscites sont associées à des douleurs dorsales et des troubles neurologiques dans un tiers des cas (pertes sensorielles, faiblesse, radiculopathie) (14).

Dans certaines situations, l'absence de fièvre (pouvant représenter jusqu'à 50 % des cas) et de signes inflammatoires locaux, notamment pour les infections chroniques, complique le diagnostic. Il est alors nécessaire de rechercher d'autres éléments (critères biologiques ou d'imagerie) permettant de différencier une infection d'un simplement descellement mécanique ou de l'usure de la prothèse.

#### **1.4.2 Microbiologique**

Les prélèvements microbiologiques sont indispensables pour confirmer l'infection et adapter l'antibiothérapie. Plusieurs recommandations existent (37,38). Les recommandations françaises (publiées dans le cadre du Référentiel de Microbiologie, par la Société Française de Microbiologie, et des recommandations de pratique clinique sur les "Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéosynthèse)") concernant la réalisation et la prise en charge des prélèvements indiquent qu'ils doivent être réalisés, dans la mesure du possible, au moins 15 jours après l'arrêt de toute antibiothérapie, et doivent arriver stérilement et dans les meilleurs délais au laboratoire (39). Lors d'un acte chirurgical, il est recommandé de réaliser 5 prélèvements (au minimum 3 prélèvements) au niveau de zones macroscopiquement pathologiques (un nombre inférieur risquant de provoquer des difficultés d'interprétation et un nombre supérieur engendrant une surcharge de travail pour le laboratoire de bactériologie sans preuve d'amélioration de la sensibilité de l'examen). Ces prélèvements peuvent être liquides (pus, liquide articulaire) ou solides (tissus de granulation, tissus osseux, tissus d'interposition et tout tissu paraissant suspect). Le matériel d'ostéosynthèse ou les prothèses peuvent également être adressés au laboratoire afin de rechercher, après sonication, la présence de bactéries (40).

En cas de fièvre et de signes généraux, des hémocultures peuvent également être réalisées, permettant un diagnostic pour 50 % des IOA aigus. Une ponction du liquide articulaire permet

d'obtenir un résultat positif dans 50 % des cas (41). Une biopsie au True-cut est également possible s'il n'existe qu'un tissu de granulation sans élément liquidien (42).

Les prélèvements arrivant au laboratoire doivent êtreensemencés sur plusieurs milieux riches solides et liquides et conservés en culture de manière prolongée (14 jours) afin d'identifier les germes à croissance lente (43). Une analyse histologique des biopsies doit également être réalisée afin de mettre en évidence les signes d'inflammation tissulaire, notamment les leucocytes, les plasmocytes et les polynucléaires neutrophiles (44,45). Une approche moléculaire (PCR universelle ou spécifiques) peut aider au diagnostic en cas de négativité des résultats de culture (46).

Au final, le diagnostic de l'IOA repose sur la présence i) d'un prélèvement positif à une bactérie n'appartenant pas à la flore commensale cutanée (*S. aureus*, entérobactérie ou *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) par exemple) en présence d'une suspicion clinique, ou ii) de deux cultures positives si le germe appartient à la flore commensale cutanée et peut potentiellement être un contaminant (SCN, *P. acnes*, corynébactérie, etc.).

### 1.4.3 Imagerie

Une grande variété de méthodes d'imagerie est aujourd'hui disponible et permet d'orienter le diagnostic. Simple et peu coûteuse, une radiographie standard devra toujours être réalisée quel que soit l'IOA dès le début de la prise en charge. Sa sensibilité varie de 43 à 75 % et sa spécificité de 75 à 83 % en fonction notamment de l'ancienneté de l'infection et de la localisation (3,4,8–11,14,47). L'IRM est une méthode sensible, notamment pour le diagnostic précoce, permettant de mettre en évidence l'état des parties molles adjacentes, la présence d'abcès et une inflammation, mais peut être contre-indiquée par certains matériaux. L'échographie permet le diagnostic d'un épanchement articulaire ou d'un abcès et éventuellement d'en guider la ponction. Le scanner permet, lui, une analyse fine des structures osseuses. Enfin, l'imagerie fonctionnelle peut apporter une aide appréciable avec notamment la scintigraphie osseuse à l'Hydroxy-Méthyl-Diphosphonate (HMDP) marqué au Technétium 99 traduisant l'activité ostéoblastique (avec 3 temps successifs : vasculaire, tissulaire et osseux plus tardif) et la scintigraphie aux leucocytes marqués (principalement polynucléaires marqués à l'indium 111) (48,49).

Concernant les infections sur implants, la place de l'imagerie dépend du délai de mise en place du matériel. Une infection précoce ou hémotogène limite les performances des examens. Dans tous les cas, une radiographie standard est recommandée même si la sensibilité n'est que de 50 % (50,51).

Les signes reflétant une infection sont la présence d'un séquestre, un liseré clair et étendu autour du matériel ainsi qu'une zone d'ostéolyse (figure 2). En cas de doute diagnostique, d'autres examens peuvent être utilisés.



**Figure 2 : Infection d'une PTH droite de face montrant des liserés clairs aux interfaces os/prothèse (flèches).**

Le scanner permet d'évaluer les signes tomodensitométriques d'une infection de prothèse (présence d'appositions périostées et anomalies des tissus mous (faible sensibilité mais spécificité de 100 % et 87 % respectivement)), ostéolyses et collections non hématiques dans les parties molles) mais peut être artéfacté du fait du matériel (48,49). En cas d'infection sur matériel rachidien, l'IRM est recommandée (50). En cas de résultats négatifs, l'imagerie fonctionnelle peut aider au diagnostic. Une scintigraphie osseuse à HMDP couplée à une scintigraphie au Gallium 67 en cas d'infection sur rachis permet d'infirmer une infection (valeur prédictive négative proche de 100 %) (44,51). Cependant, ces examens ne sont pas spécifiques en post-opératoire immédiat en raison de l'inflammation tissulaire induite par le matériel lui-même. Un délai d'au moins 6 mois est recommandé entre chirurgie et imagerie. La stratégie diagnostique d'une IOA sur matériel est résumée dans la figure 3.

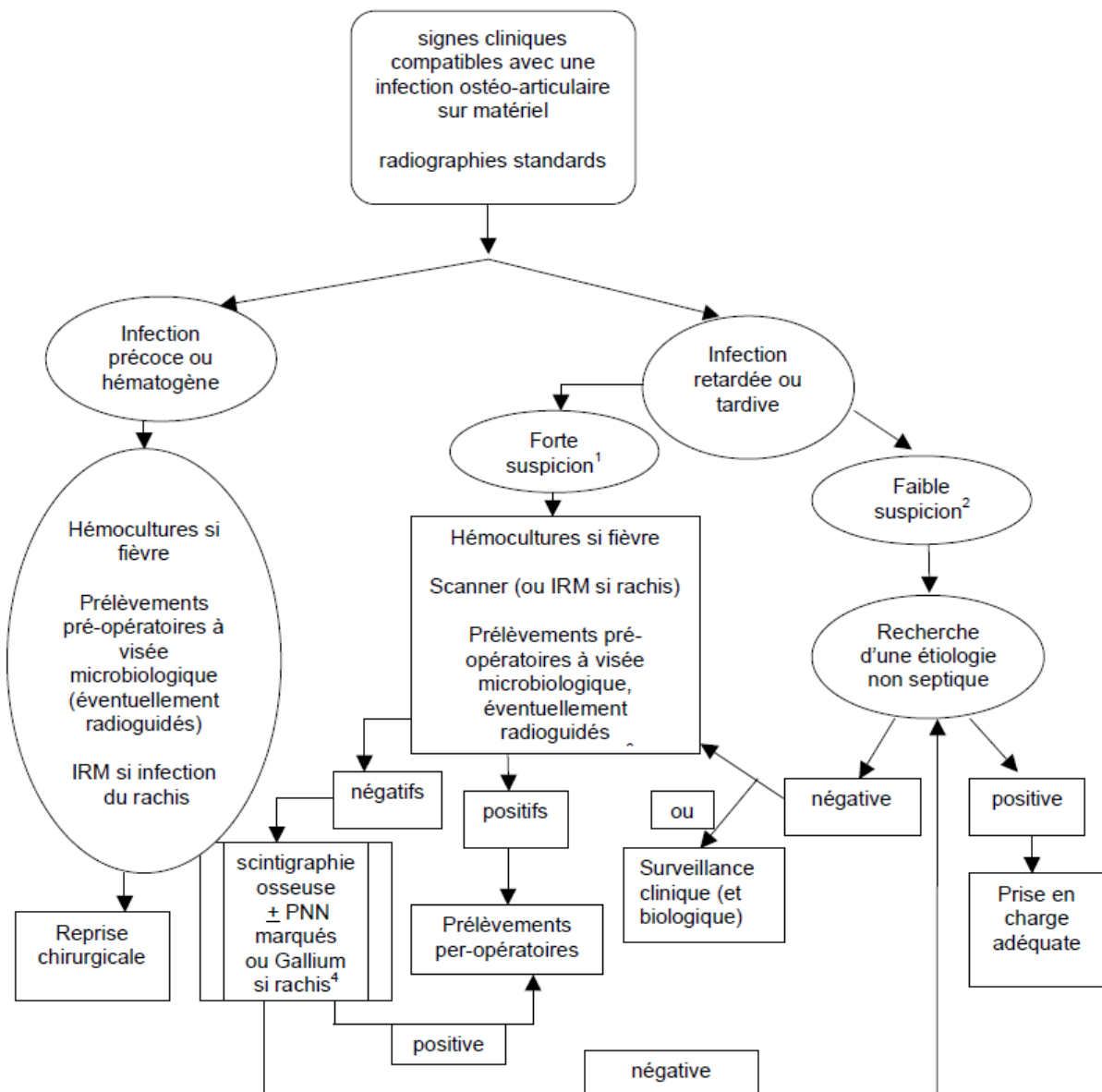


Figure 3 : Stratégie diagnostic en cas d'infection sur matériel, selon les recommandations de la SPLIF 2009.

## 1.5 Prise en charge

La prise en charge des IOA est complexe et nécessite dans la grande majorité des cas un acte chirurgical associé à une antibiothérapie longue et initialement intraveineuse (IV). En l'absence d'études randomisées multicentriques incluant un nombre suffisant de patients, les prises en charge actuelles reposent principalement sur les recommandations de bonnes pratiques françaises et

internationales (1–4,25,26,52), basées sur des avis d'experts. Des réunions de concertation pluridisciplinaires ont été mises en place dans les CRIOAc pour faciliter les décisions thérapeutiques.

### 1.5.1 Traitement chirurgical

L'acte chirurgical a plusieurs objectifs : i) diminuer drastiquement l'inoculum bactérien, prérequis indispensable au succès de l'antibiothérapie ; ii) réaliser les prélèvements microbiologiques profonds indispensables à l'isolement et à l'identification du ou des agent(s) étiologique(s) ; iii) retirer les tissus osseux et tissus mous nécrosés et/ou le matériel afin d'augmenter les taux de succès thérapeutique.

**Dans le cas de l'ostéite chronique**, un traitement chirurgical est indispensable pour éradiquer l'infection (12). L'obtention d'un environnement viable et vascularisé obtenu après un débridement radical (élimination des tissus nécrosés et séquestres) est nécessaire (53,54). La présence de matériel d'ostéosynthèse doit conduire à l'ablation totale de ce dernier. La stabilisation des lésions osseuses non consolidées pourra se faire via un fixateur externe.

La prise en charge d'une **arthrite septique** nécessite généralement le retrait des tissus purulents, que ce soit par ponction ou par un lavage chirurgical par arthroscopie le plus souvent, ou arthrotomie si elle est associée à une ostéite (9,55,56).

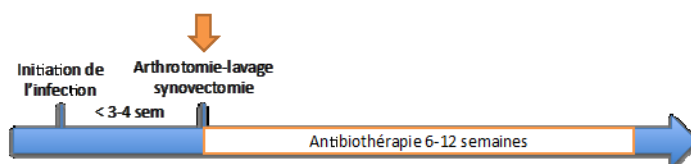
Concernant les **spondylodiscites**, la chirurgie n'est recommandée qu'en cas d'échec de l'antibiothérapie, à des fins de diagnostic ou dans les cas de complications locales graves (14). L'objectif est alors de lever la compression de la moelle épinière ou de drainer les abcès épiduraux ou paravertébraux. Cependant, en cas d'infection rachidienne sur matériel d'ostéosynthèse, une reprise chirurgicale est indispensable pour le lavage ou le retrait du matériel (57). En effet, la rétention de l'implant, notamment pour les infections tardives, est associée à des échecs de traitement.

**L'infection sur prothèse articulaire** nécessite quant à elle un geste chirurgical systématique. Dans le cadre d'une infection aiguë (infection post-opératoire précoce, prise en charge moins de 15 jours après la mise en place (pouvant aller jusqu'à 3-4 semaines selon les recommandations), ou infection aiguë hémotogène sans descellement), une **synovectomie-lavage avec conservation du matériel** peut être envisagée, son efficacité étant corrélée à sa précocité (52,58). Les facteurs de risques d'échec d'un tel traitement conservateur à prendre en considération sont liés aux comorbidités (diabète, immunodépression, polyarthrite rhumatoïde), à la présence d'une fistule et à l'isolement de *S. aureus* (59,60). Les taux d'échecs peuvent alors être importants, entre 30 % et 80 % selon les études (59,61,62). À l'inverse, un implant stable, des tissus osseux peu endommagés et la



disponibilité d'une antibiothérapie à bonne diffusion osseuse sont autant de facteurs associés au succès du traitement (24). Dans tous les autres cas, **l'ablation de la prothèse infectée est indispensable** pour espérer une guérison. Un changement en un temps peut être envisagé si i) le germe responsable est connu avant (ponction préopératoire, pour pouvoir disposer d'emblée d'une antibiothérapie ciblée); ii) il existe une perte osseuse modérée; iii) les tissus mous sont peu endommagés (notamment en l'absence de fistule), ne nécessitant pas de geste de couverture (lambeau); iv) en absence de comorbidités sévères; et v) en absence de germes multi-résistants et/ou difficiles à traiter (SARM, entérocoque, BGN non fermentant, et levures). Les taux de succès varient alors entre 92 et 100 % (63,64). En l'absence de l'ensemble de ces critères, et si le patient peut subir deux interventions, les recommandations françaises et nord-américaines préconisent un changement en deux temps. Le taux de succès est alors supérieur à 90 % (65–67). Le délai entre les deux interventions est variable. En l'absence de facteur de mauvais pronostic et de nécessité de lambeau de couverture, une stratégie en « 2 temps courts » est généralement proposée, avec une réimplantation de la prothèse sous antibiothérapie 2 à 6 semaines après l'explantation. En cas de « 2 temps long », l'antibiothérapie est poursuivie pour une durée de 3 mois après l'explantation, visant à éradiquer l'infection avant le deuxième temps de repose. Ce dernier est programmé après une fenêtre thérapeutique d'au moins 2 semaines, de nouveaux prélèvements sont réalisés, et l'antibiothérapie reprise en post-opératoire est définitivement interrompue s'ils sont négatifs. Un "spacer" en ciment, le plus souvent imprégné d'antibiotique, peut être mis en place entre les deux interventions afin de faciliter la repose du matériel, de délivrer une forte dose d'antibiotique *in situ* et d'améliorer le confort des patients. Cependant, la présence de ce matériel pourrait être associée à un risque de persistance de l'infection en offrant une surface sur laquelle les microorganismes peuvent adhérer, et pourrait également favoriser l'émergence de souches résistantes et de « variant formant de petite colonies » (de l'anglais « Small Colony Variants », SCV) lié au gradient de concentration créé par la diffusion de l'antibiotique (68–70). Enfin, pour les cas les plus complexes pour lesquels le risque d'échec est majeur, l'ablation définitive du matériel avec arthrolyse ou l'amputation peuvent être envisagées (71–73). Dans les cas où le traitement chirurgical ne peut être optimal (infection chronique avec matériel non retirable pour des raisons techniques ou patient ne pouvant pas subir d'interventions chirurgicales complexes), une antibiothérapie suppressive est envisageable. L'objectif est alors le contrôle des manifestations cliniques et non l'éradication de l'infection.

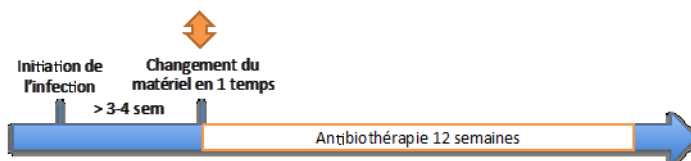
### SEPSIS AIGU SUR PROTHÈSE ARTICULAIRE : TRAITEMENT CONSERVATEUR



### SEPSIS CHRONIQUE SUR PROTHÈSE ARTICULAIRE : ABLATION DES IMPLANTS

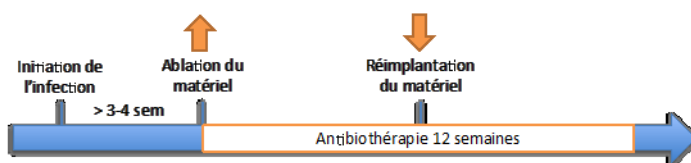
#### 1 temps

- Bactérie connue en pré-opératoire
- Bon état des tissus osseux et péri-prothétiques
- Absence de germe multi-résistant ou difficile à traiter (SARM, Candida)



#### 2 temps « court »

- Bonne évolution clinique
- Pas de nécessité de lambeau de couverture
- Absence Candida



#### 2 temps « long »

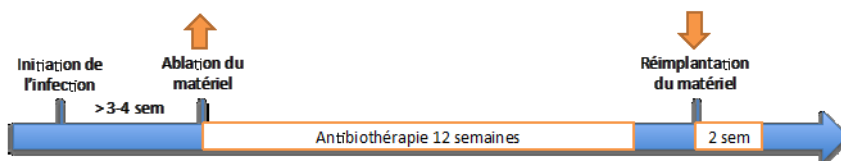


Figure 4 : Principales stratégies médico-chirurgicales curatives dans les infections sur prothèse articulaire, d'après une communication orale de Florent Valour.

### 1.5.2 Antibiothérapie

À la prise en charge chirurgicale d'une IOA s'ajoute systématiquement une antibiothérapie longue et initialement par voie IV. La sensibilité des germes aux antibiotiques n'est pas suffisante pour prédire le succès du traitement de ces infections. En effet, d'autres critères comme la faible diffusion osseuse de certaines molécules, la présence de biofilm bactérien, l'internalisation de certains microorganismes au sein des cellules et la formation de SCV diminuent drastiquement l'efficacité thérapeutique de ces molécules (74,75).

Du fait de l'importante hétérogénéité des IOA et de la multiplicité des facteurs pronostiques (liés au patient, au germe, à la prise en charge chirurgicale et à l'antibiothérapie), le choix de l'antibiothérapie optimale ne peut actuellement s'appuyer sur aucune étude randomisée, mais

repose sur des travaux prospectifs ou rétrospectifs, le plus souvent descriptifs et de faible puissance, regroupées dans des méta-analyses récentes (76,77).

La prescription de l'antibiothérapie pour les IOA sur matériel doit si possible débiter en association (notamment pour les infections staphylococciques), avec des molécules permettant d'obtenir des concentrations plasmatiques élevées et ayant une bonne diffusion osseuse. En cas de sepsis, l'antibiothérapie est généralement démarrée de façon probabiliste après prélèvements microbiologiques. La voie d'administration initiale est généralement parentérale pour une durée de 15 jours. Un relai per os peut alors être envisagé si des molécules à forte biodisponibilité, sans intolérance digestive ni interaction médicamenteuse peuvent être utilisées sur le germe impliqué (24). En cas d'impossibilité de relai oral, un cathéter central ou un dispositif implantable peut permettre la continuité du traitement en ambulatoire (78). En cas de traitement conservateur ou de changement en 1 temps, l'utilisation d'antibiotiques actifs sur les bactéries en biofilm, ou plus généralement sur les bactéries avec une croissance ralentie, doit être privilégiée. Dans ce contexte, la rifampicine a démontré son efficacité pour les infections staphylococciques (79–81). Cette molécule ne doit toutefois jamais être utilisée en monothérapie en raison d'un risque d'acquisition rapide de résistances par mutations chez les staphylocoques. Une association avec une molécule bactéricide à bonne diffusion osseuse comme les fluoroquinolones est particulièrement recherchée (82). D'autres molécules peuvent également être combinées, comme les bêta-lactamines sur les souches sensibles à la méticilline, les glycopeptides, la clindamycine ou le linézolide (52). Cependant, la rifampicine diminue de moitié les concentrations plasmatiques de la clindamycine, des sous-dosages pouvant alors avoir lieu (83). Concernant les autres agents bactériens responsables d'IOA, en cas d'infections à streptocoques ou entérocoques, l'amoxicilline reste la molécule de choix et peut être combinée avec la gentamicine ou la rifampicine. Pour les infections à BGN, l'antibiothérapie repose initialement sur une bêta-lactamine choisie selon le profil de sensibilité du germe. Toutefois, l'utilisation secondaire d'une fluoroquinolone semble bénéfique, au même titre que la rifampicine sur les staphylocoques (84). Enfin, en cas d'infections à bactéries anaérobies, l'absence de données de la littérature ne permet pas d'avoir de recommandations sauf en cas d'IOA à *Cutibacterium/Propionibacterium acnes* où l'amoxicilline, la clindamycine, la céfazoline ou la ceftriaxone peuvent être utilisés (85).

La durée de traitement est également débattue, habituellement de 6 à 12 semaines. Toutefois, les deux méta-analyses sus-citées n'ont pu mettre en évidence de durée optimale de traitement dans les

IOA. Récemment, un essai clinique randomisé a été publié, permettant de réduire à 6 semaines la durée de traitement des spondylodiscites sans matériel, dans les cas les moins complexes (86). Un essai clinique randomisé est en court de réalisation par la même équipe et vise à comparer 6 versus 12 semaines de traitement dans les infections aiguës sur prothèse articulaire (étude DATIPO).

Recommandations	Molécules	Posologie	Voie	Durée
<b>SASM</b>	Oxacilline / Cloxacilline ou Céfazoline ou Clindamycine ou Vancomycine ou Teicoplanine	100-200 mg/kg/j 60-80 mg/kg/j 3-4 x 600 mg/j 40-60 mg/kg/j 12 mg/kg/12 h 3-5j puis 12 mg/kg/j	IV IV IV, PO IVSE IV, IM, SC	2 semaines de traitement en IV
<b>Infections ostéo-articulaires sur matériel</b>	+ Gentamicine ou Rifampicine ou Acide fusidique	3-4 mg/kg/j 20 mg/kg/j 2x 1500 mg/j	IV IV, PO IV, PO	
<b>SPLIF</b>	Rifampicine ou Acide fusidique + Ofloxacine ou Péfloxacine ou Ciprofloxacine ou Lévofloxacine ou Clindamycine	20 mg/kg/j 3 x 500 mg/j 2-3 x 200 mg/j 2 x 400 mg/j 2-3 x 750 mg/j 1 x 500-750 mg/j 3-4 x 600 mg/j	PO PO PO PO PO PO	Relais par voie orale : 6 semaines minimum
	<b>OU</b> Rifampicine + Cotrimoxazole	20 mg/kg/j 3 200 / 640 mg/j	PO PO	
<b>Diagnostic et management des infections sur prothèse articulaires</b>	Nafcilline ou Cefazoline ou Ceftriaxone ou Vancomycine ou Daptomycine ou Linézolide + Rifampicine	1,5-2 g / 4-6 h 1-2 g / 8 h 1-2 g / j 15 mg/kg/12 h 6 mg/kg/24 h 600 mg/12 h 2 x 300-450 mg/j	IV IV IV IV IV IV, PO PO	2-6 semaines de traitement en IV
<b>IDSA</b>	Rifampicine + Quinolones ou traitement alternatif : cotrimoxazole, minocycline, doxycycline, céphalexine, dicloxacilline	2 x 300-450 mg/j	PO	Relais par voie orale : 6 mois pour une PTG et 3 mois pour les autres prothèses

Tableau 1 : Recommandation de l'antibiothérapie des IOA à staphylocoques sensibles à la méticilline (SASM) selon (2,52)

Recommandations	Molécules	Posologie	Voie	Durée
<b>SARM</b>	Vancomycine ou Teicoplanine	40-60 mg/kg/j 12 mg/kg/12 h 3-5j puis 12 mg/kg/j	IVSE IV, IM, SC	2 semaines de traitement en IV
	+ Rifampicine ou Acide fusidique ou Fosfomycine ou Doxycycline	20 mg/kg/j 2x 1500 mg/j 3-4 x 150-200 mg/kg 2 x 200 mg	IV, PO IV, PO IV IV	
	<b>OU</b>			
<b>Infections ostéo-articulaires sur matériel</b>	Clindamycine + Gentamicine	3-4 x 600 mg/j 3-4 mg/kg/j	IV, PO IV	(5-7 jours)
	<b>PUIS</b>			
<b>SPLIF</b>	Clindamycine + Rifampicine	3-4 x 600 mg/j 20 mg/kg/j	IV, PO IV, PO	
	Rifampicine + Acide fusidique ou Clindamycine ou Cotrimoxazole ou Minocycline ou Doxycycline ou Linézolide	20 mg/kg/j 2x 1500 mg/j 3-4 x 600 mg/j 2 x 3 200 mg 2 x 200 mg 2 x 200 mg 2 x 1200 mg	PO PO PO PO PO PO	Relais par voie orale : 6 semaines minimum
<b>Diagnostic et management des infections sur prothèse articulaires</b>	Vancomycine ou Daptomycine ou Linézolide + Rifampicine	15 mg/kg/12 h 6 mg/kg/24 h 600 mg/12 h 2 x 300-450 mg/j	IV IV IV, PO PO	2-6 semaines de traitement en IV
<b>IDSA</b>	Rifampicine + Quinolones ou traitement alternatif : cotrimoxazole, minocycline, doxycycline, céphalexine, dicloxacilline	2 x 300-450 mg/j	PO	Relais par voie orale : 6 mois pour une PTG et 3 mois pour les autres prothèses

Tableau 2 : Recommandation de l'antibiothérapie des IOA à staphylocoques résistant à la méticilline selon (2,52)

En cas d'IOA aiguë sans matériel, une monothérapie est généralement suffisante pour éradiquer l'infection (12). La durée du traitement est de 4 à 6 semaines avec un relais *per os* si possible selon les mêmes critères que pour les IOA sur matériel. En cas d'infection à *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM), l'oxacilline et la cloxacilline restent le traitement de référence. La diffusion osseuse étant médiocre, de l'ordre de 10 % de la concentration plasmatique, des posologies élevées sont donc nécessaires (87). En cas d'infection à SARM, les bêta-lactamines ne sont pas efficaces, en dehors des nouvelles céphalosporines anti-SARM (ceftaroline, ceftobiprole), n'ayant pas l'AMM dans cette indication. Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) constituent alors le traitement recommandé en première ligne. Leur pénétration osseuse est variable d'une étude à l'autre, compris entre 5 et 87 % de la concentration plasmatique (88,89). Ils ne doivent cependant pas être préférés aux bêta-lactamines en cas d'infection avec un SASM, des études ayant démontré qu'il s'agissait d'un facteur de risque d'échec de traitement (90–92). Une alternative est actuellement représentée par la daptomycine, n'ayant pas l'AMM dans le traitement des IOA, mais dont l'utilisation est appuyée par un nombre croissant d'études (93,94). Les autres alternatives de traitements sont représentées par le linézolide, les céphalosporines anti-SARM ou encore la tigécycline. Concernant les autres agents bactériens responsables d'IOA, l'amoxicilline est recommandée en première intention pour les infections à streptocoques, les quinolones pour les infections à BGN, et les  $\beta$ -lactamines (pipéracilline-tazobactam, carbapénèmes) ou la clindamycine pour les anaérobies.

Malgré une prise en charge optimale du traitement chirurgicale et de l'antibiothérapie, les taux d'échecs rapportés dans la littérature peuvent être importants, notamment pour les infections complexes impliquant *S. aureus*, et peuvent atteindre entre 20 % et 40 % des cas (95–97).

## **2 LE BIOFILM**

### **2.1 Généralités**

Un biofilm peut se définir comme une communauté microbienne adhérente à une surface et enchâssée dans une matrice riche en polymères extracellulaires (98). Ce mode de vie dit sessile est à opposer au mode de vie planctonique, où les bactéries sont isolées et flottent librement dans un milieu liquide. Il s'agit d'un mode de vie procaryote naturel, retrouvé de tout temps, dans tout type d'environnement, et conférant aux micro-organismes de nombreux avantages, notamment en terme de colonisation et de survie (99,100). Les premières descriptions de bactéries agrégées, faisant alors référence à la formation de la plaque dentaire, ont été publiées dans une lettre destinée à la Royal Society of London par Anthony van Leeuwenhoek dès 1683 (101). De 1880 jusqu'à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, ce mode de vie sessile tombe dans l'oubli. Les bactéries sont alors majoritairement considérées sous leur forme planctonique. Le développement des antibiotiques à cette époque permettait de soigner les infections aiguës, dans la mesure où la souche était sensible (102,103). Aucun lien n'était fait entre la formation d'un biofilm et les échecs de traitement. Il faudra attendre les années 80 pour que John William Costerton fasse le lien entre les infections chroniques, plus difficiles à traiter, et la formation d'un biofilm chez le patient (104).

Depuis ce jour, le nombre d'études sur le sujet n'a cessé de croître. En santé humaine, il a été montré que les biofilms sont impliqués dans un large éventail de maladies infectieuses : 65 % de l'ensemble des infections nosocomiales chez l'Homme dans les pays développés seraient dus ou entretenus par des biofilms, et ce chiffre atteindrait 80 % pour les infections bactériennes chroniques (74,105). Les principales infections associées aux biofilms sont liées d'une part à la colonisation de dispositifs médicaux telles que les cathéters, prothèses, sondes urinaires ou trachéales ou encore les valves cardiaques, et d'autre part à des pathologies chroniques comme l'endocardite infectieuse, les IOA, la mucoviscidose, les infections urinaires ou de plaies, et les pathologies buccodentaires (106–111). La prise en charge de ces infections est complexe, les bactéries au sein du biofilm étant en effet protégées de l'action des antibiotiques et du système immunitaire, ce qui augmente le risque d'échec de traitement et/ou de récurrence de l'infection.

## 2.2 Etapes de formation

La formation d'un biofilm est un cycle se déroulant en plusieurs étapes : i) une phase d'adhésion initialement réversible puis dans un second temps irréversible qui va permettre à la bactérie de se fixer à une surface ; ii) une phase de maturation du biofilm au cours de laquelle la production de la matrice est initiée ; et iii) une phase de dispersion où les bactéries sont libérées, permettant la colonisation de nouvelles surfaces et le renouvellement du cycle (112).

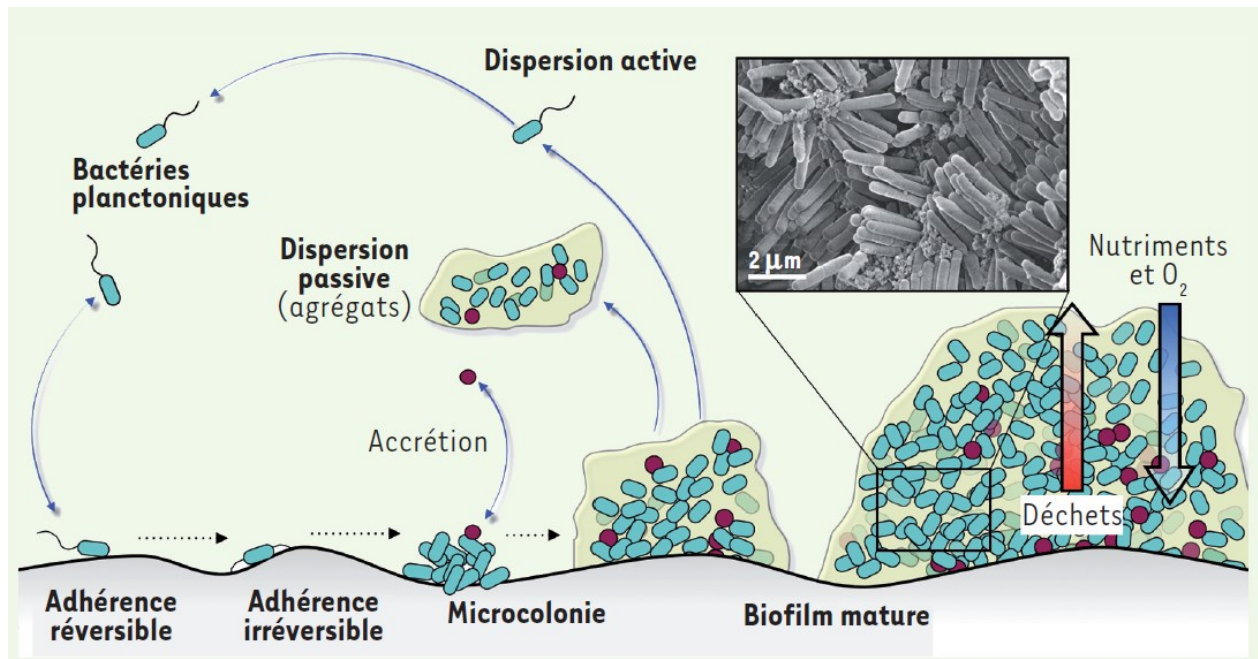


Figure 5 : Représentation des différentes étapes de la formation d'un biofilm d'après Lebeaux et Ghigo (113).

### 2.2.1 Adhésion

La surface sur laquelle les bactéries vont adhérer peut être biotique (tissus, peaux, muqueuses, yeux, poumons, etc.) ou abiotique (implants médicaux, coques de bateau, rochers, etc.) ou. Dans un premier temps, l'adhésion est dite réversible. La vitesse et la force d'attachement dépendent des caractéristiques physiques du matériel et de la membrane bactérienne. Le facteur le plus important est l'hydrophobicité aussi bien du matériel que de la surface cellulaire. L'interaction est dépendante d'une part des forces de Van der Waals, généralement attractives, et d'autre part des forces ioniques pouvant être attractives ou répulsives (114). Même si une bactérie possède la même charge que la surface, les forces de Van der Waals peuvent compenser cette répulsion et permettre l'adhésion. *Gross et al* ont démontré que chez *S. aureus*, les acides téichoïques, polymères fortement chargés,



sont à l'origine de l'adhésion sur les matériaux hydrophobes ou chargés négativement comme le verre et le polystyrène (115). Dans les années 2000, le rôle de l'ADN extracellulaire (ADNe) dans l'adhésion a été décrit, initialement chez *P. aeruginosa* (116), avant d'être étendu à d'autres espèces comme *S. aureus* (Cf. 2.3.3).

Dans un contexte clinique, l'adhésion des staphylocoques sur un matériel implanté met en jeu d'autres mécanismes. En effet, un matériel nouvellement implanté chez un patient est rapidement recouvert par les protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte comme le fibrinogène ou la fibronectine. L'adhésion est alors médiée par des protéines bactériennes de surface, capables de se lier aux protéines de la matrice extracellulaire, comme celles de la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (117,118). Ces protéines ont une structure commune associant un domaine de liaison extracellulaire, un domaine répété et un domaine d'ancrage à la paroi. Elles assurent plusieurs rôles dans la virulence bactérienne, notamment dans l'invasion et l'échappement au système immunitaire, et sont fonctionnellement redondantes. *S. aureus* possède ainsi plus de 20 MSCRAMMs actuellement décrites dont les principales sont le clumping factor A et B (ClfA, ClfB) se liant au fibrinogène (119), les fibronectin-binding proteins A et B (FnbA et FnbB) se liant à la fibronectine (120), la bone sialo-binding protein (Bbp) se fixant à la matrice osseuse, la Collagen adhesin (Cna) se liant au collagène (121), ou encore les serine-aspartate repeat-containing protein C, D ou E (SdrC, SdrD, SdrE) se liant au fibrinogène (122). Par comparaison, *S. epidermidis* possède une douzaine de MSCRAMM (123).

## 2.2.2 Maturation

Une fois que la bactérie a adhéré à une surface, la formation du biofilm passe par une étape de maturation pendant laquelle les bactéries vont s'agréger et se multiplier en produisant une matrice protectrice. Cette phase correspond, dans un premier temps, à la formation de micro-colonies, conduisant par la suite à une structure en 3 dimensions dites en « champignon ». Récemment, *Moormeier et al* ont décrit dans un modèle en flux une phase appelée « exodus », intervenant au début de la maturation, et correspondant à une dissémination d'une partie du biofilm (124). Cette étape, médiée par une nucléase régulée par le système *sae*, semble nécessaire à la formation de la structure en « champignon ». Avec la mise en place de cette structure en 3 dimensions, un gradient de concentration en oxygène et en nutriment décroissant vers le centre du biofilm va se mettre en place, créant des environnements hétérogènes au sein du biofilm. Expérimentalement, un biofilm est considéré comme mature à partir de 24 h d'incubation. Aujourd'hui, certains auteurs remettent en

cause ce niveau de maturation dans un processus infectieux humains, les images de biofilms formés *in vivo* étant beaucoup plus fins que ceux observés en laboratoire (125).

Initialement, l'étude des composants responsable de l'agrégation des biofilms staphylococciques a été focalisée sur les polysaccharides, en particulier le Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA), considéré comme le principal composant des biofilms staphylococciques (126) [\(Cf. 2.3.1\)](#). Cependant, des souches ne possédant pas les gènes impliqués dans la synthèse du PIA et pourtant capables de former un biofilm ont par la suite été décrites (127). En 2001, *Cucarella et al* ont rapporté la formation d'un biofilm par une souche de *S. aureus* d'origine animale sans PIA (aucune influence lorsque le *locus* codant pour le PIA était délété) (128). Ils ont mis en évidence que les étapes d'accumulations se faisait via un autre mécanisme impliquant la protéine de surface Bap (biofilm-associated protein). Par la suite, d'autres protéines responsables de l'accumulation bactérienne dans les biofilm ont été décrites chez les staphylocoques, notamment la protéine Aap (accumulation-associated protein) chez *S. epidermidis*, les FnBPs chez des souches de SARM, ou la protéine SdrC chez *S. aureus* (129–131).

Dans le cadre d'une infection humaine, *Zapotoczna et al* ont également mise en évidence l'utilisation de protéines de l'hôte par la bactérie dans les étapes de maturation du biofilm (132). En effet, via la production de coagulase, la prothrombine de l'hôte est détournée pour former un complexe transformant le fibrinogène en fibrine qui est par la suite intégrée par les staphylocoques pour former leur matrice. Ce mécanisme semble jouer un rôle important dans les abcès et les infections sur cathéter (133,134).

La présence de fibres amyloïdes a récemment été décrit dans les biofilms staphylococciques matures (135). Ces structures déjà observées dans les biofilms d'autres espèces n'ont été rapportées qu'en 2012 (136). Ces fibres proviennent des phenol-soluble modulins (PSM), petits peptides amphiphiles, capables de s'auto-assembler, consolidant le biofilm et le rendant résistant à des traitements enzymatiques comme la protéinase K, la DNase et la Dispersine B. En 2016, *Taglialegna et al* ont également observé ce phénomène avec la protéine Bap (137).

Les staphylocoques possèdent donc plusieurs mécanismes pour l'étape de maturation. Ces mécanismes sont dépendants d'une part, des souches, et d'autre part des conditions environnementales, et conduisent à la formation de différents types de biofilms (figure 6). On peut donc supposer que les biofilms formés en clinique sont différents en fonction de la localisation et de la nature de l'infection, et de la bactérie responsable.

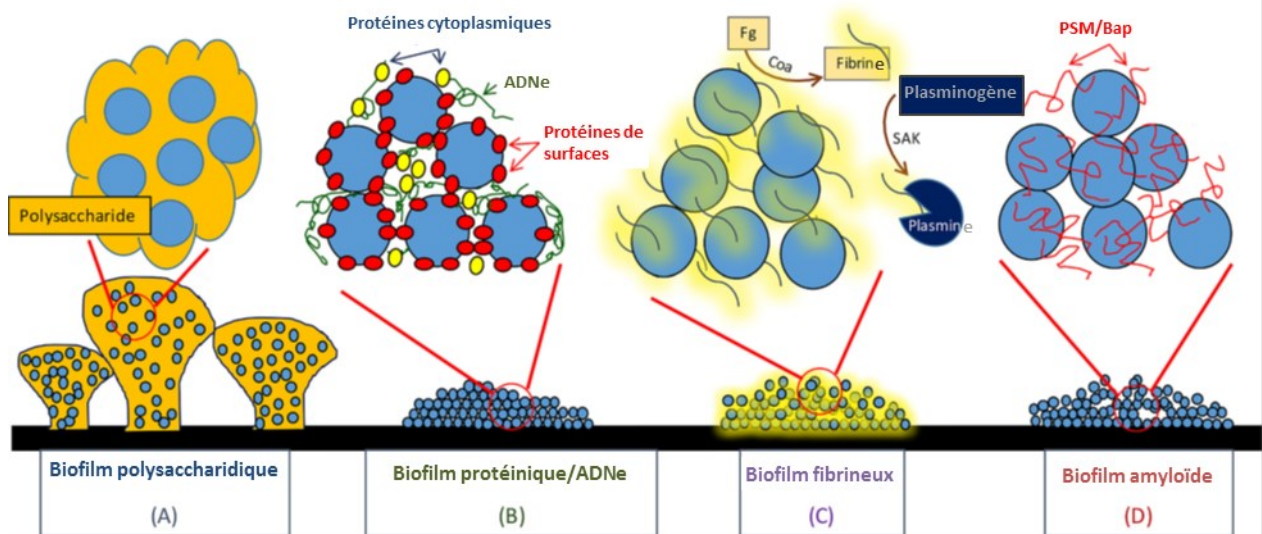


Figure 6 : Représentation des différents types de biofilm staphylococciques adaptée de Zapotoczna et al (138).

### 2.2.3 Dispersion

La dernière étape de la formation d'un biofilm est caractérisée par un détachement d'une partie des bactéries, permettant la colonisation de nouvelles surfaces et l'initiation d'un nouveau biofilm (139). Il s'agit d'un phénomène actif hautement régulé à ne pas confondre avec la dispersion passive résultant de l'érosion du biofilm.

Le mécanisme de dispersion des biofilms staphylococciques est majoritairement médié par les PSM (140). Au-delà de leur activité cytotoxique en intracellulaire et pro-inflammatoire, ces petits peptides amphiphiles possèdent des propriétés surfactantes responsables du décrochage des biofilms. Sept PSM ont été décrit chez *S. epidermidis* (PSM $\alpha$ , PSM $\beta$ 1, PSM $\beta$ 2, PSM $\delta$ , PSM $\epsilon$ , et  $\delta$ -toxine), et 8 chez *S. aureus* (PSM $\alpha$ 1, PSM $\alpha$ 2, PSM $\alpha$ 3, PSM $\alpha$ 4, PSM $\beta$ 1, PSM $\beta$ 2, et  $\delta$ -toxine). Un PSM a également été décrit sur un élément génétique mobile, la cassette SCCmec (PSM-mec) pour les deux espèces (141). D'autres enzymes comme des protéases et nucléases jouent également un rôle dans la dissémination des biofilms (142,143). L'accumulation des certains biofilms étant liée à la présence d'ADNe et de protéines, l'impact de ces enzymes semble être souche dépendante, à l'inverse des PSM.

## 2.3 Composition des biofilms

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux 3 principaux composants des biofilms staphylococciques : les polysaccharides, les protéines et d'ADNe.

### 2.3.1 Les polysaccharides

Nous avons vu précédemment que le principal polysaccharide décrit dans les biofilms staphylococciques était le PIA (126). Originellement appelé Poly-N-acetyl Glucosamine (PNAG), il est synthétisé via l'opéron *icaADBC*. Des gènes orthologues ont été identifiés dans de nombreuses bactéries (*E. coli*, *Yersinia pestis* etc), suggérant des mécanismes similaires chez les bactéries à Gram positif et Gram négatif (144,145). Il s'agit d'un polymère composé de résidus  $\beta$ -1,6-linked-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyle qui peut être N-acétylé ce qui lui confère une charge positive. Il peut être lié à un succinate par une liaison ester lui conférant alors une charge négative.

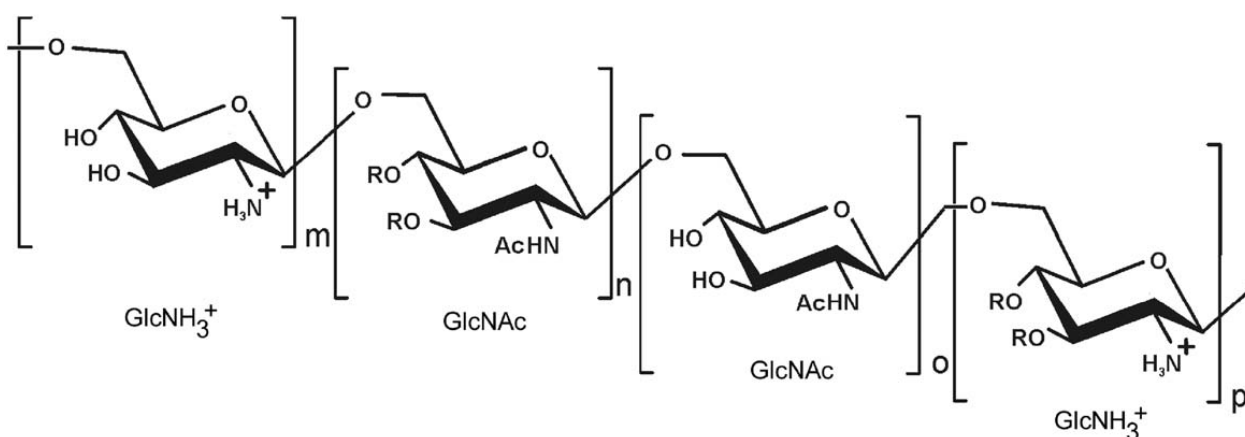


Figure 7 : Représentation schématique du PIA chez *S. epidermidis* d'après Rohde et al (146).

La présence de l'opéron *ica* semble jouer un rôle important dans la pathogénie de *S. epidermidis* comme le suggère l'étude de Ziebuhr et al rapportant la présence de ces gènes dans 85 % des souches d'hémoculture contre 6 % des souches saprophytes (127). Chez *S. aureus*, la majorité des souches possèdent l'opéron (147). Fluckiger et al ont montré que son niveau d'expression était souche-dépendant et fonction de l'environnement. Une expression importante de l'opéron *ica* a été observée dans un modèle *in vivo* d'infection sur matériel, suggérant son importance dans ce processus infectieux (148). Le système d'expression de l'opéron *ica* chez *S. aureus* est modulé d'une part par le gène *icaR* et d'autre part par le gène *tcaR* codant pour des répresseurs (149). La régulation est complexe et ne dépend pas du système de régulation *agr* ni du facteur de réponse au stress  $\sigma^B$  mais plutôt de l'expression de *sarA* (150,151).

### 2.3.2 Les protéines

Les protéines interviennent à toutes les étapes de la formation du biofilm, de l'attachement initiale jusqu'à la dissémination. Certaines protéines sont capables d'assurer plusieurs rôles à différentes étapes comme les PSM pour la maturation et la dissémination ou les Fnbp pour l'attachement et la maturation. Le rôle des protéines dans l'accumulation est primordial pour les biofilms *ica*-indépendants, phénotype plus souvent retrouvé chez les SARM (152). On peut différencier les protéines sécrétées des protéines ancrées à la surface des bactéries.

Parmi les protéines sécrétées, le rôle de l' $\alpha$ -toxine a été mis en évidence par l'utilisation d'un mutant délété pour le gène *hla* formant moins de biofilm en microplaque et en flux (153). La  $\beta$ -toxine est également impliquée dans la formation de biofilm via sa capacité à s'assembler en présence d'ADNe pour former un réseau de nucléoprotéines structurantes (154). *S. aureus* possède également des protéines appelées SERAM pour *Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules* parmi lesquels on compte les protéines Eap et Emp (155). Ces protéines peuvent se lier à de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, et joue un rôle essentiel dans la formation de biofilm en sérum (156–158).

Les protéines ancrées à la paroi des staphylocoques peuvent être classées en 4 groupes : les MSCRAMM ([Cf. 2.2.1](#)), les protéines avec un motif NEAT (pour NEAr iron Transporter), la famille « three-helical bundle », et la famille avec un motif G5-E répété (118).

Dans la famille des protéines comportant un motif NEAT, on retrouve les protéines IsdA, IsdB et IsdC capables de se lier à l'hémoglobine afin de faciliter son absorption (159). Ces protéines sont particulièrement exprimées dans un environnement appauvri en fer, comme lors d'une infection. Il a été décrit que IsdA est également capable de se lier au fibrinogène et à la fibronectine, et que IsdB est nécessaire à la colonisation du tissu cardiaque (160,161).

La seule protéine de la famille « three-helical bundle » est la protéine A (SpA). Présente chez tous les souches de *S. aureus*, elle est capable de se lier à la région Fc des immunoglobulines G permettant l'échappement au système immunitaire. Cette protéine est retrouvée dans la matrice du biofilm mais son rôle n'a pas encore été clairement établi (162).

La protéine de la famille du motif G5-E répétée chez *S. aureus* est la protéine SasG (homologue de la protéine Aap chez *S. epidermidis*). Cette protéine joue un rôle sur l'adhésion à des surfaces

abiotiques ainsi qu'à la surface des cellules épithéliales desquamées (163), et est impliquée dans l'accumulation via un mécanisme zinc dépendant (164,165).

Comme nous l'avons vu précédemment, les staphylocoques sont également capables d'utiliser les protéines de l'hôte et de les incorporer dans leur matrice comme constituant de leur biofilm. Afin de pouvoir observer ce phénomène *in vitro*, il est nécessaire de compléter les milieux de culture. *Akiyama et al* ont observé dès 1997 que *S. aureus* était capable de former un biofilm contenant de la fibrine lorsque le milieu était complété en fibrinogène et en sérum humain (166). Plusieurs études ont rapporté que l'ajout de 10 % de plasma humain augmentait la formation de biofilm dans différents modèles, mais également le nombre de bactéries dénombrées, l'expression de certaines protéines d'adhésion, ou la tolérance à certains antibiotiques (167–169). *Jørgensen et al* ont récemment observés que plus la concentration en plasma était élevée, plus la quantité de biofilm formée était importante sur la souche USA300 (170).

### 2.3.3 L'ADN extracellulaire

Longtemps, l'étude de la composition des biofilms a été focalisée sur les polysaccharides. Ce n'est que récemment que l'ADNe a été considéré comme un composant à part entière de la matrice. Depuis la première description dans un biofilm de *P. aeruginosa* dans les années 2000 (116), ce composant a été largement étudié chez de nombreuses espèces bactériennes. Son implication dans le mode de vie sessile a été mise en évidence initialement en utilisant l'action de la DNase, enzyme capable d'hydrolyser les liaisons phosphodiester de l'ADN. *Izano et al* ont ainsi montré en 2008 que cette enzyme était capable d'inhiber et d'altérer fortement les biofilms staphylococciques, confirmant la présence et le rôle structurale majeure de l'ADNe dans le mode de vie sessile des staphylocoques (171).

L'ADNe retrouvé dans les biofilms staphylococciques trouve son origine de l'autolyse d'une partie de la population bactérienne dans le cadre d'un mécanisme suicidaire altruiste pour lequel une sous-population programme sa mort cellulaire pour la survie du reste de la communauté (172). Ce phénomène est médié principalement par l'action d'autolysine dont les principales sont AtlE chez *S. epidermidis* (173) et AtlA chez *S. aureus* (174). La régulation de ce mécanisme est complexe et dépend aussi bien de l'espèce, que du matériel ou du phénotype du biofilm. Chez *S. aureus*, *Rice et al* ont démontré que les gènes *cidA* et *IrgA* contrôlaient la lyse cellulaire de la souche de référence UAMS-1, en codant deux protéines holine- et antiholine-like induisant la mort cellulaire selon un processus similaire à une lyse bactérienne par un bactériophage (175,176). *Grande et al* ont montré

une augmentation de l'expression des gènes *cidA* et *alsS* (impliqués dans la tolérance à un environnement acide) au cours des étapes précoces de la formation du biofilm sur cette même souche (177). Ces données mettent en lumière le rôle de *cidA* dans l'autolyse et dans l'adhésion. *Seidl et al* ont observé la nécessité du gène *ccpA* pour la formation de biofilm de la souche de référence SA113 et ont également montré que la protéine Ccpa augmentait la transcription de *cidA* (178). La délétion du gène *pfs* chez la souche de référence NCTC8325, quant à elle, induit une diminution d'ADNe et une baisse de la formation de biofilm (179). L'utilisation d'une librairie de mutants a permis de mettre en évidence le rôle de deux autres gènes (*IrgB* et *yyjI*) associés à l'autolyse, les mutants formant plus de biofilm (180). *Lin et al* ont récemment observé des mutations communes dans les séquences de quatre gènes impliqués dans l'autolyse, pour des souches MRSA ne produisant pas de biofilm (181). L'ajout d'ADNe dans le milieu de culture permettait à ces souches de produire un biofilm. Enfin, il a été montré que la protéine GdpS agit comme un contrôle négatif de la libération d'ADNe par inhibition de l'autolyse (182). L'ensemble de cette régulation est résumé dans la figure 8.

L'ADNe joue en premier lieu un rôle structural dans les biofilms. La nature chimique de l'ADN influence les propriétés membranaires des bactéries, facilitant les interactions cellule-cellule ainsi que l'adhésion bactérienne à une surface. *Dengler et al* ont par exemple observé que l'ADNe agissait comme un réseau électrostatique à pH acide, permettant l'agrégation des bactéries entre elles via des protéines cytoplasmiques chargées, libérées lors de l'autolyse (183). L'ADNe possède également un rôle protecteur. En effet, l'ajout de DNase sur un biofilm déjà formé, sensibilise ce dernier à différents traitements (détergent cationique, antibiotique) (184,185). Il permet également, de par sa composition, l'organisation des PSM en fibre amyloïde. En effet, l'ADNe chargé négativement semble capable d'attirer les PSM chargés positivement, permettant d'obtenir localement une concentration importante nécessaire à la polymérisation des PSM (186). Enfin, l'ADNe pourrait avoir un rôle probable dans l'atténuation de la réponse immunitaire médiée par l'activation du TLR9 (187).

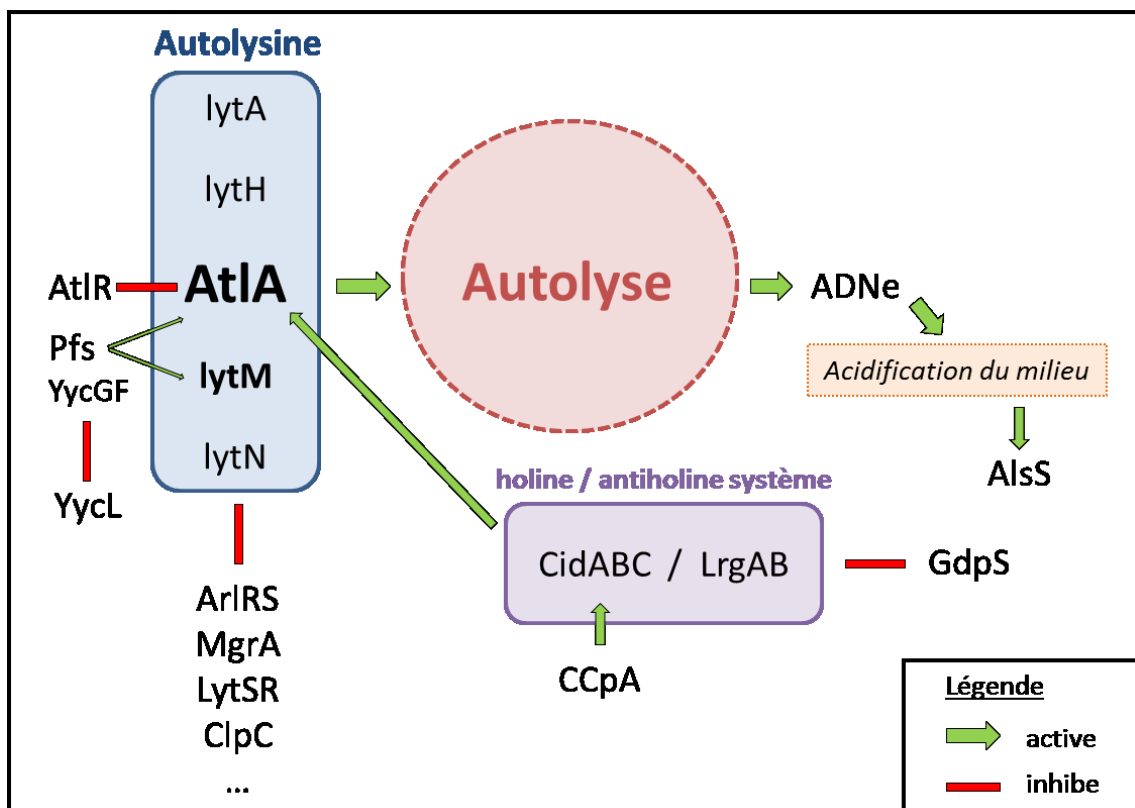


Figure 8 : Schéma illustrant la régulation de l'autolyse impliquée dans la formation de biofilm de *S. aureus*.

## 2.4 Méthodes de mesure

Il existe à ce jour un nombre important de méthodes de mesure du biofilm, allant en terme de complexité d'une simple croissance sur un milieu gélosé spécifique, à la mise au point de modèles *in vitro* dynamiques mesurant en temps réel les étapes de formation par imagerie, en passant par les modèles *in vivo*. Aucun modèle n'étant parfait, le choix de la méthode à utiliser doit tenir compte de la problématique posée, de la pertinence du modèle, de la facilité ou encore de son coût. Les modèles *in vitro* sont à privilégier dans un premier temps, permettant de répondre le plus souvent aux problématiques posées avec des coûts variables. L'utilisation de modèles animaux apporte certes des informations complémentaires et nécessaires à la recherche, mais doit tenir compte des questions éthiques inhérentes à ces approches.



## 2.4.1 Méthodes *in vitro*

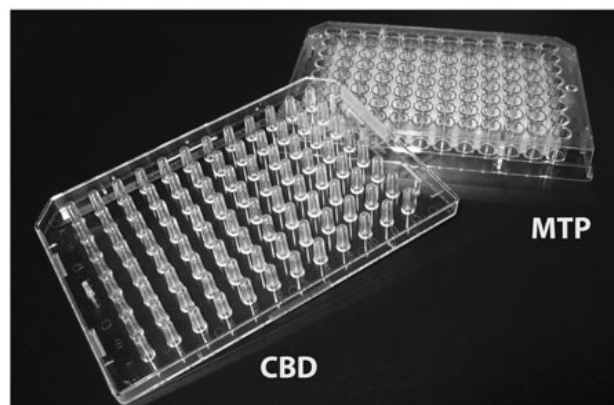
### 2.4.1.1 Les modèles en microplaques

La formation de biofilm en microplaque est sans doute la méthode la plus utilisée dans le monde. Simple à mettre en œuvre et peu chère, ne nécessitant aucun équipement spécifique, elle permet le passage d'un grand nombre de souches et est adaptée au criblage de molécules anti-biofilm. Décrit à l'origine par *Christensen et al* en 1985 (188), son principe repose sur la formation de biofilm dans les 96 puits qui composent la plaque. Après un temps d'incubation nécessaire dans un milieu de culture adéquate, la microplaque est rincée à l'aide d'une pipette ou par immersion, afin d'éliminer les bactéries planctoniques. Les staphylocoques forment leur biofilm au fond des puits, rendant l'utilisation des microplaques parfaitement adaptée puisqu'elles fournissent une surface importante sur laquelle les bactéries vont adhérer. A l'inverse, certaines bactéries forment leurs biofilms à la surface air-liquide. C'est le cas par exemple de *P. aeruginosa*, ou *Bacillus cereus* (189,190). La quantification du biofilm se fait alors sur l'anneau formé sur le bord des puits.

Généralement, les bactéries sessiles adhérees aux puits sont mises en évidence par coloration (191). Plusieurs colorants existent, les plus répandus étant le Cristal Violet, le Rouge de Safranine et le Rouge Congo. Après un temps de contact variable selon le colorant (généralement, quelques minutes), le surplus est éliminé par rinçage. Après remise en suspension, il est possible de quantifier le biofilm formé par simple lecture d'absorbance. *Stepanović et al* ont proposé une étape de fixation supplémentaire à l'éthanol, augmentant la reproductibilité de la méthode, ainsi qu'une classification des souches en fonction des valeurs contrôle (192). Les colorants généralement utilisés sont cationiques et se fixent sur l'ensemble des charges négatives des constituants, provenant aussi bien des bactéries que de la matrice, et ne permettent donc pas la différenciation entre les deux. Une alternative à la coloration consiste à énumérer après rinçage les bactéries encore adhérees au fond des puits. Renseignant sur la viabilité, cette méthode ne tient toutefois pas compte des bactéries viables non cultivables (VBNC) qui peuvent être présente au sein des biofilms (193). L'association d'une coloration et d'un dénombrement permet donc d'estimer le nombre de bactéries ainsi que la quantité de matrice produite. Comme alternative intéressante aux colorants, certains auteurs se contentent de suspendre le biofilm formé dans de l'eau. La turbidité ainsi créée peut être alors suffisante pour être quantifiée par une mesure d'absorbance (194).

L'une des limites de l'utilisation des microplaques, notamment pour l'étude des staphylocoques, est qu'une partie du biofilm mesuré au fond des puits peut provenir de la sédimentation des bactéries,

qui ont pu être par la suite enchâssées dans la matrice. Ces bactéries additionnelles ne résultent alors pas du processus de formation d'un biofilm à proprement parler. C'est afin de pallier ce problème, que le **model Calgary** (Calgary Biofilm Device) a été développé (195,196). Avec ce système, la mesure du biofilm ne se fait plus dans la microplaque, mais sur des picots fixés sur le couvercle de la microplaque. Cette technique standardisée permet notamment de déterminer la Concentration Minimale Eradiquant le Biofilm (CMEB) des antibiotiques (Cf. 3.3.6.2). L'une des limites de cette méthode est que la quantification du biofilm est le plus souvent réalisée par dénombrement après une étape de sonication nécessaire afin de détacher les bactéries des picots. Une partie des bactéries peut alors rester adhérente aux picots et fausser les résultats (197,198). Une autre alternative afin d'éviter l'intégration des bactéries sédimentées dans les analyses, consiste à changer le milieu de culture quelques heures après l'incubation. Cette méthode permet d'éliminer les bactéries planctoniques, et de ne garder que les bactéries adhérentes dans un milieu de culture frais (132).



**Figure 9 : photos d'une microplaque (à l'arrière) et du système Calgary (à l'avant).**

La formation de biofilm en microplaques permet également, grâce à une étape de « coating », de mesurer l'adhésion des bactéries non pas sur la surface abiotique composant la microplaque (polystyrène, polypropylène) mais sur des molécules d'intérêt. Il est par exemple possible de recouvrir les plaques avec du sérum ou du plasma, afin de se rapprocher des conditions cliniques d'adhésion des bactéries à une prothèse lors d'une infection (Cf. 2.2.1) (150). Cette approche permet également d'étudier des traitements de surface prévenant l'adhésion bactérienne (199).

Quelle que soit la méthode choisie, lorsque l'on étudie la formation de biofilm en microplaque, l'une des limites majeures de ces modèles est la nécessité de devoir rincer les biofilms afin d'éliminer les bactéries planctoniques. En effet, les rinçages classiquement effectués à la pipette sont agressifs à

l'échelle microscopique et peuvent altérer le biofilm formé. Des quantités importantes peuvent se détacher, conduisant à des défauts de reproductibilité de la méthode ainsi qu'à un impact important du technicien sur les résultats générés.

La société BioFilm Control a développé une méthode appelée **BioFilm Ring Test**<sup>®</sup> (BRT) permettant de mesurer les étapes initiales de formation du biofilm sans rinçage ni coloration (figure 10) (200). La technique repose sur l'utilisation de microbilles magnétisables ajoutées au milieu de culture qui, après incubation, vont être soumises à l'action d'un aimant. Les billes libres dans le milieu vont alors converger vers le centre du puits, générant un spot marron/rouge visible à l'œil nu. A l'inverse, si un biofilm s'est formé au fond du puits, les billes piégées par les bactéries adhérentes et la matrice sont immobilisées, conduisant à l'absence de spot après aimantation. La formation d'un anneau est également observable lorsqu'une partie des billes est immobilisée, correspondant à un biofilm en cours de formation. Après une étape de lecture des plaques via un scanner, l'intensité du spot est analysée par un software et traduit en un index (Biofilm Formation Index - BFI) permettant de quantifier le niveau de formation du biofilm. Avec la version 2.0, l'index varie entre 20 (présence d'un spot complet, aucune bille immobilisée) à 0 (absence de spot, l'intégralité des billes est immobilisée). Par cette méthode, il est possible de réaliser des cinétiques d'adhésions en mesurant heure par heure l'immobilisation des billes. Une autre approche développée récemment avec cette technologie est le clinical Biofilm Ring Test<sup>®</sup> (cBRT) (201). Son principe repose sur le concept que, pour un temps donné (5 h d'incubation), plus l'inoculum bactérien nécessaire pour l'immobilisation des billes est faible, plus la souche possède une forte capacité à produire un biofilm. En déterminant l'inoculum minimum nécessaire à l'immobilisation des billes, il est possible de classer les souches en fonction de leur « force » à immobiliser les billes. Le coefficient de corrélation est de 0,623 par rapport à la classification de *Stepanović et al* en Cristal Violet. Au final, la technologie BioFilm ring Test<sup>®</sup> est adaptée à l'étude des gènes impliqués dans la formation du biofilm (202,203), de composants du biofilm via l'utilisation d'enzymes (204,205), ou à l'analyse de la capacité de formation de biofilm de souches cliniques (206–209) ou provenant de l'industrie alimentaire (210).

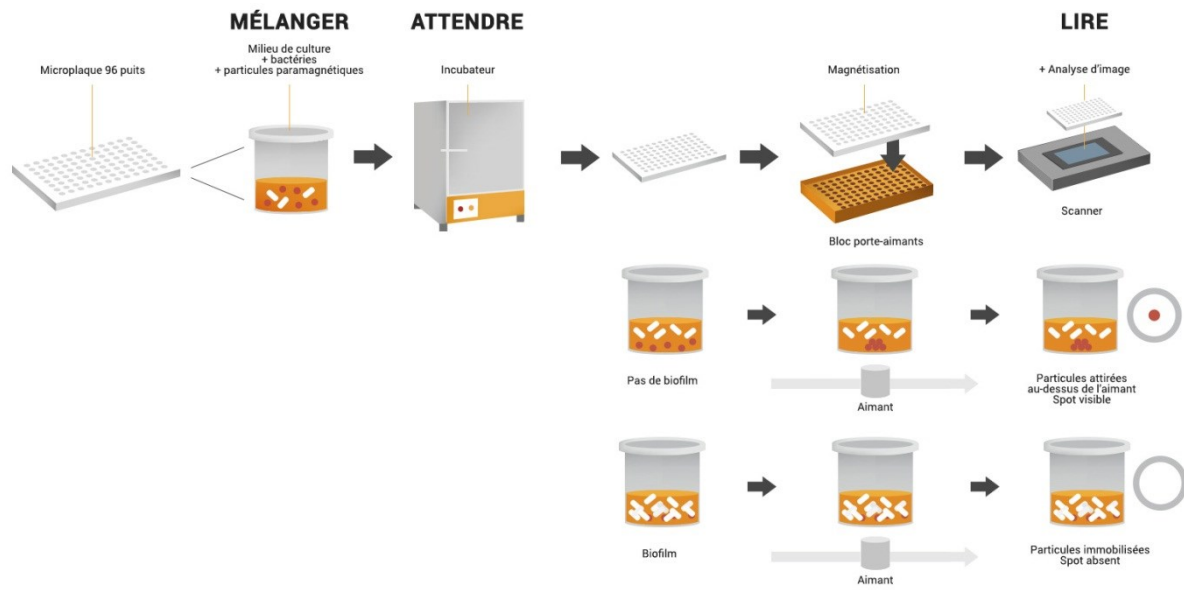


Figure 10 : Protocole de la méthode BioFilm Ring Test®.

#### 2.4.1.2 Les modèles en flux

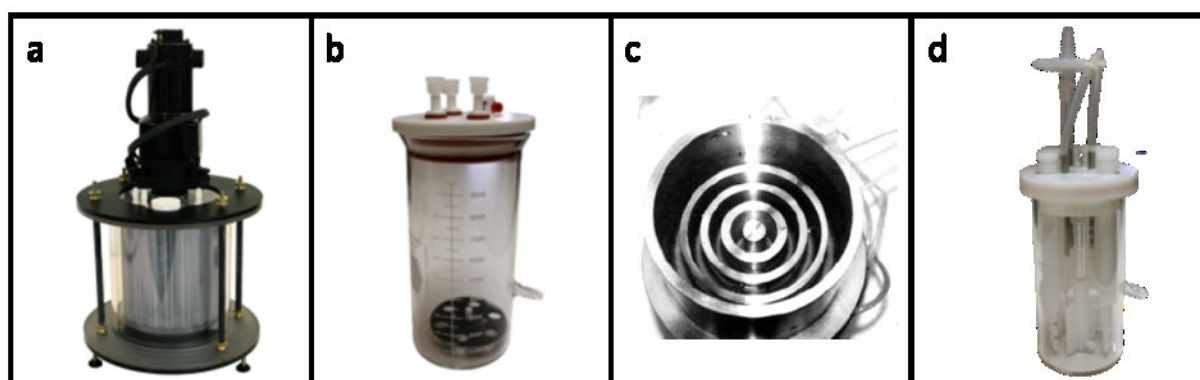
Les modèles de biofilm statique décrits précédemment ne prennent pas en compte les forces de flux agissant lors du procédé de formation. Il s'agit pourtant d'un facteur primordial impactant directement les étapes d'adhésion, mais pouvant également influencer les étapes de maturation (porosité du biofilm, architecture, diffusion des substrats) et de dispersion (211–213). Les biofilms se formant généralement en milieu liquide, ces forces sont retrouvées aussi bien dans l'environnement naturel (rivières) que lors d'un processus d'infection (flux sanguin) ou de contamination (canalisation, égouts) (214,215).

L'un des premiers modèles développés est le **dispositif de Robbins** (Robbins device) conçu pour étudier les biofilms dans les systèmes d'acheminement d'eau potable (216). Un flux est créé à travers un tuyau possédant plusieurs orifices contenant des coupons sur lesquels le biofilm va se former. L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que les coupons peuvent être retirés individuellement sans interrompre l'expérience. Dans sa version modifiée (modified Robbins device), la canalisation est carrée et les coupons alignés avec le conduit, disposés à égale distance les uns des autres afin de ne pas perturber le flux lors de leur retrait (217). Cette méthode permettant un flux laminaire ou turbulent rapide est aujourd'hui largement utilisée notamment pour les interactions bactéries-surfaces et les traitements anti-biofilms (218–220). La mesure du biofilm sur les coupons peut cependant être biaisée due à leur manipulation, l'observation directe n'étant pas possible. Les forces

dynamiques créées par le flux peuvent être variables d'un coupon à l'autre et doivent être contrôlées, et la quantité de nutriment peut être décroissante de l'entrée vers la sortie de la canalisation, pouvant influencer les résultats si le flux est trop faible (221).

Les réacteurs biofilm à faible écoulement (**drip flow biofilm reactor**) ont été développés par des chercheurs de l'Université du Montana et sont composés de 4 à 6 chambres indépendantes contenant un coupon ou un morceau de cathéter ou stent sur lequel le biofilm va se former (222). Le flux peut se faire via l'inclinaison de la chambre à 10°, permettant la mesure de la formation du biofilm en condition de cisaillement faible. Cette méthode simple est particulièrement adaptée à l'étude des infections sur matériel ou à l'étude des biofilms formés à la surface air-liquide (223,224). La formation du biofilm le long du coupon peut cependant être hétérogène.

Une autre approche afin d'étudier la formation de biofilm en flux consiste à créer une force de cisaillement via une rotation. Il existe 4 types de réacteurs fonctionnant sur ce principe : le réacteur rotatif annulaire (rotary annular reactor), le réacteur rotatif à disques (rotary disk reactor), le réacteur à cylindres concentriques (concentric cylinder reactor) et le CDC biofilm reactor®. Le premier, également appelé rotatorque ou réacteur annulaire, a été développé par Kornegay et Andrews en 1968 et est composé d'un cylindre externe fixe et d'un cylindre interne en rotation (225). Le biofilm se forme sur des parois rectangulaires retirables pouvant être composées de différents matériaux. Le réacteur rotatif à disques quant à lui est composé d'un disque en rotation sur lequel des coupons vont être fixés (226). Selon leurs distances radiales, des forces de cisaillement différentes peuvent être testées simultanément. Le réacteur à cylindres concentriques est composé de 4 chambres indépendantes contenant chacune un cylindre en acier inoxydable (227). Il permet de mesurer simultanément la formation de biofilm de différentes bactéries, à différentes forces de cisaillement dans la même expérience. Enfin, le CDC biofilm reactor® est composé de huit portoirs pouvant contenir chacun trois disques sur lesquels le biofilm va se former (228). Les forces de cisaillement sont produites par une barre d'agitation au centre du dispositif. L'avantage des dispositifs rotatifs est que les forces de cisaillement peuvent être réglées indépendamment du flux de milieu entrant. Cependant, ces expériences sont généralement lourdes et complexes. Elles ne permettent pas de tester un grand nombre de souches ou de conditions.



**Figure 11 : Illustration des différents modèles de réacteurs rotatifs d'après (227,229): a) le réacteur rotatif annulaire ; b) le réacteur rotatif à disques ; c) le réacteur à cylindres concentriques ; d) le CDC biofilm reactor®.**

Les méthodes décrites précédemment ne permettent pas de suivre la formation de biofilm en temps réel. Afin de pallier ce problème, il est possible de mesurer le biofilm en développement sur une fenêtre en verre ou en plastique placée dans une chambre. Un microscope optique ou confocal peut alors être placé contre la fenêtre afin de pouvoir enregistrer le processus de formation en temps réel (230,231). Une autre approche consiste à placer le microscope directement dans le milieu mais les risques de contaminations sont alors importants. L'intérêt de ces méthodes réside dans la non-altération des biofilms lors de leur mesure. Le système Biofilux® développé par la société Fluxion Systems permet de suivre la formation d'un biofilm en temps réel en microplaque (232). Cette méthode nécessite un volume de milieu faible (1mL) et permet la réalisation de 24 répliques en une seule expérience. Cependant, le coût d'une expérience reste important.

## 2.4.2 Microscopie

Il existe plusieurs méthodes microscopiques permettant de visualiser les biofilms, se différenciant en termes de résolution, complexité et information apportée.

### 2.4.2.1 La microscopie optique

La microscopie optique (light microscopy) est une méthode basique permettant une visualisation à grande échelle des biofilms après une étape de coloration. Plusieurs colorants ont été décrits comme permettant de mettre en évidence les biofilms directement dans des prélèvements parmi lesquels l'hématoxyline et l'éosine, l'acide périodique de Schiff ou la coloration de Gram de Brown and Brenn (233–235). De Carvalho et da Fonseca ont prouvé qu'il était possible de quantifier le biofilm, son épaisseur étant proportionnelle à l'intensité des pixels de l'image acquise après coloration (236).

#### **2.4.2.2 La microscopie confocale**

La microscopie confocale (*Confocal Laser Scanning Microscopy* – CLSM) est une méthode très répandue permettant l'étude fine de la structure des biofilms. Via l'utilisation de sondes fluorescentes, elle permet d'obtenir un signal à l'échelle de la bactérie sur une surface plane donnée. En multipliant les acquisitions à différentes profondeurs, il est possible de reconstituer une image en trois dimensions du biofilm et d'acquérir des informations sur son épaisseur, sa rugosité ou son volume (237). L'un des intérêts de la méthode repose sur la grande gamme de sondes disponibles. Via l'utilisation de marqueurs spécifiques, il est par exemple possible d'analyser la composition du biofilm en polysaccharides, ADNe ou protéines (238,239). Cependant, les marquages peuvent être aspécifiques, entraînant un bruit de fond important qui peut fausser la quantification des composants. L'utilisation d'un marquage Live/Dead composé de SYTO9 (marqueur vert allant se fixer sur l'ensemble des cellules) et d'iodure de propidium (marqueur rouge ne se fixant que sur les bactéries avec une membrane altérée) permet d'étudier la viabilité bactérienne et donc l'efficacité de traitements (240). Il est également possible de modifier génétiquement des souches afin qu'elles expriment elles-mêmes un fluorophore comme la Green Fluorescent Protein (GFP), supprimant l'étape de marquage (241). La construction génétique reste cependant complexe mais offre l'avantage de pouvoir suivre la formation d'un biofilm au cours du temps, ou d'étudier les interactions inter-espèces dans des modèles de biofilms mixtes (242,243).

#### **2.4.2.3 La microscopie électronique à balayage**

La microscopie électronique à balayage (*Scanning Electron Microscopy* - SEM) est une technique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon via l'absorption d'électrons. Elle peut apporter une information qualitative sur l'organisation structurale ainsi que sur la matrice des biofilms. Elle est souvent utilisée en complément d'autres méthodes, notamment lors d'études de l'effet de traitements sur les biofilms (195,244). C'est l'une des méthodes les plus résolutive, cependant la préparation des échantillons nécessite une étape de déshydratation et de coating avec un matériel conducteur pouvant altérer la structure du biofilm. Une alternative consiste à cryo-fixer les échantillons ; mais la méthode est lourde à mettre en place, coûteuse et la matrice des biofilms peut être modifiée par la chaleur générée par le faisceau d'électrons (245). Comme alternative, la microscopie électronique à balayage environnemental consiste à déposer les échantillons dans une chambre à pression variable sans prétraitement. L'absence de coating conduit néanmoins à une baisse de la résolution et une perte d'information (246).

#### 2.4.2.4 La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy* – AFM) consiste à sonder la surface d'un échantillon à l'aide d'une pointe placée au bout d'un levier. La déviation de la pointe est détectée par un système optique utilisant un laser. Cette méthode permet de visualiser la structure des surfaces à des résolutions atomiques en condition non destructive ainsi qu'à mesurer les forces d'adhésions cellule-cellule et cellule-surface (247,248). Elle permet également d'acquérir des informations relatives aux propriétés physiques du biofilm comme sa cohésion en fonction de son épaisseur (249). Nécessitant un prétraitement limité sur l'échantillon, l'AFM ne permet cependant pas l'acquisition d'images de grande surface (limité à 150  $\mu\text{m}$  x 150  $\mu\text{m}$ ), et l'échantillon, à force de passages de la pointe, peut être altéré.

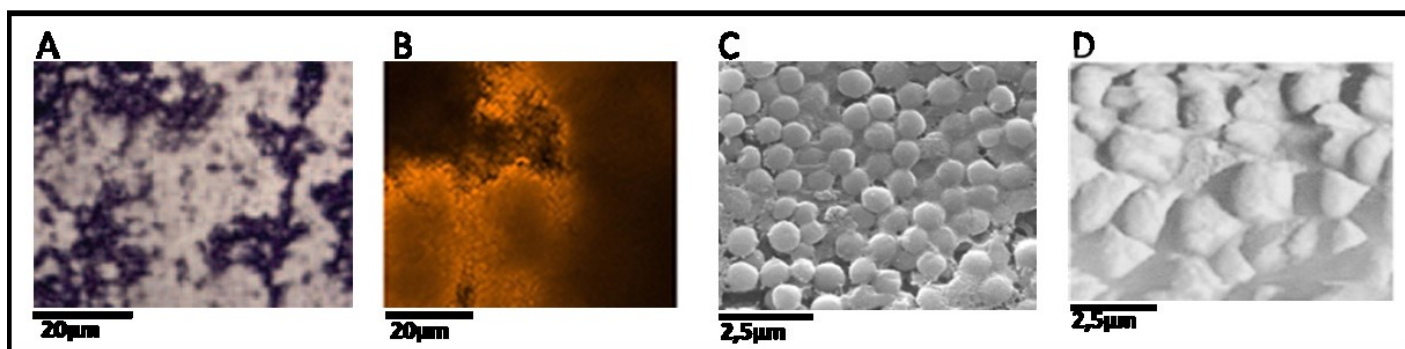


Figure 12 : Adhésion et formation d'un biofilm de *S. aureus* sur du polystyrène observées par A) microscopie optique d'après (193); B) CLSM d'après (182); C) SEM d'après (193); D) AFM d'après (192).

#### 2.4.3 Méthodes *in vivo*

De nombreux modèles *in vivo* ont été développés au cours des dernières années, permettant de mieux appréhender la réponse de l'hôte face à un biofilm.

##### 2.4.3.1 Le modèle *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) est l'un des modèles les plus simples à utiliser pour étudier la virulence bactérienne *in vivo*. Les résultats s'expriment en pourcentage de survie. En effet, à l'issue de la période d'infection, le nombre de nématodes morts est quantifié pour évaluer la sévérité de l'infection. *Beguin et al* ont par exemple observé la nécessité de l'opéron *ica* chez *S. epidermidis* dans la létalité d'une infection intestinale dans ce modèle, le biofilm jouant un rôle immunoprotecteur (250). *Brackman et al* ont également utilisé ce modèle pour démontrer qu'un inhibiteur du quorum sensing augmentait le taux de succès d'un traitement antibiotique en sensibilisant le biofilm dans ce modèle (251).



#### **2.4.3.2 Les modèles sur cathéters veineux centraux**

Initialement développés chez le rat, les modèles sur cathéters veineux centraux reposent sur la pose d'un cathéter, généralement au niveau de la veine cave supérieure, qui sera infectée après l'insertion (252). Ces modèles ont été développés afin i) d'évaluer les traitements, notamment les antibiothérapies de verrou (253); ii) d'étudier la formation de biofilm dans des conditions proches de la clinique; iii) de déterminer la dissémination vers les autres organes. *Li et al* ont par exemple démontré l'importance de l'opéron *ica* dans la virulence bactérienne pour ce type d'infection en l'insérant dans 3 souches ne le possédant pas (254). Ce modèle a également été mis au point chez d'autres mammifères comme le lapin ou la souris (255). Il est également possible d'utiliser des souches bioluminescentes, par insertion d'un opéron lux, permettant alors de suivre la colonisation du matériel en temps réel pendant plusieurs jours sans sacrifice de l'animal. La construction génétique est stable et la bioluminescence enregistrée est parfaitement corrélée avec un dénombrement classique (256).

#### **2.4.3.3 Les modèles d'implants sous-cutanés**

Les modèles d'infection sur implants sous-cutanés ont été développés chez un grand nombre de mammifères, allant de la souris jusqu'au poney (257). Dans cette approche, un morceau de cathéter, un disque ou une cage est inséré dans la poche sous-cutanée afin qu'un biofilm se forme sur le matériel. L'inoculation peut se faire dans un même temps, afin d'être représentative des infections en bloc opératoire, ou plusieurs semaines après. La possibilité d'utiliser différents matériaux (teflon, silicone, acier inoxydable, polyuréthane) est particulièrement intéressante pour étudier l'impact des composants sur l'adhésion. L'utilisation d'une cage offre l'avantage de pouvoir récupérer des bactéries sans explantations du matériel. *Rupp et al* ont pu mettre en avant l'importance de l'hémagglutinine et du PIA chez *S. epidermidis* dans ce modèle, la souche sauvage provoquant des abcès plus importants et adhérant mieux au matériel que les souches délétées pour ces gènes (258). A l'inverse, *Francois et al* ont observé l'absence de différence entre des souches *ica*-positive et leurs mutants *ica*-négatifs dans un modèle d'infection sur cage (259).

#### **2.4.3.4 Les modèles d'implants intrapéritonéaux**

Ces méthodes reposent sur l'insertion d'un matériel dans la cavité intrapéritonéale d'une souris ou d'un lapin. Le matériel peut être pré-infecté ou infecté post-opération. L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet de suivre l'infection sur plusieurs mois, pouvant être représentative de la chronicité retrouvée chez le patient et permettant l'étude de l'évolution de la souche *in vivo* (260).

#### 2.4.3.5 Les modèles d'infections urinaires

Ces modèles reposent sur l'insertion chirurgicale d'un matériel (disque en zinc, billes en verre, tube en polyéthylène, stent) dans la vessie afin qu'un biofilm puisse se former (261). Le matériel implanté peut être colonisé ou l'inoculation peut se faire post-chirurgie. Plus récemment, une équipe a réussi une mise en place transurétrale du matériel sans chirurgie (262). Ces modèles permettent notamment d'étudier l'efficacité de traitement de surface afin de prévenir la colonisation du matériel (263,264).

#### 2.4.3.6 Les modèles d'infections ostéoarticulaires

En raison de la complexité physiopathologique des IOA et de leurs prises en charge particulières associant dans la majorité des cas une antibiothérapie à une chirurgie, l'utilisation de modèles animaux pertinents est obligatoire dans un processus d'amélioration de la prise en charge. En raison de l'hétérogénéité des IOA, de nombreux modèles *in vivo* ont été développés afin de mimer au mieux la réalité clinique de ces infections.

En 1970, Norden a mis au point un modèle d'ostéomyélite chronique chez le lapin basé sur l'injection intramédullaire d'un agent sclérosant (le morrhuate de sodium à 5 %) dans le tibia suivi d'une infection avec un faible inoculum à *S. aureus* ( $10^4$  ou  $10^6$  UFC), l'agent sclérosant seul ou l'inoculation seule n'étant pas suffisant pour induire l'infection (265,266). L'infection va alors progresser vers les tissus adjacents provoquant des lésions et séquestres osseuses. Il est possible de débiter les traitements plusieurs semaines après l'inoculation, afin d'être proche des conditions d'une IOA chronique. Ce modèle a également été adapté chez le rat par *Zak et al*, les animaux résistant mieux aux effets secondaires d'une antibiothérapie longue, le dénombrement étant plus simple et le coût des expériences plus faible (267).

Afin d'évaluer l'efficacité des ciments chargés aux antibiotiques, un modèle a été développé chez le chien par *Fitzgerald et al* (268). Une fenêtré corticale est enlevée dans la métaphyse tibiale et un fort inoculum de *S. aureus* ( $10^9$  UFC) est injecté. L'os est ensuite refermé avec un ciment. Ce modèle a également été adapté chez le lapin par *Rodeheaver et al* (269) et chez le rat par *Gerhart et al* (270).

Afin d'évaluer les traitements aussi bien des antibiotiques que de l'acte chirurgical effectué lors de la prise en charge des IOA sur matériel, de nombreux modèles avec insertion d'implants ont été développés. *Erendberg et al* ont par exemple inséré une barre intramédullaire en acier inoxydable au niveau du fémur chez le lapin avant inoculation. Ils ont ainsi pu observer que l'infection à *S. aureus*, une fois mise en place, persistait malgré le retrait du matériel et le débridement du tissu infecté,

permettant d'évaluer l'acte chirurgical (271). Certains auteurs provoquent également des fractures avant la mise en place du matériel d'ostéosynthèse afin de mimer une infection post-traumatique (272,273).

## 2.5 Physiopathologie du biofilm dans les infections ostéo-articulaires

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre [1.2.2](#), les IOA peuvent être classées selon le délai entre le début des symptômes et le diagnostic. Si ce délai est supérieur à 3 semaines, l'infection est dite chronique et est souvent associée à la présence d'un biofilm. Les conséquences peuvent être importantes aussi bien en terme clinique (adaptation du traitement antibiotique nécessaire, prise en charge chirurgicale différente, diagnostic plus complexe) que physiopathologique (modulation de la réponse immunitaire, destruction osseuse).

### 2.5.1 Initiation du biofilm

La présence de matériel d'ostéosynthèse ou prothétique offre à la bactérie une surface sur laquelle adhérer et former un biofilm. Peu de temps après la mise en place du matériel, ce dernier est rapidement recouvert de protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte, permettant aux bactéries introduites ou restantes (lors d'un débridement) de coloniser et d'initier un biofilm (274). La composition du matériel est variable et différente selon les pièces. Différents composants sont utilisés comme le titane et ses alliages, l'acier inoxydable, le chrome-cobalt, le silicone, les céramiques, l'hydroxyapatite ou le polyéthylène. Dans certains cas, des matériaux plus rares comme le carbone ou une prothèse recouverte d'argent peuvent être également employés (275,276). Chaque composant possède ses propres caractéristiques physico-chimiques et mécaniques, pouvant influencer les risques d'infections (277,278). Généralement, l'adhésion bactérienne est corrélée à la rugosité du matériel (279). En dehors de l'adhésion, le matériel ne semble pas influencer les autres étapes de la formation de biofilm (280,281).

Dans le cas d'ostéomyélites natives, un biofilm peut également se former sur un tissu osseux nécrosé. Le tibia et le fémur sont les sites les plus à risque en raison d'un flux sanguin plus faible. La présence d'un traumatisme et d'un hématome prédispose également au risque d'infection hémotogène chez l'enfant (282). Une fois la bactérie inoculée, la réponse inflammatoire, l'augmentation de la pression osseuse et la diminution du pH provoquée par la cellulite locale induisent une nécrose du tissu osseux (283). Un *sequestrum* peut alors se former (figure 13). Si

l'infection perdure, un *involucrum*, correspondant à une croissance osseuse en dehors de l'os existant, peut également apparaître (284). Un biofilm peut alors se mettre en place sur ces structures, compliquant la prise en charge thérapeutique. Un débridement est souvent nécessaire.



**Figure 13 : Radiographie d'une ostéomyélite chronique d'après une présentation du Dr. Faran Mahmood publié dans Health & Medicine, Technology.**

Récemment, une équipe de recherche a étudié le rôle direct du biofilm sur la destruction osseuse dans le but d'expliquer la lyse osseuse observée en cliniques (285). Grâce à des modèles *in vitro* et *ex vivo*, ils ont constaté que *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *S. mutans* étaient capables de former un biofilm sur un tissu minéralisé (dentine), favorisant la destruction du tissu osseux *via* des variations de pH. Cette étude faisait suite à leurs travaux montrant la capacité des biofilms à lyser l'hydroxyapatite (286). Cependant, ces deux études ne tiennent pas compte de la réponse immunitaire, la confirmation sur modèles *in vivo* n'ayant pas été réalisée.

L'impact d'un biofilm staphylococcique sur les cellules osseuses a également été étudié (287). *Sanchez et al* ont utilisé un surnageant de culture de biofilm et ont observé l'effet des molécules du biofilm présentes dans le surnageant sur les ostéoblastes (cellules formatrices de l'os) et les ostéoclastes (cellules responsables de la résorption osseuse). Ils ont ainsi pu observer une diminution de la viabilité ostéoblastique, une inhibition de la différenciation ostéogénique et une surexpression du facteur pro-ostéoclastique RANK-L, suggérant que les facteurs solubles produits par les biofilms staphylococciques sont à l'origine de la perte osseuse observée cliniquement

### 2.5.2 Réponse immunitaire

Un dispositif médical peut-être caractérisé par sa biocompatibilité. Ce terme regroupe la non-toxicité du matériel, la réponse immunitaire induite et l'absence d'effet secondaire (288). Une biocompatibilité optimale correspond à une intégration totale du matériel et une réponse inflammatoire faible au contact des tissus. A l'inverse, un matériel peut induire une inflammation chronique et conduire à une encapsulation fibreuse. Une réponse inflammatoire trop importante, notamment via l'activation du complément, induit une désensibilisation des leucocytes et des dysfonctionnements phagocytaires conduisant à un risque infectieux sur site plus important (18,289).

En 1984, *Costerton et al* ont mis en avant, dans un contexte infectieux, que la présence d'un biofilm stimule la réponse immunitaire et attire les macrophages sur site via un mécanisme de relargage d'antigènes. La phagocytose est inefficace sur des bactéries sessiles, mais la libération d'enzymes par les phagocytes endommage les tissus alentours, pouvant provoquer un descellement de la prothèse et une dissémination de l'infection (figure 14) (74).

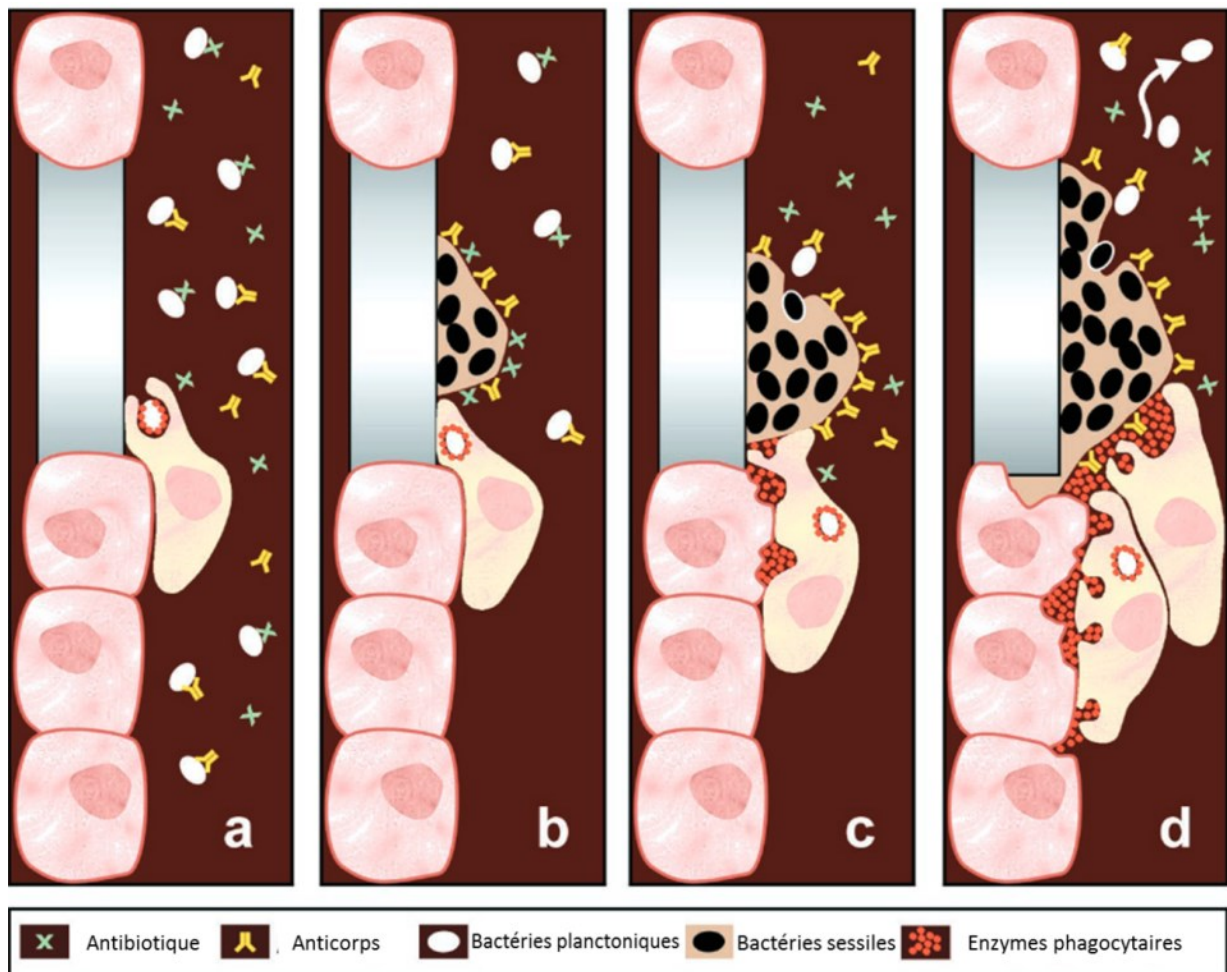


Figure 14 : Impact de la formation d'un biofilm sur la réponse phagocytaire. D'après Costerton et al (74).

Plus récemment, des équipes ont observé que les biofilms staphylococciques pouvaient induire une réaction immunitaire suppressive anti-inflammatoire par le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (187,290). Ces cellules atténuent l'activation des macrophages et des lymphocytes T favorisant la persistance du biofilm. De plus, une étude a montré que la sécrétion d' $\alpha$  toxine et de la leukocidine A/B (LukAB) par les biofilm de *S. aureus* agissait de manière synergique pour prévenir la phagocytose par les macrophages, et diminuer leur recrutement (291). Au final, la réponse immunitaire face à un biofilm est complexe. Sa compréhension est cruciale et pourrait conduire à de nouvelles approches thérapeutiques.

### 2.5.3 Impact dans le diagnostic

La présence d'un biofilm peut compliquer le diagnostic d'une IOA. La méthode standard de culture est en effet peu adaptée pour détecter les bactéries sessiles. Neut et al ont par exemple observé un

taux de sensibilité de 41 % lorsque les tissus seuls étaient mis en culture, alors que la sensibilité atteignait 86 % si le matériel était « gratté » et incubé (292). Face à l'absence de culture positive, et face à un patient présentant peu de symptômes, il n'est pas rare de conclure faussement à un descellement aseptique du matériel. Afin de remédier à cela, d'autres méthodes peuvent être envisagées, plus sensibles pour la détection des bactéries en biofilm.

L'un des moyens les plus simples et économiques pour améliorer la sensibilité de la culture conventionnelle de matériel est la sonication. Son principe repose sur la propagation d'ultrasons dans un milieu liquide provoquant l'apparition de millions de microbulles (cavitation) qui vont imploser, libérant une énergie suffisante pour détacher les bactéries adhérentes. Grâce à cette méthode, *Trampuz et al* ont pu mettre en évidence une augmentation de la sensibilité de 18 % (60,8 % vs. 78,5 %), et de 30 % si le patient avait reçu une antibiothérapie dans les 14 jours précédant la chirurgie (45 % vs. 75 %) (40). D'autres auteurs ont également confirmé l'amélioration de la sensibilité (293,294). Cependant, des défauts en termes de sensibilité, et un risque accru de contamination ont également été rapportés, expliquant l'absence de ce protocole dans de nombreux laboratoires hospitaliers (295).

Les méthodes moléculaires, notamment la PCR 16S, permettent l'identification du pathogène dans la grande majorité des cas (296). *Hall-Stoodley et al* ont démontré la possibilité de combiner cette approche avec une méthode d'hybridation *in situ* en fluorescence (Fluorescence in situ hybridization – FISH) afin de détecter directement la présence de biofilm (297). Cependant, le coût important de ces approches, l'expertise, les risques de contamination et l'absence d'amorces pertinentes pour les IOA sur matériel limitent leur utilisation en routine.

## 2.6 Prévention de la formation de biofilm

Dans cette partie, nous n'aborderons que les approches permettant d'empêcher la formation d'un biofilm (aspect préventif). Les traitements sur un biofilm déjà formé seront abordés dans la partie [3.3.6](#).

Afin de prévenir la formation d'un biofilm, plusieurs approches peuvent être envisagées. Dans le cadre des IOA sur matériel, une prophylaxie est généralement recommandée au moment de la pose du matériel orthopédique (24). L'objectif est d'atteindre une concentration d'antibiotique sur site capable d'éliminer les bactéries résiduelles après désinfection de la peau ou présentes au bloc opératoire.

Une autre approche consiste à recouvrir les prothèses avec un antibiotique, ou à utiliser des ciments chargés en antibiotiques lors des chirurgies. Ces deux méthodes permettent de libérer localement de fortes concentrations d'antibiotique non atteignables par voie intraveineuse ou par voie orale. L'utilisation de ciments en polyméthylméthacrylate (PMMA) chargés en antibiotique est fréquente en clinique (298). Cependant, ces ciments peuvent agir comme une surface sur laquelle un biofilm peut se former. De plus, ils doivent être retirés chirurgicalement. C'est pourquoi d'autres approches ont été développées, utilisant notamment des matériaux résorbables comme le calcium-sulfate ou calcium hydroxyapatite ou des matériaux recouvrant directement les prothèses (299,300). Plusieurs modèles *in vivo* ont montré que le recouvrement de la prothèse avec de la minocycline/rifampicine ou gentamicine/hydroxyapatite prévenait la formation de biofilm (301–303). L'utilisation d'argent a également été évalué en clinique et a montré des résultats prometteurs (304). Des résultats similaires ont été obtenus avec un substitut osseux résorbable imprégné de gentamicine ou de vancomycine (305).

L'utilisation d'un chélateur comme l'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) a également montré une activité préventive sur la formation des biofilms staphylococciques (306,307). D'autres molécules comme le furanone, une substance produite par une algue, la thymoquinone provenant de la nigelle, ou le miel possèdent une activité préventive (308–310). L'utilisation de phages a également été étudiée par certains auteurs, et a démontré une activité préventive et curative sur les biofilms staphylococciques (311,312). D'autres approches se focalisent sur des inhibiteurs du quorum sensing. En 2005, *Balaban et al* ont par exemple décrit l'utilisation d'un peptide inhibant l'acide ribonucléique III (RNAIII), empêchant la formation de biofilm sur toutes les espèces de staphylocoques (313).

Enfin, la modification de la surface du matériel peut également empêcher les bactéries d'adhérer. *Kenneth et al* ont par exemple réussi à modifier la surface d'un matériel en prenant comme modèle la peau des requins, diminuant drastiquement l'adhésion bactérienne (314).

Au final, de nombreuses études sont en cours afin d'évaluer l'efficacité de molécules empêchant l'installation en biofilm. En cas d'infection sur prothèse, nous avons vu que le risque de recolonisation du matériel est important. C'est pourquoi, il est nécessaire d'élaborer de nouvelles approches afin d'améliorer la prise en charge de ces cas. Des protocoles utilisant des antibiotiques sont prometteur et pourrait voir le jour dans les années à venir. Cependant, l'activité préventive des antibiotiques reste à ce jour encore méconnu.



### **3 LES ANTIBIOTIQUES**

Les informations des chapitres 3.2 *Classification* et 3.3 *Efficacité de l'antibiothérapie* proviennent des références bibliographiques suivantes : (315–317)

#### **3.1 Généralités**

Un antibiotique se définit comme une substance naturelle ou synthétique possédant une toxicité sélective et capable d'inhiber la croissance d'une bactérie ou de la tuer. On parlera de bactériostase dans le premier cas, et de bactéricidie dans le second. Un antibiotique peut avoir une activité bactériostatique à faible dose et une activité bactéricide à forte dose. La découverte dans les années 1930 des antibiotiques a révolutionné la médecine, augmentant l'espérance de vie humaine de plus de 10 ans. Le premier antibiotique identifié fut la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 (318). Cependant, ce ne fut pas le premier antibiotique utilisé en clinique. En effet, après sa découverte, la pénicilline tomba dans l'oubli, et il fallut attendre la publication des travaux d'Ernest Fourneau sur la sulfanilamide en 1937 pour ouvrir la voie de l'antibiothérapie (319). À partir de cette époque, commence l'Âge d'Or des antibiotiques pendant laquelle la grande majorité des molécules utilisées à ce jour est découverte. Cependant, cette formidable expansion des antibiotiques s'accompagne également de la sélection et de l'augmentation de la prévalence de la résistance bactérienne.

Comme expliqué précédemment, un antibiotique peut être bactériostatique ou bactéricide. La bactériostase se caractérise par la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspondant à la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber toute croissance visible de la bactérie après 18 heures d'incubation, tandis que la bactéricidie se caractérise par la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), correspondant à la plus faible concentration d'antibiotique laissant après 18 h d'incubation un pourcentage de survivants inférieurs à 0,01 % de l'inoculum de départ. Un antibiotique est bactéricide si la CMI et la CMB sont proches. À l'inverse, un antibiotique est bactériostatique si le rapport CMB/CMI est supérieur ou égal à 32.

#### **3.2 Classification**

La classification des antibiotiques se fait généralement en fonction de leur mécanisme d'action. Ainsi, on peut distinguer les antibiotiques en trois groupes distincts en fonction du site bactérien sur lequel ils agissent :

- les antibiotiques actifs sur la **paroi**
- les antibiotiques actifs sur la **membrane** cytoplasmique
- les antibiotiques actifs sur les processus intra-**cytoplasmiques**

Un deuxième niveau de classement est alors possible au sein de ces trois groupes. Cette fois-ci, on s'intéresse à la structure chimique de la molécule, permettant de regrouper les antibiotiques par famille. On distingue alors :

- parmi les antibiotiques actifs sur la paroi
  - o les bêta-lactamines ( $\beta$ -lactamines)
  - o les glycopeptides
  - o la fosfomycine
- parmi les antibiotiques actifs sur la membrane cytoplasmique
  - o les polymyxines (non actifs sur les Gram +)
  - o la daptomycine
- parmi les antibiotiques actifs sur les processus intra-cytoplasmiques
  - o les aminosides
  - o les cyclines
  - o les macrolides, lincosamides, streptogramines, kétolides (MLSK)
  - o les phénicolés
  - o l'acide fusidique
  - o les oxazolidinones
  - o les quinolones
  - o les rifamycines
  - o les nitroimidazolés
  - o les nitrofuranes
  - o les sulfamides
  - o les diaminopyrimidines

Les mécanismes d'action et de résistance des antibiotiques actifs sur les staphylocoques sont décrits en annexe ([Cf. 4.6 Mécanismes d'action des antibiotiques](#)).

### 3.3 Efficacité de l'antibiothérapie

Le choix de l'antibiothérapie est complexe et dépend de plusieurs critères :

- des critères **bactériologiques**, correspondant à l'activité de l'antibiotique au contact du microorganisme. Ces critères sont évalués en laboratoire par des méthodes *in vitro* et permettent de caractériser la souche comme sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique,
- des critères **pharmacocinétiques** (PK) et **pharmacodynamiques** (PD) qui prennent en compte la posologie, la voie d'administration, la durée du traitement chez le patient. Ces paramètres influencent de façon majeure l'efficacité *in vivo* de l'antibiotique.

Les antibiotiques disponibles sont définis selon un spectre d'activité microbien reflétant les espèces sur lesquelles ils sont normalement actifs. Cependant, en raison de l'acquisition possible de mécanismes de résistance, il est nécessaire d'évaluer *in vitro* le niveau de sensibilité des bactéries au travers de la réalisation d'un antibiogramme, afin de permettre au clinicien de choisir l'antibiothérapie adéquate.

#### 3.3.1 Spectre d'activité microbien

Il est possible d'associer à chaque antibiotique une liste d'espèces bactériennes constituant le **spectre d'activité** de la molécule (tableau 3). Ces données renseignent sur la résistance naturelle et sur la prévalence de la résistance acquise des bactéries face à un antibiotique. Cette dernière donnée peut évoluer au cours du temps et peut être très variable selon les pays, voire selon les régions, les hôpitaux, l'âge des patients, les formes cliniques, etc. Pour chaque antibiotique, les espèces sont réparties en trois catégories :

- les espèces **sensibles** composées de souches naturellement sensibles, c'est-à-dire inhibées par des concentrations atteintes après administration du médicament aux posologies validées par l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM),
- les espèces **modérément sensibles** : antibiotique modérément actif sur la majorité des souches de l'espèce, nécessitant des concentrations de l'antibiotique supérieures à la CMI (posologie élevée),
- les espèces **résistantes** composées de souches naturellement résistantes ou d'une majorité de souches ayant acquis une résistance, entraînant des échecs thérapeutiques en cas d'administration.

Toutefois, l'activité d'un antibiotique vis-à-vis d'une espèce **sensible** ou **modérément sensible** peut être remise en cause suite à l'acquisition d'un mécanisme de résistance chez une souche clinique. La prescription probabiliste devient alors aléatoire. La réalisation d'un antibiogramme est donc nécessaire pour être certain que la souche soit sensible ou résistante à l'antibiotique.

Antibiotiques	Famille	Concentration critique		<i>S. aureus</i>		SCN		<i>Staphylococcus méthi-S</i>		<i>Staphylococcus méthi-R</i>	
		c	C	catégorie	Fq Res	catégorie	Fq Res	catégorie	Fq Res	catégorie	Fq Res
ACIDE FUSIDIQUE	ACIDE FUSIDIQUE	2	16	sensible		sensible	Fr 5 - 20 %				
AMIKACINE		8	16					sensible		résistant	
DIBEKACINE		4	8					sensible		résistant	
NETILMICINE		4	8					sensible		sensible	Fr 40 - 60 %
FRAMYCETINE, KANAMYCINE, NEOMYCINE	AMINOSIDES	8	16					sensible		sensible	
GENTAMICINE, SISOMICINE		4	8					sensible		sensible	Fr 40 - 60 %
ISEPAMICINE		8	16					sensible		résistant	
TOBRAMYCINE		4	8					sensible	Eu 0 - 20 %	résistant	
AMOXICILLINE		4	16	résistant		résistant		résistant		résistant	
AMOXICILLINE + ACIDE CLAVULANIQUE		4	16					sensible		résistant	
AMPICILLINE, BACAMPICILLINE, HETACILLINE, METAMPICILLINE, PIVAMPICILLINE	PÉNICILLINES A	4	16	résistant		résistant		résistant		résistant	
AMPICILLINE + SULBACTAM		4	16					sensible		résistant	
PÉNICILLINE G	PÉNICILLINE G	0,25	16	résistant		résistant		résistant		résistant	
CLOXACILLINE, DICLOXACILLINE, FLUCLOXACILLINE, OXACILLINE	PÉNICILLINES M	2	2					sensible		résistant	
PENICILLINE V	PÉNICILLINE V										
MEZLOCILLINE, PIPERACILLINE		8	32	résistant		résistant		résistant		résistant	
PIPERACILLINE + TAZOBACTAM	CARBOXY- UREIDO- PENICILLINES	8	64					sensible		résistant	
TICARCILLINE		16	64	résistant		résistant		résistant		résistant	
TICARCILLINE + ACIDE CLAVULANIQUE		16	64					sensible		résistant	
ERTAPENEME		2	8					sensible	Eu 0 - 5 %	résistant	
IMIPENEME, MEROPENEME	CARBAPÉNÈMES	4	8					sensible		résistant	
CEFALEXINE, CEFRADINE		8	32					sensible		résistant	
CEFATRIZINE, CEFACLOR, LORACARBEF		2	8					sensible		résistant	
CEFADROXIL	CEPHALOSPORINES	8	32					sensible		résistant	
CEFALEXINE (voie injectable), CEFALOTINE, CEFALORIDINE, CEFAPIRINE, CEFAZOLINE, CEFRADINE (voie injectable)	1ère GENERATION	8	32					sensible		résistant	
CEFUROXIME AXETIL		1	4					sensible		résistant	
CEFAMANDOLE	CEPHALOSPORINES	8	32					sensible		résistant	
CEFOXITINE	2ème GENERATION	8	32					sensible		résistant	
CEFUROXIME		8	32					sensible		résistant	
CEFIXIME		1	2	résistant		résistant		résistant		résistant	
CEFOTIAM HEXETIL		1	2					sensible		résistant	
CEFPODOXIME PROXETIL		1	2					modérément sensible		résistant	
CEFEPIME		4	32					sensible		résistant	
CEFOPERAZONE		4	32					modérément sensible		résistant	
CEFOTAXIME		4	32					sensible		résistant	
CEFOTETAN	CEPHALOSPORINES	4	32					sensible		résistant	
CEFOTIAM	3ème GENERATION	4	32					sensible		résistant	
CEFPIROME		4	32					sensible		résistant	
CEFSULODINE		8	32					modérément sensible		résistant	
CEFTAZIDIME		4	32					modérément sensible		résistant	
CEFTIZOXIME		4	32					sensible		résistant	
CEFTRIAXONE		4	32					sensible		résistant	
LATAMOXEF		4	32					modérément sensible		résistant	
CHLORTETRACYCLINE, DOXYCYCLINE, LYMECYCLINE, METACYCLINE, MINOCYCLINE, OXYTETRACYCLINE, TETRACYCLINE	CYCLINES	4	8					sensible		sensible	Fr 70 - 80 %
FOSFOMYCINE	FOSFOMYCINE	32	32					sensible		sensible	Fr 2 - 40 %
TEICoplanine	GLYCOPEPTIDES	4	16	sensible		sensible	Fr 5 - 15 %				
VANCOMYCINE		4	16	sensible		sensible					
TELITHROMYCINE	KETOLIDES	0,5	2	sensible* / résistant**							
CLINDAMYCINE, LINCOMYCINE	LINCOSAMIDES	2	2					sensible		sensible	Fr 70 - 80 %
AZITHROMYCINE		0,5	4					sensible		sensible	Fr 70 - 80 %
CLARITHROMYCINE, ERYTHROMYCINE, JOSAMYCINE, MIDECAMYCINE, ROXITHROMYCINE, SPIRAMYCINE	MACROLIDES	1	4					sensible		sensible	Fr 70 - 80 %
DIRITHROMYCINE		0,12	4					sensible		sensible	Fr 70 - 80 %
ERYTHROMYCINE-SULFISOXAZOLE								sensible		sensible	Fr 70 - 80 %
MUPIROCINE (voie nasale)	MUPIROCINE	2	2	sensible							
MUPIROCINE (voie cutanée)		2	2	sensible							
NITROFURANTOINE	NITROFURANES	32	128					sensible***			
LINEZOLIDE	OXAZOLIDINONE			sensible		sensible					
CHLORAMPHENICOL, THIOPHENICOL	PHÉNICOLÉS	8	16	sensible		sensible		sensible		sensible	
ACIDE NALEDIXIQUE, ACIDE PIPEMIDIQUE		8	16	résistant		résistant		résistant		résistant	
ACIDE OXOLINIQUE	QUINOLONES	2	4	résistant		résistant		résistant		résistant	
FLUMEQUINE		4	8	résistant		résistant		résistant		résistant	
CIPROFLOXACINE, ENOXACINE, LOMEFLOXACINE, LEVOFLOXACINE, OFLOXACINE, PEFLOXACINE	FLUOROQUINOLONES	1	2					sensible		résistant	
MOXIFLOXACINE		1	4					sensible****		résistant****	
NORFLOXACINE		1	2					sensible	Eu 0 - 16 %	résistant	
RIFAMPICINE	RIFAMPICINE	0,5	16	sensible*****		sensible	Fr 0 - 25 %			sensible	Fr 2 - 30 %
SULFAMIDES	SULFAMIDES	64	256	sensible	Fr 10 - 80 %	sensible	Fr 20 - 90 %				
DALFOPRISTINE – QUINUPRISTINE		0,5	2	sensible	Eu 0 - 0,5 %						
PRISTINAMYCINE	SYNERGISTINES OU STREPTOGRAMINES	1	2	sensible		sensible					
VIRGINIAMYCINE		1	2	sensible		sensible					
TRIMETHOPRIME	TRIMETHOPRIME	4	8	sensible		sensible	Fr 5 - 40 %				
TRIMETHOPRIME + SULFAMIDES	TRIMETHOPRIME + SULFAMIDES	2	8	sensible		sensible	Fr 5 - 40 %				

\**S. aureus* sensible ou résistant à l'érythromycine A par un mécanisme MLSB inducible

\*\* *S. aureus* résistant à l'érythromycine A par un mécanisme MLSB constitutif (80% SARM)

\*\*\* *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*

\*\*\*\* valable pour l'espèce *aureus*

\*\*\*\*\* méthi-S

Fq Res : fréquence de résistance acquise en France (Fr) ou en Europe (Eu)  
méthi : méthiilline

**Tableau 3 : Résumé de l'activité des antibiotiques sur les staphylocoques d'après le rapport de l'ANSM (ex-Afssaps) de novembre 2005**

### 3.3.2 Principe de l'antibiogramme

L'antibiogramme regroupe différentes techniques permettant de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Son principe repose sur la mise en contact *in vitro* de la bactérie à tester avec l'antibiotique et sur l'observation des conséquences sur la croissance et la survie bactérienne.

En fonction de la méthode utilisée, deux types de valeur sont recherchées: i) la **Concentration Minimale Inhibitrice** (CMI) pour les méthodes en milieu liquide, correspondant à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible de la bactérie à 18 h ; ii) le **diamètre de la zone d'inhibition** pour les méthodes en milieu gélosé. Ces deux approches seront détaillées dans la partie [3.3.3](#).

Afin de catégoriser cliniquement la sensibilité de la souche à un antibiotique, c'est-à-dire de prédire le **succès** ou l'**échec** clinique du traitement antibiotique, les CMI ou les diamètres d'inhibition sont comparés à des valeurs critiques (concentrations critiques ou diamètres critiques) définis par les comités d'experts nationaux ou internationaux tels que le CASFM (Français) ou l'EUCAST (Européen) (figure 15). La souche est catégorisée :

- **sensible** si sa CMI est inférieur ou égale à la concentration critique inférieure (c), ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique supérieur (D),
- **résistante** si sa CMI est supérieur à la concentration critique supérieure (C), ce qui équivaut à un diamètre inférieur ou égal au diamètre critique inférieur (d),
- **intermédiaire** si sa CMI est comprise entre c et C, ce qui équivaut à un diamètre compris entre d et D.

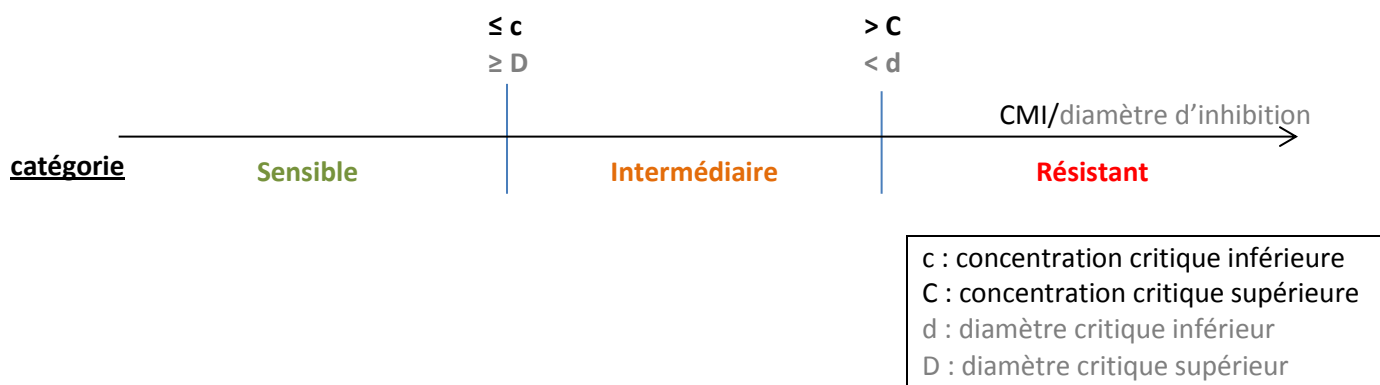


Figure 15 : Schéma de la catégorisation clinique en fonction des CMI et des diamètres d'inhibitions.

Les comités comme le CASFM se basent sur trois approches pour définir les valeurs critiques.

- Une approche clinique : elle est basée sur les relations entre les résultats d'études cliniques et bactériologiques, et les indications thérapeutiques retenues par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Les souches **sensibles** sont celles pour lesquelles la **probabilité de succès thérapeutique est acceptable** avec la posologie recommandée. Les souches **résistantes** sont celles pour lesquelles il existe une **forte probabilité d'échec** thérapeutique quelle que soit la posologie. Les souches **intermédiaires** sont celles pour lesquelles le succès est **imprévisible**.

- Une approche microbiologique et épidémiologique : cette approche s'appuie sur l'étude des distributions des CMI et des diamètres d'inhibitions des populations bactériennes des différentes espèces, possédant ou non un mécanisme de résistance. Cette distribution peut être simple (bimodale) permettant d'individualiser facilement deux populations (une sensible et une résistante) (figure 16); mais le plus souvent, la répartition apparaît multimodale en raison de l'existence de plusieurs mécanismes de résistance. Sur la base de cette approche, il est possible de déterminer un cut-off épidémiologique permettant de séparer la population **résistante** de la population **sauvage (sensible)**.

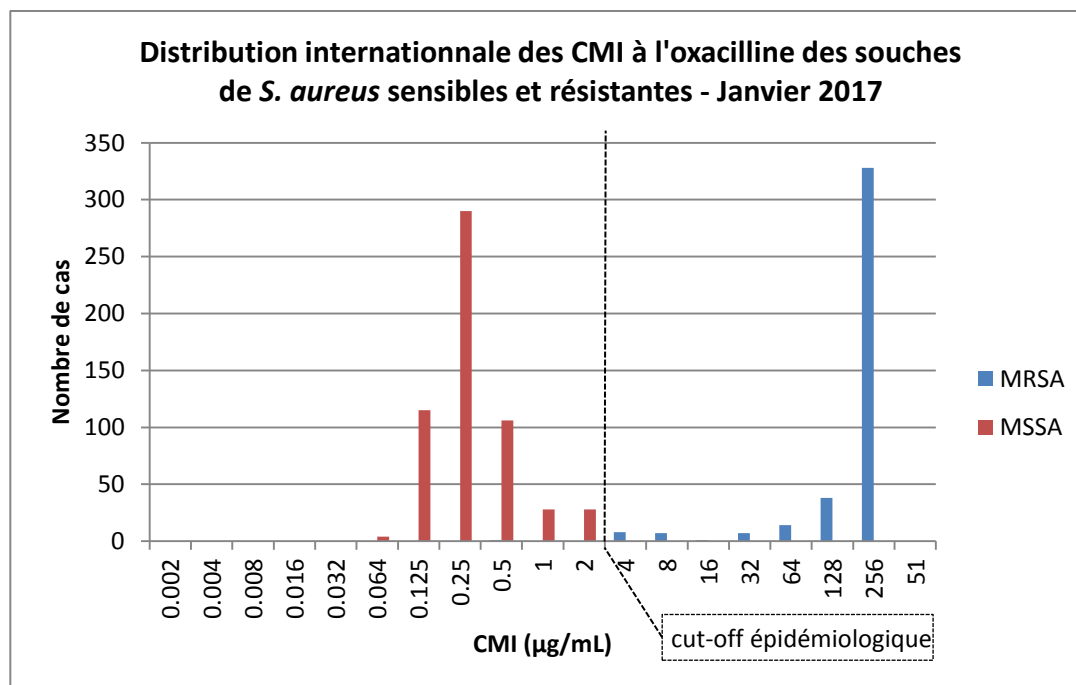


Figure 16 : Distribution internationale des CMI à l'oxacilline de *S. aureus* d'après les données de l'EUCAST de janvier 2017. Exemple d'une distribution bimodale. <http://www.eucast.org>

- Une approche pharmacocinétique de l'antibiotique : les critères retenus sont la mesure de l'absorption (notamment pour les antibiotiques administrés par voie orale), la distribution (concentration sérique maximale (C<sub>max</sub>) et temps d'obtention (T<sub>max</sub>)), vitesse d'élimination, diffusion humorale et tissulaire, pourcentage de liaison aux protéines circulantes), la biotransformation, et les voies d'élimination. Si l'on considère la relation entre la CMI *in vitro* et la concentration au site de l'infection, une souche est dite :

- **sensible** si la CMI est inférieure aux taux sanguins, tissulaires avec un traitement aux doses usuelles,
- **résistantes** si la CMI est supérieure aux concentrations les plus élevées qu'il est possible d'atteindre *in vivo* (C<sub>max</sub>),
- **intermédiaire** si la CMI est supérieure aux taux sanguins et inférieure aux taux obtenus au niveau de certains sites de l'organisme.

La combinaison de ces 3 approches permet de catégoriser cliniquement les souches en S/I/R afin de prédire le succès ou l'échec thérapeutique.

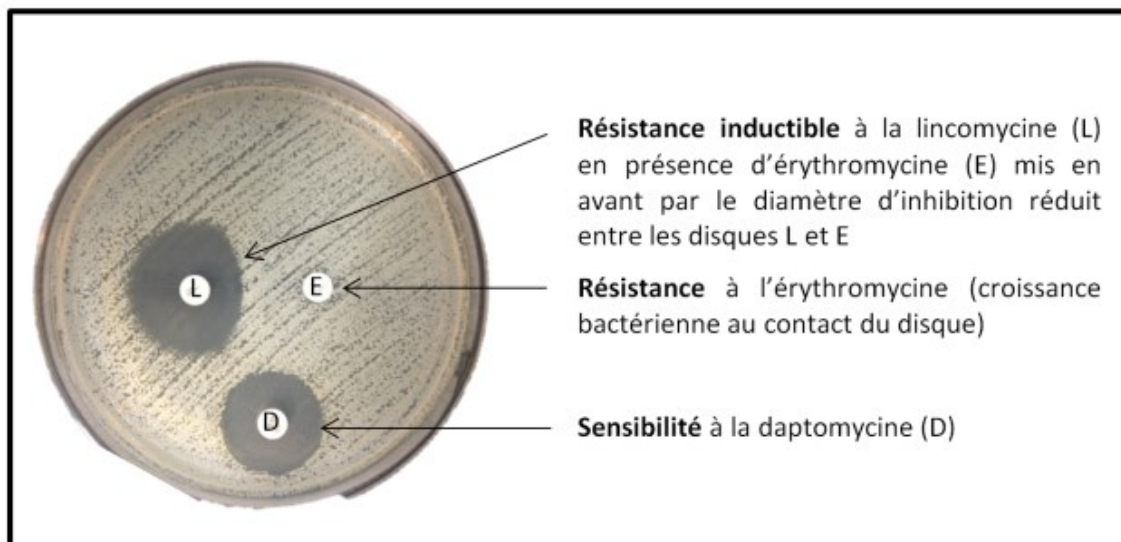
### 3.3.3 Méthodes d'antibiogramme manuelles

#### 3.3.3.1 L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

La méthode d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé est la méthode historique qui reste à ce jour encore très utilisée. Elle repose sur la mise en culture d'un tapis bactérien sur un milieu gélosé sur lequel sont déposés des disques en papier imprégnés de quantités standardisées et fixes des différents antibiotiques (figure 17) (320). La molécule contenue dans le disque va alors diffuser à travers la gélose, créant un gradient de concentration concentrique. Après 18-24 h d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition créée autour de chaque disque est mesuré (historiquement à l'aide d'un pied à coulisse, aujourd'hui automatiquement par une caméra couplée à un logiciel d'analyse d'image) et comparé aux diamètres critiques (d et D, figure 15). Une souche résistante aura un diamètre inférieur au diamètre critique d, étant capable de se multiplier au plus près du disque, c'est-à-dire là où la concentration en antibiotique est forte. À l'inverse, une souche sensible aura un diamètre d'inhibition supérieur au diamètre critique D, indiquant une souche capable de se multiplier uniquement pour de très faibles concentrations d'antibiotiques. Le choix des antibiotiques à tester est primordial et critique car ils permettent la déduction, à partir du phénotype observé, du mécanisme biochimique de résistance correspondant. Une sélection judicieuse permet de couvrir,



avec un nombre restreint de disques, l'ensemble des possibilités thérapeutiques et peuvent permettre également d'observer les phénomènes d'antagonisme, de synergie et d'induction *in vitro* entre deux molécules.



**Figure 17 : Antibiogramme d'une souche de *S. aureus* avec un phénotype MLSB inductible isolé au laboratoire en 2015.**

Il est également possible de déterminer la CMI en milieu solide par diffusion en utilisant des bandelettes imprégnées d'un gradient prédéfini de concentrations croissantes d'antibiotiques (figure 18). Comme l'antibiogramme, la bandelette est appliquée à la surface d'une gélose inoculée avec la souche clinique. L'antibiotique va alors diffuser dans la gélose en quelques secondes avec des concentrations croissantes décrivant des ellipses (et non plus des diamètres). Après incubation, une ellipse d'inhibition se forme autour de la bandelette. La CMI des antibiotiques bactéricides correspond alors à la concentration d'antibiotique noté au niveau de l'intersection entre la bandelette et l'ellipse. Pour les antibiotiques bactériostatiques, la lecture de la CMI correspond à 80 % d'inhibition en tenant compte des macrocolonies.



Figure 18 : E-test céfoxitine d'une souche de *S. aureus* isolée au laboratoire en 2017.

### 3.3.3.2 Détermination des CMI en macro-dilution et micro-dilution

Les méthodes d'antibiogramme en dilutions reposent sur la mise en culture d'une bactérie dans un milieu liquide en présence d'une gamme de concentrations d'antibiotique d'ordre deux (320). Une condition contrôle sans antibiotique (témoin de croissance) et une condition contrôle sans bactérie (témoin de stérilité) sont également préparées. Après 18-24 h d'incubation, la CMI est déterminée visuellement comme la plus petite concentration d'antibiotique ayant inhibé la croissance visible de la souche bactérienne. La méthode peut se faire en tube à hémolyse (macrodilution) ou en plaque 96-puits (microdilution) et permet, tout comme la méthode en diffusion, de catégoriser la souche par comparaison avec les concentrations critiques. Des dispositifs commerciaux comme les plaques Sensitire® (plaques 96-puits) sont disponibles, dans lesquels les antibiotiques lyophilisés au fond des puits sont remis en suspension lors de l'ajout du milieu de culture contenant l'inoculum bactérien (321). Ces plaques permettent de catégoriser l'ensemble des antibiotiques en une seule microplaque en testant les concentrations encadrant les concentrations critiques.

### 3.3.4 Méthodes automatisées

Il existe actuellement 3 méthodes sur le marché offrant des performances sensiblement comparables : le **MicroScan Walk-Away®** (Beckman Coulter), le **Phoenix™** (Becton Dickinson) et le **Vitek® 2** (bioMérieux). L'automatisation repose sur i) la miniaturisation des milieux de culture contenant des concentrations ciblées d'antibiotique dans des systèmes en carte (Vitek®), galerie (Phoenix™) ou microplaque (Walk-Away®), et ii) sur la lecture de la croissance par turbidimétrie (colorimétrie pour le Walk-Away®). La préparation de l'inoculum demeure encore une étape manuelle. Les concentrations d'antibiotique testées encadrent les breakpoints et les CMI

déterminées par les automates Phoenix<sup>TM</sup> et Walk-Away<sup>®</sup> sont des CMI vraies. À l'inverse, le système Vitek<sup>®</sup> calcule les CMI à partir de plusieurs courbes de croissance en présence de concentrations variables d'antibiotique (+ condition contrôle sans antibiotique) sur la base d'algorithmes de calcul et de correspondance avec une base de données.

Ces automates sont couplés à des systèmes d'identification couvrant les principales espèces isolées à l'hôpital. Ils intègrent des systèmes experts associant les mécanismes de résistance à l'identification bactérienne, permettant de détecter de potentiels mécanismes de résistance impossible après confrontation avec l'identification. Ces systèmes tenant compte des recommandations du CASFM-EUCAST sur les concentrations critiques doivent être mis régulièrement à jour.

Le choix d'une méthode automatisée apporte des avantages par rapport aux méthodes en diffusion notamment : un rendu des résultats plus rapide (6 à 8 h contre 18 h pour les méthodes classiques), un gain de temps technique, une meilleure reproductibilité, la possibilité de passer des échantillons à haut débit, une standardisation forte (temps d'incubation, contrôle des réactifs, lecture), l'utilisation de milieu liquide permettant de mieux détecter certains mécanismes de résistances. Cependant, les méthodes automatisées sont également : plus coûteuses, sujettes aux pannes, ne permettent pas la visualisation des interactions (synergie, antagonisme, induction) et sont lourdes en investissement. De plus, le choix des antibiotiques testés est du ressort du fabricant et n'est pas modifiable.

En plus de ces trois automates, il existe des systèmes d'automatisation des lectures d'antibiogrammes en milieu gélosé comme **SIRscan 2000 automatic<sup>®</sup>** (i2A) ou **Osiris<sup>®</sup>/Adagio<sup>®</sup>** (Biorad). Ces systèmes possèdent aussi des systèmes Expert, mais nécessitent la saisie de l'identification. Les méthodes utilisant la méthode par diffusion en milieu gélosé utilisant des disques permet une plus grande souplesse dans le choix des antibiotiques (c'est-à-dire des disques) et de leur fournisseur.



Figure 19 : Photos des différents automates d'antibiogramme et leur support.

### 3.3.5 Pharmacodynamie des antibiotiques

L'antibiogramme est un outil permettant d'aider le clinicien dans le choix du meilleur traitement thérapeutique. Cependant, l'antibiogramme n'est pas le seul critère prédictif de l'activité *in vivo* de l'antibiotique. En effet, d'autres critères entrent en jeu comme la capacité de la diffusion de la molécule jusqu'au site infectieux, les concentrations atteignables (sérique, pic, résiduelle) ou encore la toxicité de la molécule. Tous ces critères sont regroupés autour des termes de pharmacocinétique et pharmacodynamie (PK/PD).

Les objectifs de la pharmacodynamie sont :

- l'optimisation du traitement en évitant les sous-dosages pouvant entraîner un échec thérapeutique,
- la prévention de l'émergence de résistance par sélection *in vivo* de sous-populations résistantes
- l'étude de la tolérance de l'antibiotique chez le patient notamment les risques néphrotoxiques, hépatotoxiques ou cardiotoxiques.

Le choix des paramètres PK/PD à étudier pour prédire l'efficacité *in vivo* des antibiotiques dépendent de la classe de l'antibiotiques, et de l'efficacité bactéricide temps-dépendante ou concentration-dépendante (tableau 4).

<b>Famille d'antibiotique</b>	<b>effet bactéricide</b>
Les bêta-lactamines	Temps-dépendant (322)
Les glycopeptides	Temps-dépendant (322)
Les phosphonopectides	Temps-dépendant(323)
la daptomycine	Concentration-dépendant (322)
les aminosides	Concentration-dépendant (324)
les cyclines	Temps-dépendant (322)
Les macrolides	Concentration-dépendant (325)
Lincosamides	Temps-dépendant (322)
Streptogramines	Temps-dépendant (322)
Les kétolides	Concentration-dépendant (325)
l'acide fusidique	Concentration-dépendant (326)
les oxazolidinone	Temps-dépendant (322)
les quinolones	Concentration-dépendant (322)
les rifamycines	Concentration-dépendant (322)
les nitroimidazolés	Concentration-dépendant (327)
les nitrofuranes	Concentration-dépendant (328)
les sulfamides + diaminopyrimidines	Concentration-dépendant (322)

**Tableau 4 : Effet bactéricides des principaux anti-staphylococciques**

### 3.3.5.1 Temps supérieur à la CMI ( $T > CMI$ )

Il s'agit du temps pendant lequel les concentrations sériques sont supérieures à la CMI de l'antibiotique entre deux administrations. Ce paramètre est important pour les antibiotiques **temps-dépendants**. En effet, l'objectif clinique consiste à l'obtention et au maintien d'une concentration sérique de l'antibiotique supérieure à la CMI de la bactérie responsable de l'infection entre deux injections ( $T > CMI = 100\%$ ).

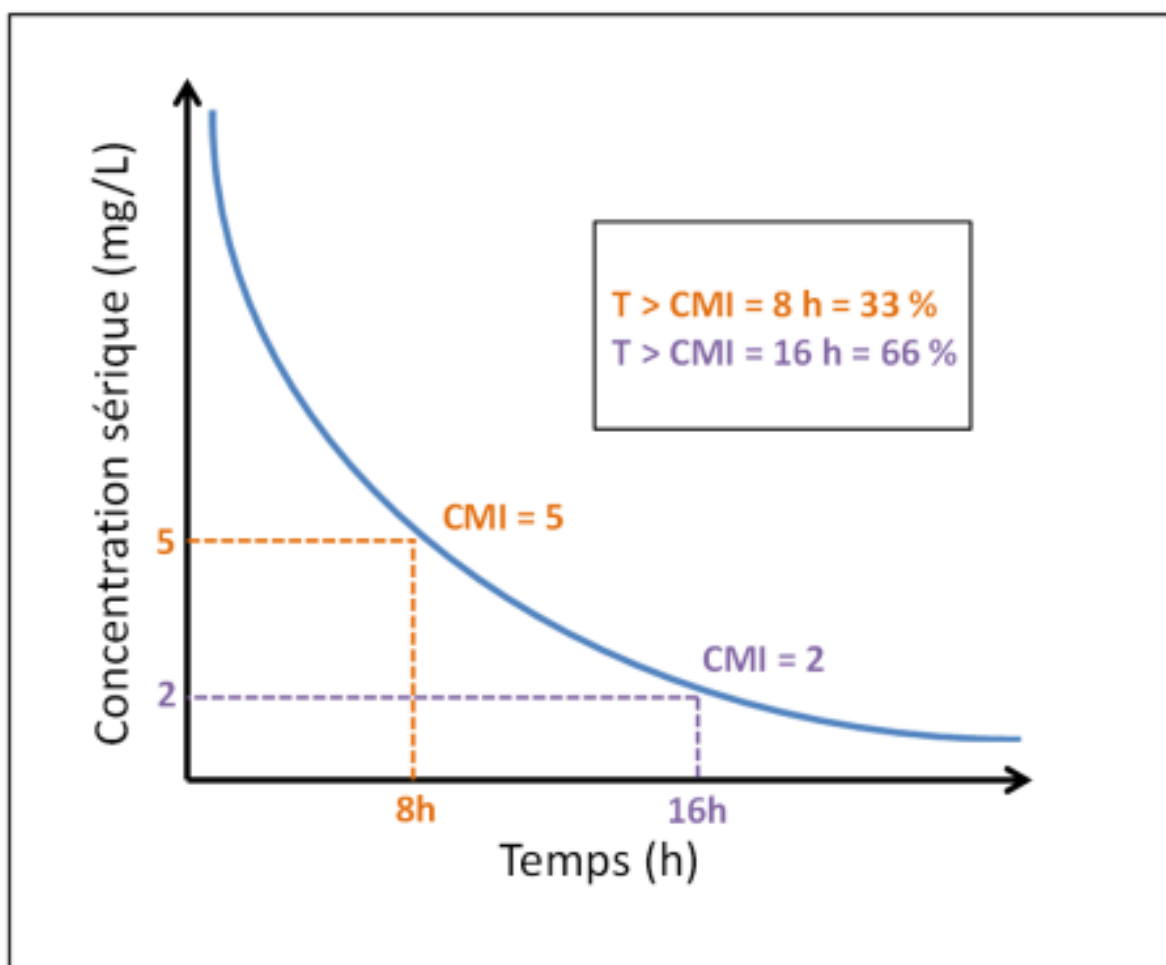


Figure 20 : Schéma de la mesure du temps pendant lequel la concentration sérique d'un antibiotique est supérieure à la CMI ( $T > CMI$ ). Exemple pour deux souches avec une CMI = 2 mg/mL ou CMI = 5 mg/mL pour une administration d'antibiotique journalière.

### 3.3.5.2 Aire sous les courbes rapportées à la CMI (ASC/CMI)

Il s'agit de l'aire sous les courbes des concentrations sériques divisée par la CMI de l'antibiotique. Ce paramètre est important pour les antibiotiques **concentration-dépendants**. Le calcul de l'aire tient compte, par définition, du pic sérique obtenu après injection, révélateur de l'efficacité des antibiotiques à demi-vie courte; et des valeurs résiduelles, révélatrices des antibiotiques à demi-vie longue. Plus le ratio est important, plus l'antibiotique sera bactéricide.

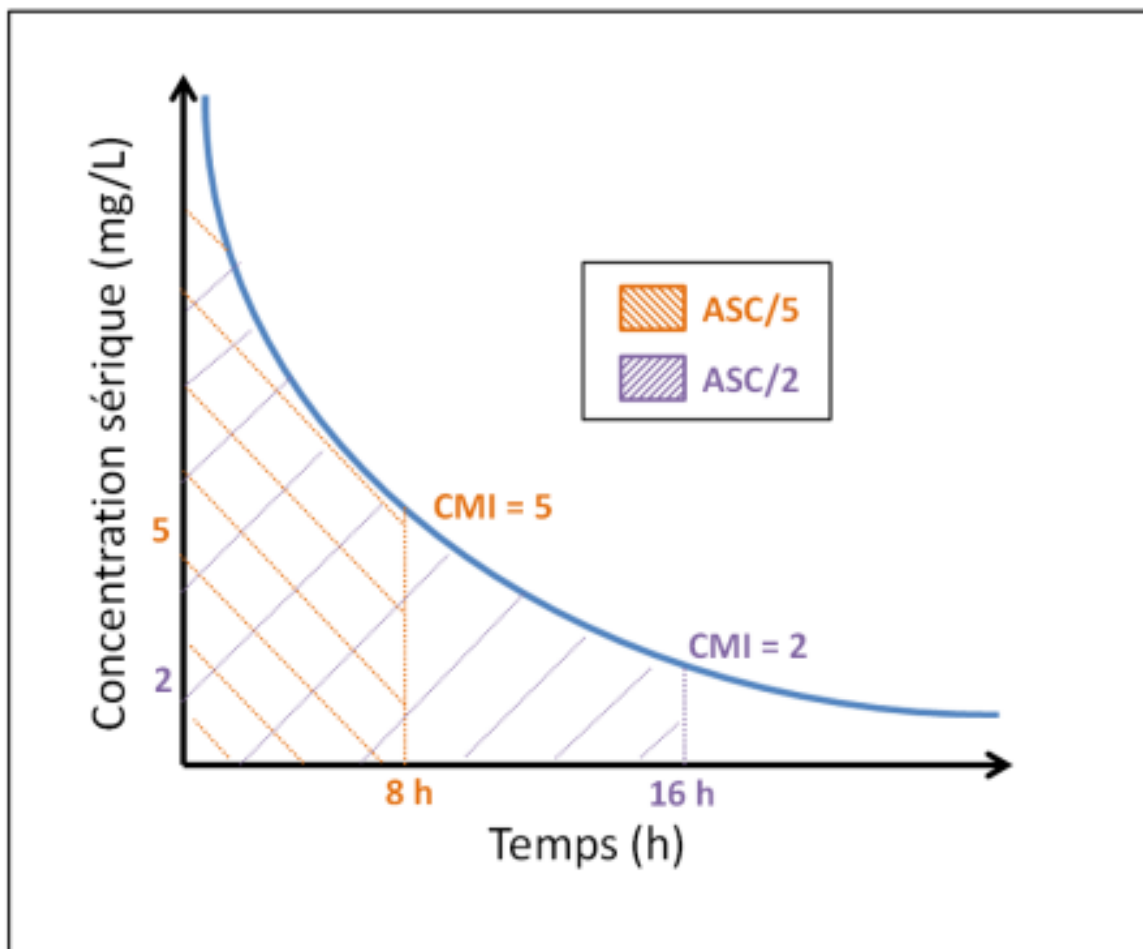


Figure 21 : Schéma de la mesure de l'aire sous la courbe de la concentration sérique d'un antibiotique divisée par la CMI (ASC/CMI). Exemple pour deux souches avec une CMI = 2 mg/mL ou CMI = 5 mg/mL pour une administration d'antibiotique journalière.

### 3.3.5.3 Les quotients inhibiteurs (QI)

Il s'agit des rapports concentrations divisés par la CMI. Les concentrations choisies dépendent de l'antibiotique (concentration au moment du pic ( $Q_{\max}$ ) pour les antibiotiques concentration-dépendants, concentration résiduelle pour les antibiotiques temps-dépendants), et de l'infection (concentration tissulaire ou sérique).

### 3.3.5.4 La concentration préventive de l'apparition de mutant (CPM)

Dans toute population bactérienne suffisamment importante, il existe une sous-population résistante à un antibiotique possédant une CMI propre qui n'est pas mesurable par les techniques d'antibiogramme classiques, ces dernières ne tenant compte que de la CMI de la population principale. Une concentration supérieure à la CMI de la population principale, et inférieure à la CMI de la sous-population, induira une sélection de la sous-population résistante. Cette situation est donc à éviter. La concentration préventive de l'apparition de mutant (CPM) correspond donc généralement à la CMI de la sous-population résistante.

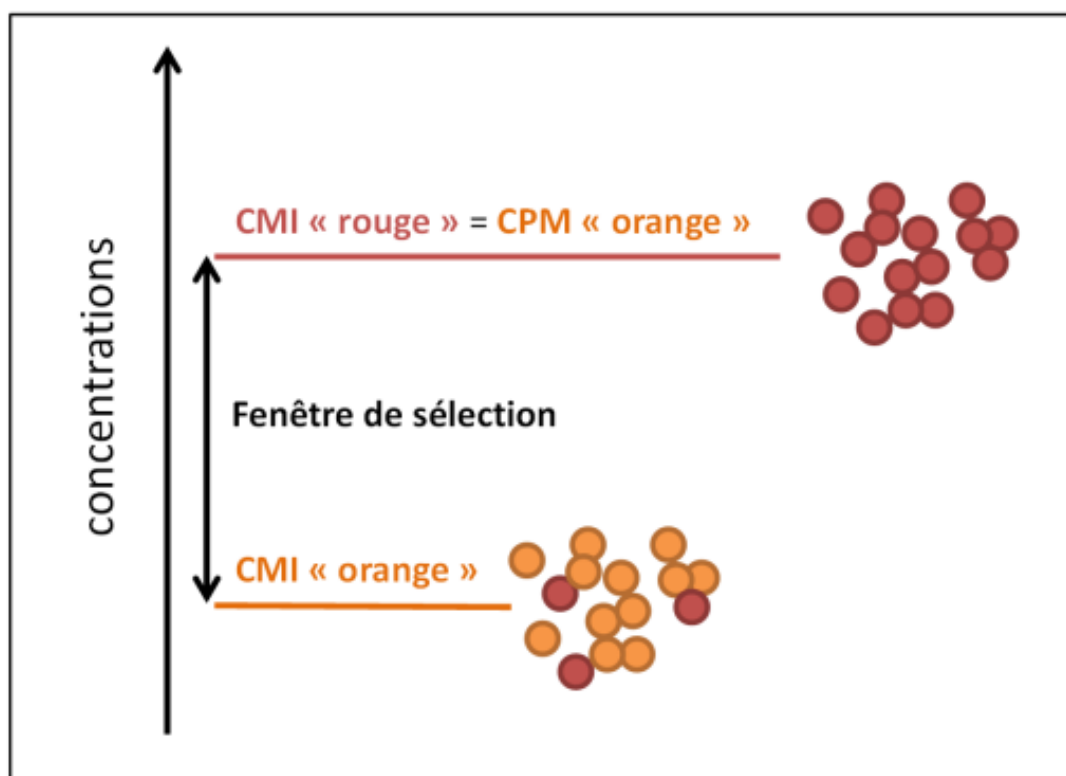


Figure 22 : Schéma de la concentration de prévention des mutants résistants (CPM) pour une population bactérienne donnée.



### 3.3.5.5 L'effet post-antibiotique (EPA)

Il s'agit d'un temps pendant lequel il y a une absence de croissance bactérienne suite à l'administration d'un antibiotique bactéricide et ce, même si l'antibiotique n'est plus présent. Cet effet a été observé aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Il se définit comme l'intervalle de temps nécessaire aux bactéries pour recroître d'un log après retrait de l'antibiotique par rapport à la même population bactérienne sans antibiotique (figure 23). Il est fonction de la bactérie et de l'antibiotique (famille, concentration, temps de contact).

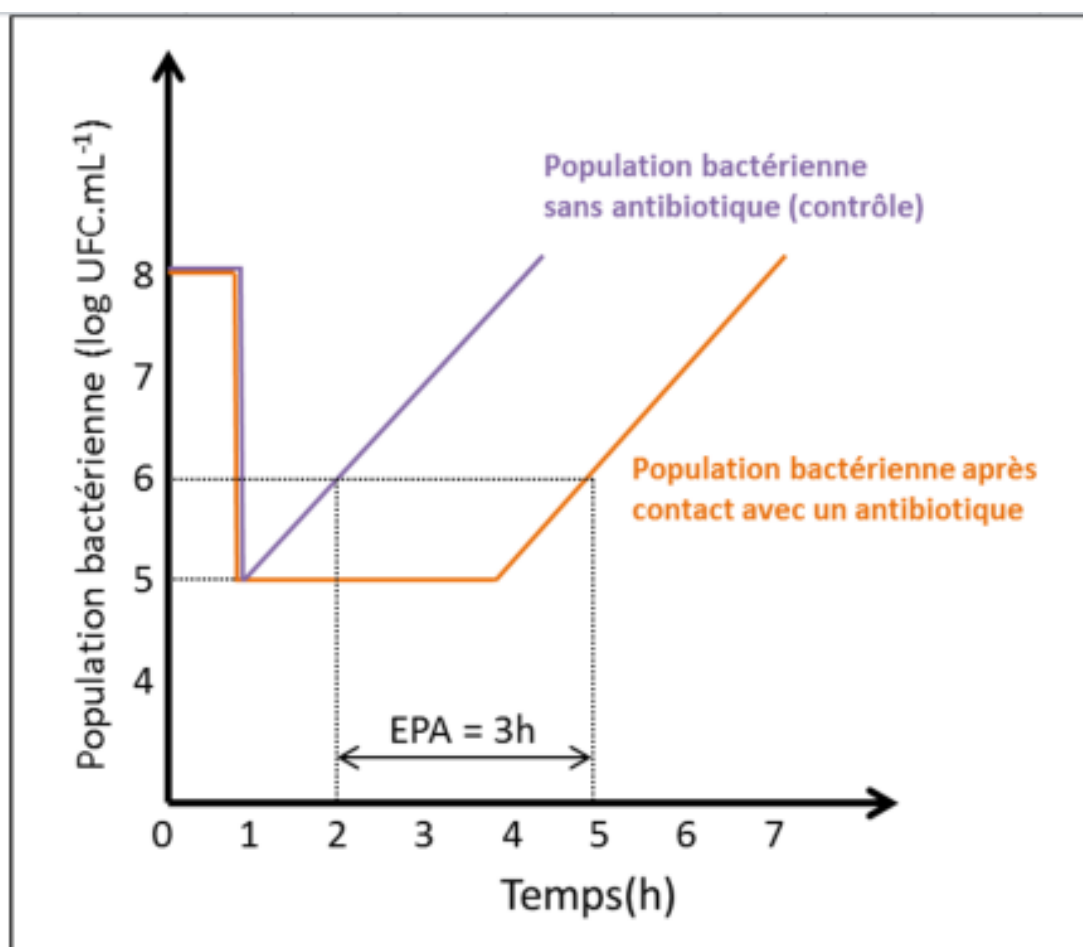


Figure 23 : Schéma de l'effet post-antibiotique (EPA). La population bactérienne contrôle (violette) a été diluée aux 1/1000 à t=1 h. La population bactérienne « orange » a été mise en contact avec un antibiotique à t=1 h. L'EPA correspond au délai entre les deux populations pour recroître d'un log.

### 3.3.5.6 La résistance adaptative

Il s'agit d'une résistance phénotypique observée après un contact avec l'antibiotique. Cette résistance peut durer plusieurs heures, et est observée tant que l'antibiotique est présent. Elle est fonction de l'espèce bactérienne. L'absence de l'antibiotique redonne à la population bactérienne son phénotype sensible. Cet effet plaide pour l'espacement des doses administrées aux patients afin d'obtenir des périodes entre deux injections sans antibiotique.

## 3.3.6 Efficacité des antibiotiques sur les bactéries sessiles

### 3.3.6.1 Introduction sur la tolérance aux antibiotiques

Les bactéries au sein d'un biofilm sont capables de survivre à des concentrations importantes d'antibiotiques pouvant atteindre plusieurs milliers de fois leur CMI et ce malgré le fait qu'elles soient sensibles à ces antibiotiques sous leur forme planctonique (240,329). On parle alors de tolérance plutôt que de résistance aux antibiotiques (330). La résistance peut se définir comme la capacité d'une souche à se **multiplier** en présence d'antibiotiques. Le mécanisme est généralement acquis génétiquement par la bactérie et transmissible à la génération suivante. À l'inverse, la tolérance peut se définir comme la capacité de la souche à **survivre** en présence d'un antibiotique bactéricide. La croissance est alors généralement stoppée. Une souche sensible (possédant une CMI inférieure aux concentrations critiques) peut alors être tolérante, c'est-à-dire possédant un rapport CMB/CMI  $\geq 32$  pour un antibiotique bactéricide dont le rapport CMB/CMI est par définition  $< 32$  (cf. 3.1). Dans le cas d'un biofilm, il s'agit d'un mécanisme phénotypique qui disparaît lorsque la bactérie se retrouve sous sa forme planctonique.

### 3.3.6.2 La concentration minimale éradicatrice du biofilm (CMEB)

La concentration caractéristique de la tolérance aux antibiotiques est la CMEB, correspondant à la plus faible concentration d'un d'antibiotique éradiquant un biofilm (195). Concrètement, elle correspond à la concentration nécessaire pour empêcher toute re-croissance bactérienne visible après 24 h de contact. Cette définition est donc différente de la CMB qui elle, ne correspond pas à la concentration éradiquant les bactéries planctoniques, mais à la concentration diminuant l'inoculum de 3 logs. La méthode est réalisée via le Calgary Biofilm Device, permettant la formation du biofilm sur des picots (cf. 2.4.1). Après 24 h d'incubation, les biofilms sont rincés puis mis en contact avec les antibiotiques pendant 24 h à 35°C. Après rinçage, les biofilms sont décrochés par sonication et la viabilité bactérienne est déterminée après 24 h d'incubation par dénombrement ou lecture de la turbidité.

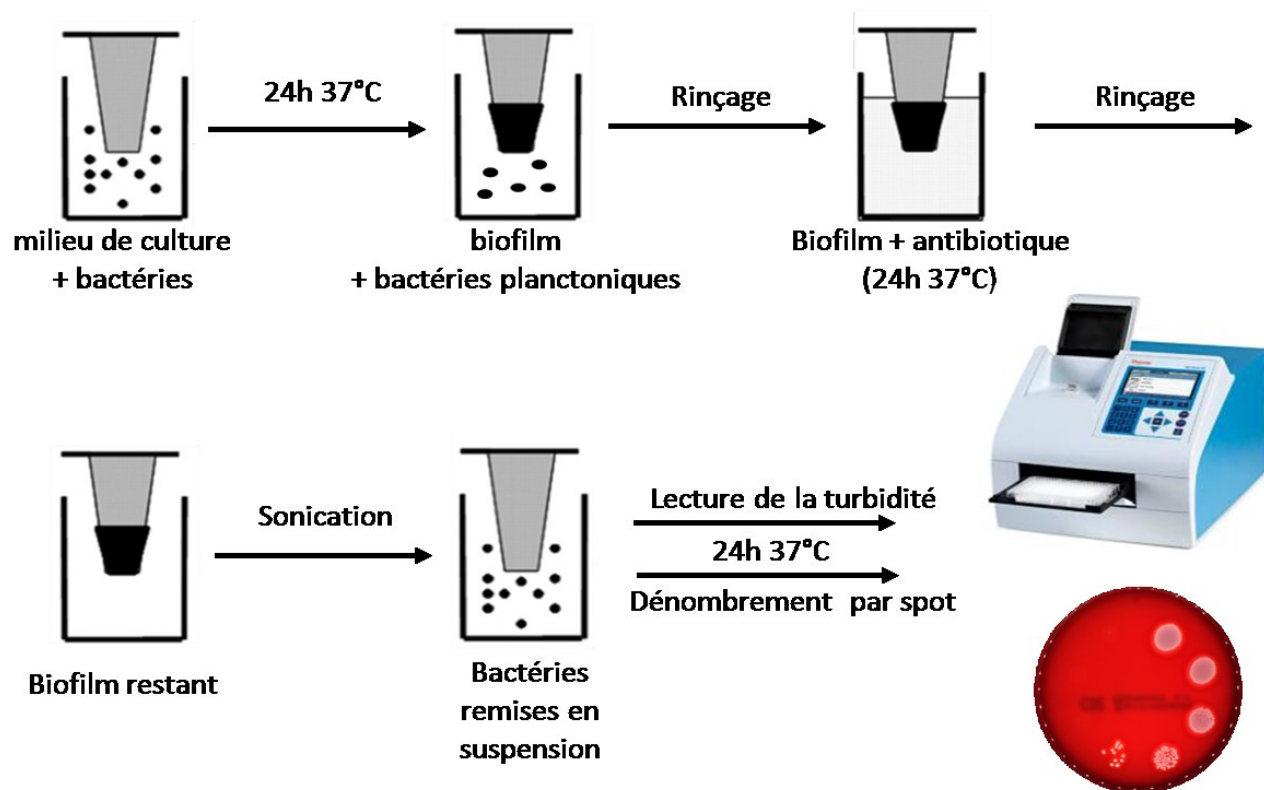


Figure 24 : Schéma de la détermination de CMEB via le système Calgary Biofilm Device.

### 3.3.6.3 Mécanismes de la tolérance aux antibiotiques

Dans les parties suivantes, nous nous intéresserons spécifiquement aux mécanismes de tolérance staphylococciques et aux traitements en cours d'étude permettant de contourner ces mécanismes.

#### 3.3.6.3.1 Diffusion altérée des antibiotiques – rôle de la matrice extracellulaire

L'un des premiers mécanismes décrits dans la tolérance aux antibiotiques est leur faible diffusion au sein du biofilm. En effet, la matrice extracellulaire agit comme une barrière pouvant réduire l'entrée des antibiotiques par encombrement ou par interaction avec les charges électriques des constituants (331). Certains antibiotiques comme la daptomycine ou la rifampicine sont capables de pénétrer dans les biofilms staphylococciques (332–335). À l'inverse, *Singh et al* ont pu observer que la diffusion de l'oxacilline, la cefotaxime et la vancomycine était réduite à travers un biofilm de *S. aureus* et de *S. epidermidis* (souches de référence) (336). Dans cette même étude, la diffusion de l'amikacine et la ciprofloxacine n'était pas affectée, démontrant que la diffusion était antibiotique-dépendant. *Daddi Oubekka et al* ont pu observer par spectrométrie à fluorescence que la vancomycine était capable de diffuser dans des biofilms de *S. aureus* d'origine clinique (337). Il

semble donc difficile de pouvoir conclure quant à la capacité de la matrice à réduire la diffusion des antibiotiques tant la composition de cette dernière dépend de la souche et de son environnement. *Jørgensen et al* ont par exemple observé qu'un biofilm formé dans un milieu supplémenté en plasma était plus sensible à un traitement vancomycine/daptomycine + rifampicine qu'un biofilm formé par la même souche dans le même milieu sans plasma (CMEB = 64 µg/mL pour daptomycine + rifampicine avec plasma et >1024 µg/mL sans plasma) (170). Cette différence phénotypique est due à une matrice extracellulaire différente comprenant une quantité importante de fibrine dans la condition de culture avec plasma. Une étude récente de *Singh et al* insiste sur le fait que la diffusion dépend de l'antibiotique, de l'espèce mais également de la souche (338). Dans cette étude, la diffusion de la vancomycine à travers le biofilm est observée chez toutes les souches alors que la diffusion du chloramphénicol semble souche dépendante. Il est également possible que la matrice joue un autre rôle que celui de barrière dans la tolérance aux antibiotiques. En effet, *Davenport et al* ont observé que l'ajout de matrice d'*Acinetobacter baumannii* dans une culture planctonique diminuait l'efficacité de la tobramycine chez *S. aureus*, notamment via des mécanismes ADN et protéine-indépendants (339). Plus qu'une barrière, la matrice extracellulaire pourrait modifier la sensibilité bactérienne aux antibiotiques par modification de la viscosité du milieu dans lequel se trouve la bactérie. *Kostenko et al* ont en effet montré qu'en augmentant la viscosité du milieu de culture, la sensibilité de *S. aureus* à la vancomycine diminuait (340).

De plus, la matrice extracellulaire sécrétée peut également évoluer au cours du temps. *Solis et al* ont par exemple mis en avant une composition protéique du biofilm différente pour une souche adaptée *in vitro* à tolérer de fortes concentrations de cloxacilline par rapport à la souche initiale (341).

La faible diffusion des antibiotiques au sein du biofilm pourrait à l'avenir être contrecarrée par l'utilisation de nanoparticules enchâssant les antibiotiques et possédant une meilleure diffusion (342). *Wardlow et al* sont par exemple parvenus à encapsuler la ciprofloxacine dans un liposome sensible à des températures de l'ordre de 42°C (343). Grâce à des ultrasons focalisés de haute intensité guidés par résonance magnétique, les liposomes peuvent être lysés à un site anatomique spécifique libérant des concentrations locales d'antibiotiques importantes. Récemment, *Takahashi et al* ont aussi montré que l'encapsulation de clarithromycine augmentait son efficacité sur les biofilms (344).

Au final, les études *in vitro* peuvent se contredire et ne semblent pas représentatives de la réalité clinique. Malgré une bonne diffusion de l'antibiotique à travers le biofilm, il est intéressant de noter que la majorité des publications concluent sur le fait que l'infection n'est pas traitée, et que des

bactéries viables persistent. Il semble donc évident aujourd'hui que la tolérance aux antibiotiques ne peut pas s'expliquer uniquement par le rôle de « barrière » de la matrice.

### **3.3.6.3.2 Microenvironnement et croissance bactérienne ralentie**

En raison de sa structure en 3 dimensions, un biofilm peut être considéré comme composé de différents microenvironnements possédant des caractéristiques physicochimiques propres. En effet, selon la profondeur du biofilm à laquelle les bactéries se trouvent, leur environnement varie en termes de pH, de nutriments, de métabolites secondaires et d'oxygène. Plus on s'éloigne de la surface du biofilm, moins la quantité de nutriments et d'oxygène est importante, plus la quantité de métabolites augmente, plus le pH est acide (345). Les bactéries vont répondre en s'adaptant à cet environnement, entraînant des modifications phénotypiques et mêmes génétiques qui peuvent être à l'origine de la tolérance à certains antibiotiques.

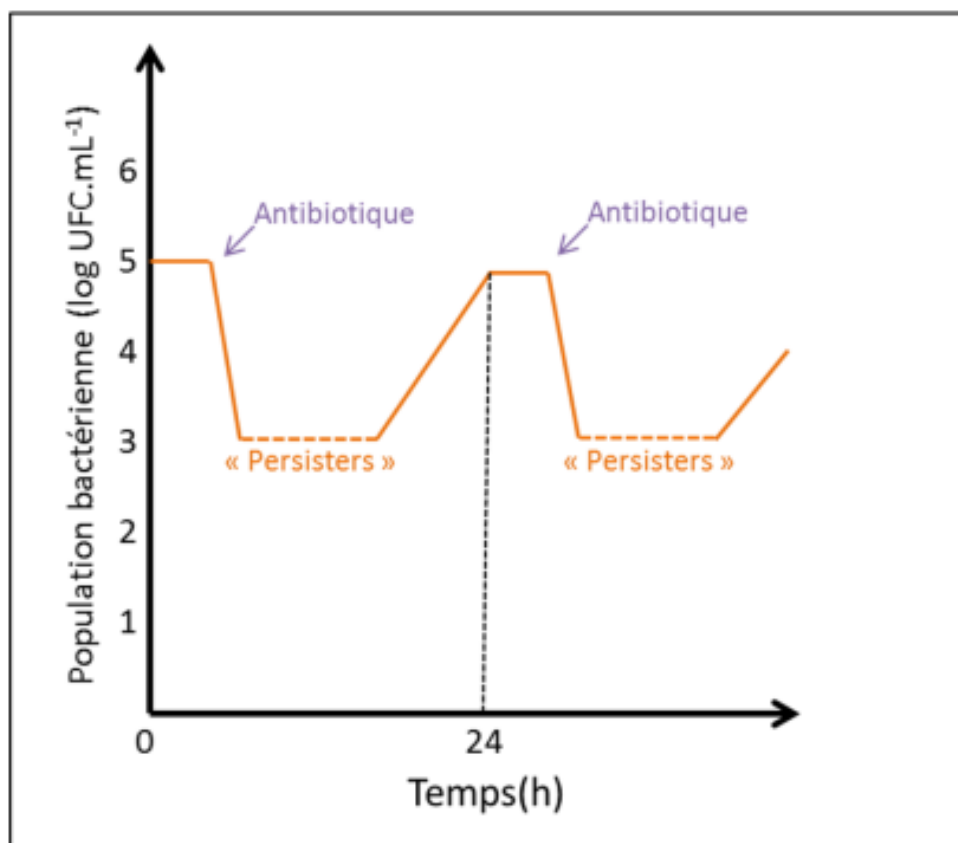
L'une des conséquences principales de ces microenvironnements est un ralentissement de la croissance bactérienne. *Rani et al* ont ainsi observé quatre états bactériens au sein d'un biofilm staphylococcique : un état en croissance aérobie, un état en croissance anaérobie, des bactéries mortes, des bactéries en dormance (346). Ils ont également pu observer que les biofilms étaient stratifiés, la zone localisée à l'interface étant riche en oxygène et nutriments et contenant des bactéries actives (31 % du biofilm total), le reste correspondant à un environnement anoxique contenant des bactéries inactives. L'effet d'antibiotiques actifs sur les bactéries en croissance, telles les bêta-lactamines, est alors réduit (347). Plusieurs études ont observé qu'une diminution du pH et un environnement anaérobie étaient responsables d'une diminution de l'efficacité des aminoglycosides et de certaines bêta-lactamines (348,349). En 2007, *Qin et al* ont constaté que les biofilms formés par des souches de *S. epidermidis* ne possédant pas l'opéron *ica* étaient plus hétérogènes et également plus tolérants à la lysostaphine et la vancomycine.

La présence au sein des biofilms de microenvironnements présentant un pH acide, une faible quantité de nutriments et d'oxygène à disposition impacte le système de régulation *agr* chez *S. aureus* et modifie le phénotype bactérien vers un état en dormance pouvant expliquer le manque d'efficacité de certains antibiotiques (350).

### **3.3.6.3.3 Les bactéries persistantes, une sous-population tolérante**

En 1944, Joseph Warwick Bigger observe qu'une sous-population d'une culture de *S. pyogenes* (*aureus*) n'est pas éradiquée par un traitement à la pénicilline (351). Ces bactéries persistantes,

représentant environ 1 % de la population bactérienne, sont dans un état de dormance, et peuvent retourner à un état de croissance lorsque l'antibiotique n'est plus présent. Cette sous-population est appelée « persisteurs » ou « persisters » en anglais (352). Elle ne développe pas de résistance à l'antibiotique, puisque la population nouvellement formée à partir des persisters après contact avec l'antibiotique reste sensible à ce dernier, et possède à nouveau une sous-population tolérante (figure 25).



**Figure 25 : Représentation des bactéries persistantes et de la tolérance bactérienne à un antibiotique.**

Dans un contexte infectieux où un biofilm est présent, les bactéries persistantes peuvent se retrouver au sein du biofilm et être par conséquent protégées du système immunitaire. Leur capacité à pouvoir changer leur phénotype vers une forme active peut conduire à la reformation du biofilm une fois l'antibiothérapie arrêtée et donc être à l'origine de la rechute de l'infection (353,354).

Les mécanismes liés à la formation de persisters ne sont pas encore complètement élucidés chez *Staphylococcus*. À la différence d'autres bactéries comme *E. coli*, le phénotype persistant ne serait pas dû à un système toxine-antitoxine, mais serait associé à un phénotype similaire à l'état des

bactéries en phase stationnaire caractérisé par une diminution intracellulaire d'adénosine triphosphate (ATP) (355). Ce phénotype stochastique survient, en moindre quantité, dès la phase exponentielle de croissance, et augmente parallèlement à la densité bactérienne. De plus, la formation de persisters semble souche-dépendante et environnement-dépendant (356). La quantité de persisters induite par un antibiotique varie en fonction de la molécule choisie (357). *Yang et al* ont affiné l'analyse en proposant de différencier deux types de persisters chez *S. epidermidis* : les bactéries tolérantes mais pouvant être tuées (« tolerant-but-killable » TBK), résistantes à des concentrations fortes d'antibiotiques, et les bactéries en dormance capables de résister à des concentrations très fortes d'antibiotiques (358). Ces mêmes auteurs ont observé qu'un biofilm mis en contact de concentrations croissantes de ciprofloxacine est composé à 99.99 % de bactéries sensibles à des concentrations comprises entre 0.25 et 1 µg/mL, et de 0.01 % de bactéries persistantes tolérantes à des concentrations entre 1 et 128 µg/mL. Parmi ces bactéries tolérantes, 97 % peuvent être éradiquées à des concentrations de ciprofloxacine comprises entre 256 et 1024 µg/mL (TBK), les 3 % restants survivant à des concentrations supérieures à 1024 µg/mL (bactéries en dormance). Enfin, par électrophorèse bidimensionnelle associée à la spectrométrie de masse, *Carvalhais et al* ont pu identifier des protéines immunogènes associées au phénotype de dormance dans un biofilm de *S. epidermidis* (359). Cette approche pourrait aider au diagnostic ainsi qu'à la compréhension des mécanismes conduisant à ce phénotype de dormance.

L'un des traitements les plus prometteurs contre ces bactéries persistantes est le dérivé synthétique de l'acyldepsipeptide factor A (ADEP-4). Cet antibiotique est connu pour agir par activation de la protéase ClpP chez les bactéries à Gram positif inhibant la croissance bactérienne et pouvant induire la mort cellulaire des bactéries en croissance (360). Mais cette classe d'antibiotique s'avère également efficace sur les bactéries persistantes (361). Le fort taux de mutants résistants observés *in vitro* peut être contrebalancé par l'utilisation conjointe d'un autre antibiotique. Dans leur étude, *Conlon et al* ont démontré que l'utilisation d'ADEP-4 en combinaison avec la rifampicine était capable d'éradiquer un biofilm. *Kim et al* ont également identifié un inhibiteur d'histidine kinase capable d'éradiquer les persisters à faibles concentrations, et d'être actif sur les biofilms (362). *Yang et al* proposent d'adapter l'antibiothérapie afin d'éradiquer les persisters en prolongeant le temps de contact par un antibiotique efficace sur les TBK, mais les concentrations nécessaires étant très élevées, elles ne sont atteignables *in vivo* que dans les stratégies d'action locale de type verrou antibiotique ou lors d'administrations topiques (358). *Prax et al* ont observé que l'ajout de glucose augmentait l'efficacité de la daptomycine sur les bactéries persistantes, suggérant l'intérêt de

nouvelles thérapies modifiant le métabolisme bactérien (363). *Chowdhury et al* ont rapporté que le cisplatine, un anticancéreux, posséderait une activité antimicrobienne sur les bactéries tolérantes, la variation de la conformation locale de l'ADN induite par cette molécule ne nécessitant pas que la bactérie soit active (364).

#### **3.3.6.3.4 La tolérance, un processus multifactoriel**

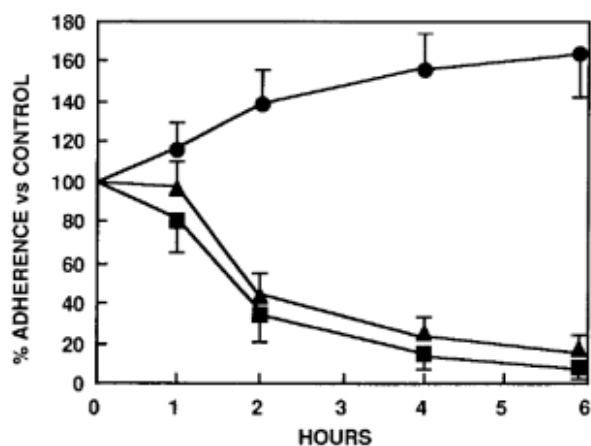
Au final, la tolérance aux antibiotiques des bactéries en biofilm apparaît être un processus multifactoriel. Les mécanismes ne sont pas encore complètement connus. Dans cette revue de la bibliographie, nous nous sommes focalisés sur 3 mécanismes principaux liés à la tolérance. Cependant, d'autres études ont mis en avant l'importance de l'expression génétique dans les mécanismes de tolérance. Ainsi, *França et al* ont constaté que les bactéries essaimantes d'un biofilm de *S. epidermidis* étaient plus tolérantes à la vancomycine et à la tétracycline, et que ces bactéries n'avaient pas le même profil d'expression pour les gènes liés au *quorum sensing* (*agrB*), à la formation du biofilm (*icaA*) et à la dispersion (*atIE*, *psmβ*) que les mêmes souches planctoniques ou au sein du biofilm (365). Une méta-analyse de la littérature effectuée en 2015 a mis en avant que la tolérance aux antibiotiques était liée à la densité bactérienne et à « l'âge » du biofilm au moment du traitement, suggérant l'importance des étapes de maturation (366). Actuellement, la recherche de nouveaux traitements ne se base plus uniquement sur des bactéries métaboliquement actives, mais tient compte des bactéries en phase stationnaire et en dormance. Les termes de « concentration minimale en phases stationnaires bactéricides » et « concentration minimale dormance-bactéricide » ont ainsi vu le jour sans que, pour l'instant, ils aient trouvé leur application en routine clinique, ou que des techniques spécifiques permettant facilement leur mesure aient été mises à la disposition de la microbiologie clinique (367).

#### **3.3.6.4 Effet d'induction**

En plus de ne pas être efficaces, même à forte dose, sur un biofilm, les antibiotiques peuvent paradoxalement avoir un effet inducteur à faible concentration. En effet, à des doses dites sub-inhibitrices (inférieures à la CMI), plusieurs études ont montré que les antibiotiques augmentaient de façon significative la quantité de biofilm formée *in vitro* (368). La première description de ce phénomène remonte à 1988 où *Christensen et al* ont observé une augmentation de l'adhésion de la souche de référence *S. hominis* RP14 en présence de concentration faible de rifampicine (figure 26) (369). Dans cette étude, les auteurs ont observé que ce phénomène n'était retrouvé que pour une seule des trois souches testées. Les phénomènes d'induction sont en effet souvent décrits comme



souches-dépendants et peuvent varier au sein d'une même espèce et ce, indépendamment de la sensibilité ou de la résistance des souches à l'antibiotique (370,371).



**Figure 1.** Effect of one-half the MIC of rifampin on adherence of strains RP62A (■), RP12 (▲), and RP14 (●) to plastic tissue culture plates. Hours indicates the interval that a 6-h culture of the strain was exposed to the drug when adherence was assayed. Data are mean  $\pm$  SD (bars) values.

**Figure 26 : Augmentation de l'adhésion d'une souche de *S. hominis* au contact de la rifampine. D'après Christensen et al (116).**

L'antibiotique étudié, sa concentration et la souche bactérienne apparaissent comme trois facteurs importants dans l'induction du biofilm. Ainsi, Kaplan et al ont observé l'effet inducteur de 4 bêta-lactamines sur la formation de biofilm de 3 SARM et ont montré des phénomènes d'induction variables selon l'antibiotique, la concentration et la souche testée (370). L'effet d'induction est dose-dépendant avec une réponse souvent bi-phasique (induction à faible dose et inhibition à plus forte dose) avec un maximum d'amplitude variable selon l'espèce bactérienne et la molécule. Le plus fréquemment, l'effet est observé à des concentrations  $\leq \frac{1}{2}$  CMI, mais parfois l'effet peut être observé à des concentrations  $> \frac{1}{2}$  CMI (373). Il est alors nécessaire de ne pas se cantonner aux dilutions d'ordre 2 pour ne pas passer à côté de l'induction. Mirani et Jamil ont également montré que le type de matériel sur lequel la souche formait son biofilm pouvait influencer les résultats de ces inductions (372). Dans cette étude, la vancomycine induisait par exemple la formation de biofilm sur les matériels en silicone et en nylon mais pas sur les surfaces en verre alors que la cloxacilline facilitait la formation de biofilm uniquement sur les surfaces en verre.

Pour le genre *Staphylococcus*, ce phénomène d'induction a été décrit pour la plupart des antibiotiques avec néanmoins une majorité d'études portant sur les familles d'antibiotiques agissant

sur la membrane (bêta-lactamines et glycopeptides) (tableau 5). Le mécanisme d'action n'est pas complètement connu et varie selon l'espèce. Chez *S. aureus*, Kaplan et al ont montré que les concentrations sub-inhibitrices des bêta-lactamines n'induisaient pas la formation de biofilm en présence de DNase et pour la souche ne possédant pas le gène de l'autolysine ( $\Delta atI$ ), suggérant un mécanisme lié à l'ADN extracellulaire(370). Mlynek et al ont trouvé des résultats similaires avec l'amoxicilline sur une souche de SARM, observant un phénomène d'induction du biofilm lié à l'ADN extracellulaire (374).

Ces mécanismes d'induction en présence de concentrations sub-inhibitrices peuvent être retrouvés en clinique. En effet, lors d'une infection, les bactéries peuvent se retrouver en présence de telles concentrations notamment : i) au début ou à la fin de l'administration d'un antibiotique ; ii) entre deux injections ; iii) dans certains tissus (diffusion d'antibiotique faible); iv) dans certains sites infectés avec une importante réaction cellulaire et inflammatoire qui cloisonne le site de l'infection et limite localement la diffusion des antibiotiques. Des études cliniques méritent d'être réalisées à l'avenir pour mettre en évidence le lien entre ce phénomène et les échecs thérapeutiques, lors notamment d'infections chroniques.

Famille	Antibiotique	Espèce bactérienne	Référence
Bêta-lactamines	Nafcilline	<i>S. lugdunensis</i>	(375)
		<i>S. aureus</i>	(376)
	Oxacilline	<i>S. aureus</i>	(372)
		<i>S. epidermidis</i>	(377)
	Céfalexine	<i>S. aureus</i>	(378)
	Céfalotine	<i>S. aureus</i>	(379)
	Céfazoline	<i>S. lugdunensis</i>	(375)
		<i>S. aureus</i>	(376)
	Céfamandole	<i>S. epidermidis</i>	(380)
	Amoxicilline	<i>S. aureus</i>	(370,374,376)
	Méthicilline	<i>S. aureus</i>	(370)
	Ampicilline	<i>S. aureus</i>	(370,376)
	Cloxacilline	<i>S. aureus</i>	(370,376)
	Pénicilline	<i>S. aureus</i>	(376)
	Ceftriaxone	<i>S. aureus</i>	(376)
Pipéracilline	<i>S. aureus</i>	(376)	
Ceftaroline	<i>S. aureus</i>	(381)	
Fluoroquinolone	Moxifloxacin	<i>S. lugdunensis</i>	(375)
Cycline	Tigécycline	<i>S. epidermidis</i>	(373,377)
Glycopeptide	Vancomycine	<i>S. aureus</i>	(372,382–384)
		<i>S. epidermidis</i>	(373,380,385)
		<i>S. lugdunensis</i>	(375)
Lipopeptide	Daptomycine	<i>S. lugdunensis</i>	(375)
Macrolide	Azithromycine	<i>S. epidermidis</i>	(386)
		<i>S. epidermidis</i>	(386)
		<i>S. epidermidis</i>	(386)
Oxazolidinone	Linézolide	<i>S. aureus</i>	(375)
		<i>S. epidermidis</i>	(373,375)
Rifamycine	Rifampicine	<i>S. hominis</i>	(369)
		<i>S. lugdunensis</i>	(375)
Synergistine	Quinupristine-dalfopristine	<i>S. epidermidis</i>	(387)
		<i>S. lugdunensis</i>	(375)
Sulfamides et triméthoprime	Co-trimoxazole	<i>S. lugdunensis</i>	(375)
Cycline	Tétracycline	<i>S. epidermidis</i>	(387)
		<i>S. lugdunensis</i>	(375)
Acide phosphonique	Fosfomycine	<i>S. aureus</i>	(374)
Lincosamide	Clindamycine	<i>S. aureus</i>	(388)
Aminoside	Streptomycine	<i>S. aureus</i>	(389)
		Gentamicine	<i>S. aureus</i>

**Tableau 5 : Liste des données bibliographiques ayant montré l'induction de la formation de biofilm staphylococcique en présence de concentrations sub-inhibitrices de différentes familles d'antibiotiques.**

### 3.3.6.5 L'antibiofilmogramme : mesure de la capacité de prévention du biofilm des antibiotiques

#### 3.3.6.5.1 Généralités

Les techniques d'antibiogrammes classiques décrites précédemment sont adaptées à l'évaluation de l'activité des antibiotiques sur les bactéries planctoniques. Les concentrations critiques et la classification des souches qui en découlent permettent, dans la majorité des cas, de choisir un traitement efficace face à une infection aiguë. Cependant, nous avons vu que dans le cadre des infections chroniques pour lesquelles un biofilm est présent, les bactéries sont capables de tolérer des concentrations très importantes d'antibiotiques, pouvant conduire à des échecs thérapeutiques et ce, malgré l'administration d'une antibiothérapie classée comme efficace par les méthodes classiques d'antibiogramme (113). Ces dernières ne sont alors plus systématiquement prédictives du succès thérapeutique.

En effet, les méthodes utilisées actuellement en routine en microbiologie clinique ne tiennent pas compte des formes sessiles potentiellement présentes dans un biofilm. Sachant que 65 % des infections humaines semble impliquer la formation d'un biofilm (74), il apparaît aujourd'hui nécessaire que les approches choisies pour prédire l'activité des antibiotiques *in vivo* intègre la dimension « biofilm » des phénotypes bactériens que l'on retrouve dans un contexte infectieux. Comme nous l'avons vu précédemment, les étapes initiales (adhésion au support et initiation de la synthèse de la matrice extracellulaire) sont cruciales dans la constitution des biofilms. La technologie BioFilm Ring Test®, permettant de caractériser/quantifier ces étapes, ouvre la porte d'une nouvelle génération de tests que l'on peut désigner sous le terme générique d'Antibiofilmogramme®.

#### 3.3.6.5.2 Principe

Tout comme le BioFilm Ring Test®, le principe du test repose sur la visualisation du déplacement de microbilles magnétisables sous l'action d'un aimant permettant de détecter la présence d'un biofilm, mais cette fois-ci en présence ou non d'antibiotiques, [\(Cf. 2.4.1.1\)](#). Pour rappel, après incubation de la bactérie en milieu BHI contenant des microbilles magnétisables, la microplaque est déposée sur un bloc contenant 96 mini-aimants centrés sous chaque puits. Après une minute de contact, les microbilles vont migrer vers le centre du puits, conduisant à la formation d'un spot rouge/marron visible à l'œil nu qui est par la suite quantifié avec précision via un scanner et un logiciel d'analyse d'image. Cependant, en présence de biofilm, les microbilles piégées par la matrice sont bloquées,

conduisant à l'absence de spot après aimantation. Dans l'Antibiofilmogramme<sup>®</sup>, des antibiotiques à différentes concentrations sont ajoutés au milieu de culture, dès le début de l'inoculation de la microplaque. Après 4 h d'incubation à 37°C, la microplaque est soumise à l'action du bloc aimanté. La présence d'un spot est alors significative de l'inhibition de la formation du biofilm par l'antibiotique à la concentration testée. À l'inverse, l'absence de spot est révélatrice de l'inefficacité de l'antibiotique à prévenir la formation de biofilm. Il est alors possible de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice du biofilm (CMiB) pour chaque antibiotique testé.

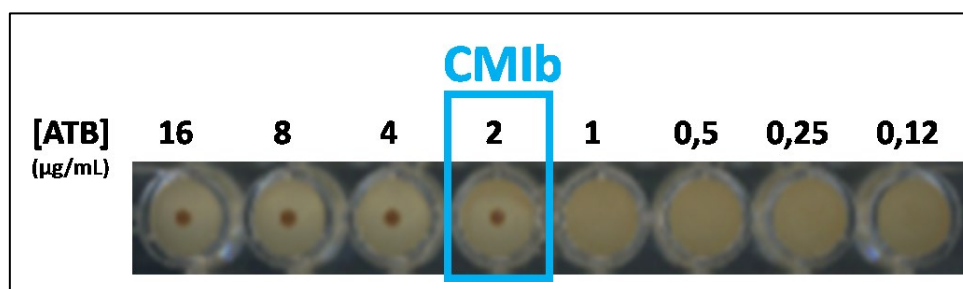


Figure 27 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice du biofilm (CMiB) via l'Antibiofilmogramme<sup>®</sup>.

### 3.3.6.5.3 Applications cliniques

L'Antibiofilmogramme<sup>®</sup> permet donc de déterminer la CMiB des antibiotiques. Le résultat peut être obtenu le jour même de l'isolement du germe soit la veille du résultat de la CMI. Il apporte une information supplémentaire pouvant aider les cliniciens lors du choix de l'antibiothérapie. En effet, il permet de sélectionner, parmi les antibiotiques classés comme efficaces par la méthode d'antibiogramme classique, ceux possédant une activité prévenant la formation de biofilm.

Dans le cadre des IOA à staphylocoques, l'information CMiB pourrait être utile dans les situations où le risque de formation d'un biofilm est élevé :

- lors d'une **pose initiale de matériel en site infecté** pour optimiser l'antibiothérapie pré/peropératoire,
- lors d'une **bactériémie** à *S. aureus* chez un patient ayant une prothèse, afin de choisir une antibiothérapie limitant le risque de greffe septique sur le matériel prothétique. Pour rappel, le risque de colonisation du matériel est alors important, de l'ordre de 30 à 40 % ([Cf. 1.2.1 Classification en fonction du matériel orthopédique](#)),
- lors d'un **changement de prothèse en 2 temps**, afin de limiter la reconstitution précoce d'un biofilm sur la nouvelle prothèse. En effet, dans cette situation, la bactérie

responsable de l'infection est connue lors de la repose du nouveau matériel permettant l'adaptation de l'antibiothérapie per/postopératoire,

- lors d'un **changement de prothèse en 1 temps**, si le germe responsable de l'infection est connu. L'isolement de la bactérie impliquée, à partir d'une hémoculture ou d'une ponction/biopsie locale, pourrait permettre d'évaluer les CMIb et d'optimiser l'antibiothérapie sur cette base afin de réduire le risque de recolonisation de la nouvelle prothèse par les bactéries résiduelles, après le geste de lavage et/ou de résection chirurgicale.

---

# Travail Personnel

---

## 1 INTRODUCTION

La bourse CIFRE qui est l'objet du travail présenté ici fait partie intégrante d'un projet plus large appelé BIOFILM qui a débuté en 2014 dans le cadre d'un financement suite à un Appel à Projets par le Fond Unique Interministériel (FUI). Il réunit 7 partenaires :

- Deux industriels : BioFilm Control et bioMérieux
- Cinq centres hospitaliers universitaires : Clermont-Ferrand, Grenoble, Lyon, Nîmes et Strasbourg

Les objectifs du projet étaient de développer un nouveau test antibiogramme prenant en compte le comportement « biofilm » des bactéries, appelé « Antibiofilmogramme® », en format microplaque 96 puits et de démontrer la valeur médicale d'une détection précoce de la capacité d'un antibiotique à prévenir la formation du biofilm. En effet, l'hypothèse sur laquelle repose le projet est que **le développement du biofilm *in-vitro* en présence d'antibiotiques est corrélé à une diminution de l'efficacité des antibiotiques chez le patient infecté.**

Les travaux de recherche menés au cours de cette thèse ont été conduits sur l'axe des IOA à *S. aureus* et ont débuté par un recueil rétrospectif de souches et de données cliniques. Après avoir sélectionné les antibiotiques les plus couramment utilisés pour ce type d'infection, les premiers essais d'Antibiofilmogramme® ont été réalisés sur 29 souches. Les valeurs de CMI<sub>b</sub>, concentration prévenant la formation de biofilm, obtenues ont été comparées aux valeurs de CMI et ont permis d'identifier les antibiotiques prévenant la formation de biofilm, ceux n'ayant pas d'effet préventif sur la formation de biofilm, et ceux présentant une activité souche-dépendante. Afin d'étudier la prédictivité du test Antibiofilmogramme®, un modèle *in vivo* d'infection sur cathéter a été mis au point et a montré une corrélation de la cloxacilline entre l'activité mesurée *in vitro* par le test, et l'activité observée *in vivo* dans le modèle. Cette première étude correspondait aux objectifs de preuve de concept de l'intérêt clinique du test de diagnostic *in vitro* en format microplaque nécessaire à l'enregistrement du test Antibiofilmogramme® comme Dispositif Médical de Diagnostic *in vitro* (DMDIV). La combinaison d'une approche clinique par un recueil de souches et de données, et scientifique par la réalisation des essais *in vitro* et *in vivo*, correspondait aux objectifs du projet visant à démontrer la valeur médicale de l'Antibiofilmogramme®.

Dans la suite de nos travaux, nous avons cherché à comprendre et approfondir les résultats obtenus avec l'Antibiofilmogramme®. En effet, une partie des souches incluses étaient capables d'initier un



biofilm en présence de concentrations de cloxacilline, vancomycine ou teicoplanine supérieures aux concentrations critiques. Nous avons alors étudié la capacité de formation de biofilm de l'ensemble des souches d'un point de vue quantitatif, par la réalisation de cinétiques d'adhésion en BioFilm Ring Test® et de mesure de la formation de biofilm mature en Cristal Violet, et qualitatif via l'utilisation d'enzymes dégradant spécifiquement certains composants du biofilm pour évaluer le rôle de ces derniers dans la formation du biofilm. Une analyse en collaboration avec le service de Biostastique des Hospices Civils de Lyon a permis de mettre en évidence un lien entre la capacité de formation de biofilm et le fond génétique des souches.

Enfin, la dernière partie de nos travaux a été dédiée à la mise au point d'une nouvelle méthode de rinçage et de quantification des biofilms en microplaques applicable pour la mesure précise et reproductible de la formation du biofilm mature. En effet, pour ce type de méthodes, les rinçages nécessaires à l'élimination des bactéries planctoniques sont généralement effectués à la pipette. L'agressivité de cette étape peut conduire au décrochement d'une partie du biofilm, entraînant un manque de reproductibilité des résultats. Dans cette étude, nous avons décrit comment il était possible de réaliser un rinçage des biofilms en utilisant la vapeur d'eau. Nous avons également étudié la possibilité de quantifier un biofilm staphylococcique sans étape de coloration. La combinaison de ces deux approches simples améliorent grandement la reproductibilité des résultats et préservent l'intégrité structurale des biofilms. Cette méthode vient en complément de la technologie BioFilm Ring Test® et offre un ensemble de mesures permettant l'étude des différentes étapes de la formation d'un biofilm (précoce et tardive) de façon fiable et reproductible.

## 1.1 **Première Publication: Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®**

Tasse J, Croisier D, Badel-Berchoux S, Chavanet P, Bernardi T, Provot C, Laurent F

*Article publié dans Pathogens and Disease - 2016*

Comme nous avons pu le voir dans la revue de la littérature présentée, la prise en charge des IOA est complexe. La physiopathologie de ces infections n'est pas encore complètement connue et des échecs thérapeutiques persistent, justifiant des projets de recherche afin d'améliorer la prise en charge sur la base de nouveaux outils de diagnostic et d'évaluation de l'activité des traitements proposés aux patients. Dans ce cadre, l'objectif principal du projet FUI BIOFILM a été de permettre le développement, l'évaluation clinique et l'industrialisation d'un nouveau test appelé Antibiofilmogramme® décrit dans la partie [3.3.6.5](#) de ce document. La collaboration entre le laboratoire de Bactériologie des Hospices Civil de Lyon et BioFilm Control a permis le développement de l'axe des IOA à *S. aureus*.

Concrètement, le projet a débuté par un **recueil de souches et de données cliniques rétrospectives** au sein des 3 laboratoires de bactériologie des HCL, de patients ayant présenté une IOA monomicrobienne à *S. aureus* entre 2001 et 2010. Ce recueil a été validé par le Comité de Protection des Personnes et a permis d'inclure 105 souches de *S. aureus* associées à une centaine de données cliniques par souche regroupant des informations sur les données démographiques et les antécédents des patients, les caractéristiques de l'infection, la prise en charge médicale, l'évolution et les caractéristiques microbiologiques des souches. Par la suite, 29 souches ont été sélectionnées selon le critère de succès (n=15) ou échec thérapeutique (n=14) défini comme suit :

- i) Succès : absence de rechute clinique et microbiologique dans un délai de 2 ans après arrêt du traitement.
- ii) Echec : rechute clinique et microbiologique après arrêt du traitement avec le même germe que celui impliqué dans l'infection initiale.

Pour chaque souche, les **CMI** des antibiotiques les plus couramment prescrits au cours des IOA à *S. aureus* (cloxacilline, daptomycine, fosfomycine, gentamicine, linézolide, ofloxacine, rifampicine, teicoplanine, vancomycine, acide fusidique et clindamycine) ont été déterminées par E-test. La

majorité des souches incluses étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Seules deux souches ont présenté une résistance à l'ofloxacine et la clindamycine respectivement.

Les premiers essais d'**Antibiofilmogramme**<sup>®</sup> ont pu être réalisés sur les 29 souches et ont permis de déterminer les Concentrations Minimale Inhibitrice du biofilm (**CMlb**) des antibiotiques précédemment cités. Pour cela, un inoculum bactérien a été préparé en présence de microbilles magnétisables puis déposé dans une microplaque contenant les antibiotiques à différentes concentrations encadrant les concentrations critiques. Après 4 h d'incubation à 37°C, la capacité des souches à immobiliser les microbilles en présence d'antibiotique a été mesurée en déposant la plaque sur un bloc constitué de 96 mini-aimants centré sous chaque puits. Après 1 minute de contact entre la plaque et le bloc aimanté, la présence d'un spot au centre du puits signifiait que les microbilles magnétisables étaient libres de se déplacer et donc qu'aucun biofilm ne s'était formé. L'antibiotique était capable de prévenir la formation de biofilm à la concentration testée. A l'inverse, l'absence de spot était révélatrice de la présence d'un biofilm et donc de l'inefficacité de l'antibiotique à prévenir la formation de biofilm à la concentration testée.

Les résultats ont mis en évidence que les CMlb étaient toujours supérieures aux CMI. De plus, les antibiotiques ont pu être classés selon 3 profils :

- Les antibiotiques possédant des **CMlb inférieures** aux concentrations critiques du CASFM-EUCAST. Les valeurs de CMlb sont généralement proches des valeurs de CMI, mais systématiquement supérieures. Ces antibiotiques peuvent être considérés comme efficaces sur la prévention de la formation de biofilm. La **clindamycine**, le **linézolide**, l'**acide fusidique** et la **rifampicine** font partie de ce groupe
- Les antibiotiques possédant des **CMlb supérieures** aux concentrations critiques du CASFM-EUCAST. Ces antibiotiques ne semblent pas efficaces pour prévenir la formation de biofilm. La **daptomycine**, la **gentamicine**, la **fosfomycine** et l'**ofloxacine** font partie de ce groupe
- Les antibiotiques possédant des CMlb situées de part et d'autre des concentrations critiques. Leur efficacité semble **souche dépendante**. La **cloxacilline**, la **teicoplanine** et la **vancomycine** font partie de ce groupe.

Afin d'étudier la valeur prédictive du test Antibiofilmogramme<sup>®</sup>, un modèle *in vivo* d'infection sur cathéter a été mis au point sur 3 souches de *S. aureus* en collaboration avec le laboratoire Vivexia. La cloxacilline a été sélectionnée sur la base de son rapport CMlb/CMI élevé permettant d'envisager des profils pharmacocinétiques *in vivo* ciblant i) des concentrations sériques correspondant à la CMI, ii)

des concentrations sériques correspondant à la CMIb. Les profils pharmacocinétiques de la cloxacilline ont été couplés à un modèle de formation de biofilm sur cathéter en position sous cutané. Afin d'étudier la capacité de prévention de la cloxacilline sur la formation de biofilm, le traitement antibiotique a été initié avant l'inoculation. La colonisation du cathéter a été évaluée en dénombrant les bactéries adhérentes par la méthode de dilution en gélose à 12 h, 24 h ou 30 h post traitement. Pour les 3 souches testées, une **réduction faible ou nulle** de la colonisation a été observée à la concentration correspondant à la CMI. A l'inverse, une **réduction de 2 à 3 logs** a été observée à la concentration correspondant à la CMIb.

Dans cette étude, nous avons pu générer les premières valeurs de CMIb et déterminer les antibiotiques pouvant prétendre avoir une efficacité préventive sur la formation de biofilm. Les résultats obtenus *in vivo* sont encourageants en termes de valeur prédictive de l'Antibiofilmogramme® car ils indiquent que la concentration d'antibiotique nécessaire à la prévention de colonisation d'un matériel est supérieure à la concentration inhibant la croissance visible (CMI) des bactéries planctoniques et qu'aux concentrations correspondant aux CMIb déterminées *in vitro*, une réduction de la formation de biofilm *in vivo* est obtenue. D'un point de vue clinique, le test Antibiofilmogramme® pourrait permettre d'optimiser l'antibiothérapie en apportant une donnée supplémentaire sur la prévention de la mise en place du biofilm. Dans le cadre des IOA, ce test pourrait être utilisé en **post-opératoire** immédiat, afin de prévenir la recolonisation du matériel par les bactéries résiduelles, ou lors d'une **bactériémie** notamment à *S. aureus* chez les patient porteur de matériel prothétique, afin de prévenir la colonisation de ce dernier et donc les infections par voie hématogène.



Pathogens and Disease, 74, 2016, ftw057

doi: 10.1093/femspd/ftw057

Advance Access Publication Date: 16 June 2016

Research Article

## RESEARCH ARTICLE

## Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®

Jason Tasse<sup>1,2,\*</sup>, Delphine Croisier<sup>3</sup>, Stéphanie Badel-Berchoux<sup>1</sup>, Pascal Chavanet<sup>3,4</sup>, Thierry Bernardi<sup>1</sup>, Christian Provot<sup>1</sup> and Frédéric Laurent<sup>2</sup>

<sup>1</sup>BioFilm Control, Saint-Beauzire 63360, France, <sup>2</sup>French National Reference Centre for Staphylococci, International Centre for Infectiology Research – Inserm U1111, Hospices Civils de Lyon, Lyon 69000, France, <sup>3</sup>Vivexia Laboratory, Dijon, France and <sup>4</sup>Department of Infectious Disease, Dijon University Hospital, Dijon 21000, France

\*Corresponding author: Laboratoire de Bactériologie, Groupement Hospitalier Nord; 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, Lyon 69004, France. Tel: +33-472-003-770; E-mail: [tasse.jason@gmail.com](mailto:tasse.jason@gmail.com)

**One sentence summary:** Preliminary results of a new test called Antibiofilmogram® able to identify the capacity of antibiotics to inhibit biofilm formation.

Editor: Thomas Bjarnsholt

### ABSTRACT

Biofilms are complex communities of microorganisms embedded in an extracellular matrix and adherent to a surface. The development was described as a four-stage process leading to the formation of a mature biofilm which was resistant to immune system and antibiotic actions. In bone and joint infections (BJIs), the formation of biofilms is a leading cause of treatment failure. Here we study the capacity of 11 antibiotics commonly used in the treatment of BJIs to inhibit the biofilm formation on 29 clinical *Staphylococcus aureus* isolates by a new test called Antibiofilmogram®. The minimal inhibitory concentration (MIC) and biofilm MIC (bMIC) were determined *in vitro* and showed similar values for clindamycin, fusidic acid, linezolid and rifampin. Reversely, daptomycin, fosfomycin, gentamicin and ofloxacin showed a bMIC distribution different from MIC with bMIC above breakpoint. Finally, cloxacillin, teicoplanin and vancomycin revealed an intermediate bMIC distribution with a strain-dependent pattern. A murine *in vivo* model of catheter-associated *S. aureus* infection was made and showed a significant reduction, but not total prevention, of catheter colonization with cloxacillin at bMIC, and no or limited reduction with cloxacillin at MIC. Antibiofilmogram® could be of great interest after surgical operations on contaminated prostheses and after bacteremia in order to prevent the colonization of the device.

**Keywords:** inhibition; biofilm; bone; prevention; BJIs; antibiotic; bMIC

### INTRODUCTION

Biofilm is classically defined as a group of microorganisms attached to a surface and embedded in a self-produced polymeric matrix composed of extracellular DNA, proteins and polysac-

charides (Izano et al. 2008; McCarthy et al. 2015). This mode of growth provides protection to bacteria from the immune system and drug treatment due to (i) poor antibiotic penetration, (ii) the formation of persister cells in the deeper biofilm layers and (iii) the slow rate of bacterial growth due to the

Received: 22 October 2015; Accepted: 3 June 2016

© FEMS 2016. All rights reserved. For permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

physiological state (dormant, inactive, stress adaptation) (Stewart 2015) and the microenvironment (gradients of nutrients and oxygen). Bacterial biofilm is widely found in most human diseases and especially in patients with indwelling devices including intravenous catheter, vascular prosthesis or orthopedic devices (Song et al. 2013; Wu et al. 2015).

In bone and joint infections (BJI), *Staphylococcus aureus* is the main prevalent organism isolated and accounts for more than 50% of infections (Peel et al. 2012; Kremers et al. 2015). These bacteria are recognized as being high biofilm producers, leading to considering BJIs as very difficult to treat diseases, associated with high morbidity and high cost (Kurtz et al. 2012; Jacqueline and Caillon 2014; Gbejuade, Lovering and Webb 2015). The management of BJIs in the presence of an infected prosthetic device requires both a surgical procedure and long-term antimicrobial chemotherapy (Osmon et al. 2013). Acute infections (diagnosed within 4 weeks after the initiation of symptoms) and early infections (occurring within the first 4 post-operative weeks) are classically treated with implant retention (Jiranek et al. 2015). Inversely, the recommended surgical treatment for chronic and tardive infections is a one or two-stage exchange of the device, with removal of necrotic tissue, bone cement and prosthetic material to reduce most of the bacterial burden. Despite optimal medical care, chronic evolution and relapse in infection are frequently reported. Indeed, the residual bacteria can recolonize the prosthetic device, especially in one-stage exchange surgery, and an early biofilm can be reconstituted. The inhibition of bacterial adhesion to the material, which corresponds to the first step of the biofilm formation, may be a good target to avoid treatment failure.

The standard method used in laboratories to determine the antibiotic susceptibility of microorganisms is the minimal inhibitory concentration (MIC) which is only based on the planktonic behavior of bacteria. The minimum biofilm eliminating concentration is a reliable method for biofilm antimicrobial susceptibility testing but the values only reflect the antibiotic efficiency on a mature biofilm which are often more than 1,000-fold higher than the MICs and therefore not adaptable for clinical use (Molina-Manso et al. 2013). Moreover, this method is long and fastidious and not suitable for routine clinical use. To date, there is no method designed to evaluate the biofilm prevention capacity of antibiotics.

The BioFilm Ring Test® (BioFilm Control, Saint-Beauzire, France) is a method allowing for the measurement of the initial steps of biofilm formation, which is the ability of bacteria to adhere to an inert surface and to initiate matrix production (Chavant et al. 2007). This method is based on the immobilization of magnetic beads present in the culture media and can be used to study the capacity of antibiotics to prevent biofilm installation. Here we evaluated the capacity of antibiotics commonly used in the treatment of BJIs to inhibit biofilm formation on 29 clinical *S. aureus* isolates by a new test called the Antibiofilmogram®.

The proof of concept of this method was then explored for cloxacillin in a murine *in vivo* model of catheter-associated *S. aureus* infection. In this study, we investigated whether exposure above the biofilm MIC (bMIC) could prevent biofilm formation according to the Antibiofilmogram® results.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Antibiotics were purchased from EDQM (Strasbourg, France) except daptomycin and linezolid from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). E-test®, Colombia blood agar and

Chapman plates were purchased from bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Brain heart infusion (BHI) broth was from Conda (Madrid, Spain). 96-well microplates were from Corning (Amsterdam, The Netherlands). The microbeads and contrast liquid were manufactured by BioFilm Control. The plate reader (scanner), the block carrying 96 micromagnets and the BFC Elements® software (first version) were developed by BioFilm Control. Sterile polyurethane catheters were from Teleflex Medical (Le Faget, France).

### Collection of *Staphylococcus aureus* from BJI

A collection of 29 *Staphylococcus aureus* isolates (LYO-SXX) responsible for a first episode of BJI in the Hospices Civils de Lyon hospitals (Lyon, France) from 2001 to 2010 was used in this study. The French South-East ethics committee approved this collection of clinical data and clinical strains (reference number 2013-018). All strains were characterized for biofilm formation by the crystal violet assay. According to the classification of Stepanovic et al. (2000), 1/29 strain was categorized as weakly adherent, 15/29 were categorized as moderately adherent and 13/29 were categorized as strongly adherent.

### MIC determination

MICs of cloxacillin, daptomycin, fosfomicin, gentamicin, linezolid, ofloxacin, rifampin, teicoplanin, vancomycin, fusidic acid and clindamycin were determined using the E-test® method. All isolates were subcultured on Colombia blood agar plates and incubated at 37°C for 18 h and the inoculum was standardized to 0.5 McFarland. The MIC values were determined after 18 h of incubation at 37°C according to the manufacturer's instructions. The *S. aureus* ATCC 25923 was used as a control for MICs determination. The results were interpreted according to the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2015 (CASFM) guidelines.

### bMIC determination

The bMIC of clindamycin, cloxacillin, daptomycin, fosfomicin, fusidic acid, gentamicin, linezolid, ofloxacin, rifampin, teicoplanin and vancomycin were determined using the new Antibiofilmogram® test (BioFilm Control). The isolates were subcultured on Colombia blood agar plates and then grown in BHI at 37°C for 18 h. After standardization of the inoculum to  $OD_{600\text{ nm}} = 1 \pm 0.05$  (Ultraspex 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences, USA) the bacteria were diluted in sterile BHI to obtain a final concentration of  $4 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. This BHI which also contained 10 µL mL<sup>-1</sup> of 'Toner', consisting of a magnetic bead suspension, was added at 200 µL per well to a 96-well microplate containing antibiotic solutions. Dedicated BHI provided in the kit by the manufacturer was used because it ensured the growth and the measurement of biofilm formation of most bacteria and has no interaction with magnetic beads. The microplates were pre-loaded by 20 µL of antibiotic solutions in a range of eight 2-fold dilutions ranging from 8 to 0.0625 µg mL<sup>-1</sup> for daptomycin, fusidic acid, gentamicin and rifampin; 16 to 0.125 µg mL<sup>-1</sup> for clindamycin, cloxacillin, linezolid, teicoplanin and vancomycin; 64 to 0.5 µg mL<sup>-1</sup> for ofloxacin and 128 to 1 µg mL<sup>-1</sup> for fosfomicin. The microplate containing bacteria and antibiotics was incubated at 37°C for 4 h. The wells were covered with 100 µL of a contrast liquid solution before being scanned a first time by the plate reader. The microplate was then placed for 1 min on a magnet support and scanned a second time. During magnet contact, free beads were attracted to the center of each well,

resulting in a visible spot. In contrast, beads trapped in a biofilm were unable to move and no spot was formed. For each plate, the wells in column 1 were used for both negative control (BHI plus beads to check for the absence of contamination, leading to a spot) and positive control (BHI plus beads plus strain to check for the strain's capacity to form a biofilm, leading to an absence of spots). The spot features were read visually for each antibiotic to quantify the efficiencies to prevent biofilm formation. A visible spot meant that the concentration of antibiotic tested was able to prevent biofilm formation. The bMIC was determined for each antibiotic as the lowest concentration where a spot, similar to negative control, was visible. As the aim of this method was to measure the initial step required for biofilm formation, and as it has been well demonstrated that if this step was inhibited, biofilm formation can no longer occur, we used 4 h incubation time to test the antibiotic action in our study. To be sure that the toner has no interaction with antibiotics, two microplates with or without magnetic beads were performed for the *S. aureus* ATCC 29213 strains as described above. Microplates were incubated for 24 h at 37°C, and the MIC was determined for each antibiotic.

### In vivo model

#### Animals

BALB/c female mice (weighing 22–24 g) were used for all studies (Charles River, France). These animals were immunocompetent and housed in a protected area in the 'Centre de Zootechnie de l'Université de Bourgogne' (Biosafety level 2 facility) and were fed ad libitum according to the current recommendations by the European Institute of Health. No fasting period was performed in this study. Before each experiment, the animals were stabled for a week in a conventional area of the animal facility. During this period and for the duration of the study, qualified members of staff checked on the animals twice a day and assessed their well-being. The animal facility is authorized by the French authorities (Agreement N°C 21 464 04 EA). Animal housing and experimental procedures were performed according to the French and European Regulations and the NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All the procedures using animals were submitted to the Animal Care and Use Committee C2EA approved by the French authorities.

#### Experimental model of infection

Of the 29 *S. aureus* strains, three (LYO-S31, LYO-S39 and LYO-S14) were used for this *in vivo* study because the differences between MIC and bMIC values of cloxacillin were significant.

The animals were anaesthetized by intraperitoneal (ip) injection of a mixture of ketamine (50 mg kg<sup>-1</sup>) and xylazine (10 mg kg<sup>-1</sup>). The flanks were shaved and then disinfected (three cycles of betadine). A subcutaneous incision of 0.2 cm was performed under sterile conditions and a 1 cm segment of polyurethane catheter (Ref ES-04730 Arrow international) cut into two longitudinal fragments was inserted subcutaneously (at about 2 cm from the incision to avoid any contamination). Inoculation was performed simultaneously by placing 50 µl of the bacterial culture onto the catheter (10<sup>7</sup> CFUs per mouse). The incision was sutured and disinfected. In each study, non-infected mice were used to guarantee that the experiment was performed in sterile conditions.

#### Drug pharmacokinetics

Cloxacillin was selected as a good candidate for the *in vivo* investigation as T > MIC is the most relevant pharmacodynamic

parameter for beta-lactam. Cloxacillin could be administered in order to mimic a continuous infusion exposure. In order to determine the spontaneous pharmacokinetic (PK) of cloxacillin, a previous single dose study was performed with mice given cloxacillin intraperitoneally at doses of 100, 200 and 400 mg kg<sup>-1</sup>. Pure commercial solution was used for Cloxacillin PanPharma 1 g and reconstituted in sterile serum saline according to the manufacturer's instructions.

The mice were anaesthetized by gas (air/isoflurane mix) in order to collect blood by cardiac puncture. All the animals were then euthanized by cervical dislocation. The blood samples were centrifuged (10 min at 2300 g, 4°C) within 60 min of collection and serum samples were stored at -80°C with all samples frozen within 1 h of processing. Drug levels in serum were determined using an HPLC-DAD method, according to the ISO 15189 norm (Dr AS Lemaire-Hurtel, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, CHU Amiens, France). The lower limit of quantification was 2.5 µg mL<sup>-1</sup>.

After PK characterization of the single doses, these data were used to determine the optimal regimen that should be used to simulate a cloxacillin concentration time profile between MIC and bMIC or greater than bMIC: (i) between 0.125 and 2 mg L<sup>-1</sup> or greater than 2 mg L<sup>-1</sup> for LYO-S14 infected mice; (ii) between 0.39 and 4 mg L<sup>-1</sup> or greater than 4 mg L<sup>-1</sup> for LYO-S31 infected mice; (iii) between 0.19 and 4 mg L<sup>-1</sup> or greater than 4 mg L<sup>-1</sup> for LYO-S39 infected mice.

The continuous equivalent treatment of cloxacillin was initiated intraperitoneally in infected mice 30 min before the infection in order to study the capacity of biofilm inhibition (this timing corresponded to the T<sub>max</sub> obtained in mice in a previous pilot study) and included (i) a loading dose (T<sub>0h30</sub>) at 30 mg kg<sup>-1</sup> (>bMIC) or 10 mg kg<sup>-1</sup> (<bMIC) and four lower doses administered every 2 h (T<sub>1h30</sub>, T<sub>3h30</sub>, T<sub>5h30</sub> and T<sub>7h30</sub> post-infection) at 15 mg kg<sup>-1</sup> (>bMIC) or 3 mg kg<sup>-1</sup> (<bMIC). Overall, five doses were administered to cover a 10 h exposure period (meaning 30% of the time over 24 h). The mice were then anesthetized and euthanized by cervical dislocation at 12, 24 or 30 h post-treatment. The catheter was removed, transferred to a sterile tube and processed for bacterial quantification.

Confirmatory studies were also undertaken in treated but non-infected animals (10 mice in the >bMIC treated group and 10 mice in the <bMIC group) to ensure that target exposures of cloxacillin were achieved.

### Bacterial quantification

Each fragment of catheter was individually washed under aseptic conditions in an Eppendorf tube (three successive washing steps with 300 µL of sterile saline) to remove non-adherent bacteria. After the last wash, the catheter was resuspended in 1 mL of sterile saline and was vigorously vortexed for 30 s before putting in an ultrasonic bath (Advantage Lab) for 3 min, 50 Hz at room temperature in order to detach all adherent bacteria from the catheter. The bacterial burden was measured by plating several successive dilutions of this suspension onto Chapman agar plates for 48 h at 37°C.

### Statistical analysis

*In vivo* data were analyzed by a Mann-Whitney analysis using Prism software (GraphPad, San Diego, USA). Median and standard deviations are shown and P values are NS: not significant, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.0001.

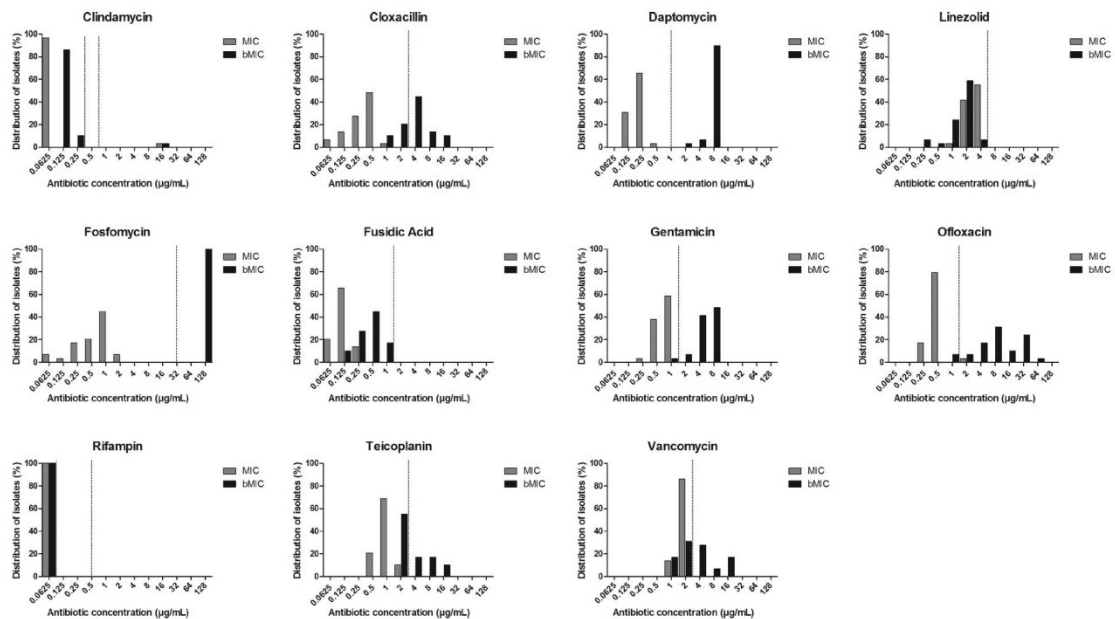


Figure 1. MIC (gray bars) and bMIC (black bars) distribution of 29 clinical isolates involved in BJIs for 11 antibiotics. Results are expressed as a percentage. MICs were determined using the E-test<sup>®</sup> according to the manufacturer's instructions. The breakpoint defined by the CASFM is presented for each antibiotic using dotted lines. bMICs were determined using Antibiofilmogram<sup>®</sup>. For this method, the inoculum of each isolate was standardized and diluted in BHI containing toner (magnetic beads). The suspension was added to a 96-well microplate with antibiotics tested in a range of eight 2-fold dilutions. After incubation at 37°C for 4 h, the microplate was placed on a magnet support to evaluate the mobility of the beads in order to deduce the capacity of each concentration of antibiotic to inhibit biofilm formation.

## RESULTS

### MIC and bMIC determination

Susceptibility to 11 antibiotics for 29 clinical isolates involved in BJI was determined using the E-test method (Fig. 1). Only two isolates showed resistance to ofloxacin and clindamycin, respectively. For all the other antibiotics, the strains were classified as susceptible.

The capacity of the antibiotics to prevent biofilm formation was evaluated using the Antibiofilmogram<sup>®</sup> method. Antibiotic was present from the initial incubation time (H0). After 4 h of incubation using BHI provided by the manufacturer without antibiotics (positive control), all the strains were able to block beads which means they formed an early biofilm. No interaction was observed after 24 h incubation between magnetic beads and antibiotics using the ATCC 29213 strains. In the presence of antibiotics, three profiles of biofilm prevention based on bMIC were identified. Clindamycin, fusidic acid, linezolid and rifampin revealed a bMIC distribution similar or close to the MIC and at least, a bMIC value below breakpoint(s) for all isolates, except the strain resistant to clindamycin. On the contrary, daptomycin, fosfomycin, gentamicin and ofloxacin showed a bMIC distribution different from the MIC values with bMIC above breakpoint for all isolates. Finally, cloxacillin, teicoplanin and vancomycin revealed an intermediate bMIC distribution with part of the population harboring a bMIC over breakpoint. Indeed, 9, 16 and 14 strains showed a bMIC below breakpoint for these three drugs, respectively.

### In-vivo model of catheter-associated infection

To support *in vitro* results and evaluate the predictive value of Antibiofilmogram<sup>®</sup> for the *in vivo* biofilm prevention capacity

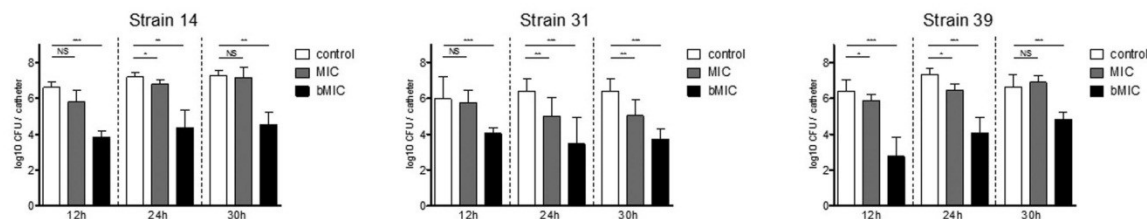
Table 1. MIC, bMIC and bMIC/MIC ratio of cloxacillin obtained for the isolates LYO-S14, LYO-S31 and LYO-S39. Results are expressed as a concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). MICs were determined using the E-test, and bMICs were determined using the Antibiofilmogram.

Cloxacillin			
Strain number	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	bMIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	bMIC/MIC ratio
14	0.125	2	16
31	0.39	4	10.3
39	0.19	4	21.1

of antibiotics, three *Staphylococcus aureus* strains were chosen to be tested in a mouse model of catheter-associated infection, treated with cloxacillin prior to and following the inoculation of the strain. Cloxacillin was the first antibiotic tested in this model because the bMIC/MIC ratio was high (16, 10.3, 21.1 for these three strains, respectively; (Table 1)). This difference between MIC and bMIC allowed us to simulate exposure within or above these concentrations. The average cloxacillin serum concentrations obtained after a >bMIC simulation was about  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  (except after the loading dose where the Cmax was about  $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and the average cloxacillin serum concentrations obtained after a <bMIC simulation was  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (except after the loading dose where the Cmax was about  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

The results for the isolate LYO-S14 revealed that there is no significant difference in colonization based on adherent bacteria enumeration between control and MIC concentrations after





**Figure 2.** Cloxacillin efficiency in biofilm prevention in vivo model. The catheter infection model was performed on strains LYO-S14, LYO-S31 and LYO-S39. Cloxacillin was administered at two concentrations targeting the MIC (gray bars) and bMIC (black bars) as described in materials and methods section. White bars represent the control mice without antibiotic treatment. Quantification of adherent bacteria on the implanted polyurethane catheter was measured after 12, 24 or 30 h of treatment by serial dilution and plate counting on agar plates. Results are expressed in log<sub>10</sub> CFU/catheter. Statistical differences \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) and \*\*\* ( $P < 0.001$ ) between each group were obtained using Mann-Whitney U test.

12 or 30 h of treatment (Fig. 2). On the contrary, the bMIC concentration of cloxacillin significantly reduced the colonization of the catheter, showing a 2.7 log ( $P < 0.001$ ), 2.8 log ( $P < 0.01$ ) and 3.1 log ( $P < 0.01$ ) reduction of adherent bacteria quantification after 12, 24 and 30 h, respectively (Fig. 2). Similar results were observed with the strain LYO-S39, showing a high reduction in colonization with bMIC concentrations (3.5 log, 3.0 log and 1.9 log after 12, 24 and 30 h, respectively;  $P < 0.001$ ) and a lower or non-significant reduction with MIC concentrations (0.5 log ( $P < 0.05$ ), 0.6 log ( $P < 0.05$ ) and no reduction after 12, 24 and 30 h, respectively). Finally, the isolate LYO-31 showed a higher diminution of colonization with bMIC than with MIC, showing a reduction of 2.5 log ( $P < 0.001$ ) vs 0.6 log (NS), 2.9 log ( $P < 0.001$ ) vs 1.4 log ( $P < 0.01$ ) and 2.7 log ( $P < 0.001$ ) vs 1.3 log ( $P < 0.01$ ) after 12, 24 and 30 h respectively.

## DISCUSSION

It has been estimated that 65% of nosocomial infections are biofilm associated. Bacteria embedded in biofilms are protected against the action of most of antibiotics. For example, BJIs involving biofilms, especially in the presence of a foreign body, are very difficult to treat and require intensive management including in most cases, the removal of the infected device. To fight against biofilms, strategy developments are mainly focused on how to kill bacteria on already formed biofilms. Here, we proposed a new vision of how antibiotics can be selected to have the best profile of antimicrobial activity including biofilms. Indeed, the goal of this study was not to determine antibiotic efficiency against mature biofilms but to evaluate the ability of antibiotics to prevent biofilm formation. This could be of great interest by reducing the incidence of BJIs in a context where prosthesis implantations continue to rise. Here, we evaluated the bMIC of 11 antibiotics on 29 clinical isolates.

In order to study the action of antibiotics on growth inhibition and biofilm prevention, both the classical MIC and the new bMIC values were determined using the E-test and the Antibiofilmogram® methods, respectively. Fosfomycin is the only antibiotic that showed no efficacy against biofilm prevention, with bMICs  $> 128 \mu\text{g mL}^{-1}$  for all isolates. Moreover, 26/29 (90%) isolates have a bMIC for daptomycin of  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Conversely, clindamycin and rifampin showed high potency of biofilm prevention with low bMIC for all isolates, especially for rifampin for which all isolates have a bMIC  $< 0.0625 \mu\text{g mL}^{-1}$ . These results support the hypothesis that these antibiotics have a similar potency of biofilm prevention against all *Staphylococcus aureus*. To validate this hypothesis, further studies including

larger numbers of strains are needed. Alternatively, cloxacillin, linezolid, fusidic acid, gentamicin, ofloxacin, teicoplanin and vancomycin showed different bMICs for the 29 isolates. Indeed, the bMIC ranged from four or more antibiotic 2-fold dilutions. These results showed that antibiotic susceptibility in terms of biofilm prevention depends on the isolate.

The bMIC determined in this study was always higher than the MIC for all the antibiotics. Indeed, the bMIC ranged from  $0.125$  to  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $0.125$  to  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $0.25$  to  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $0.0625 \mu\text{g mL}^{-1}$  for clindamycin, fusidic acid, linezolid and rifampin, respectively. PK studies have shown that these antibiotics have a good diffusion in bone tissue (Cluzel et al. 1984; Turnidge 1999; Lovering et al. 2002; El Samad et al. 2008) suggesting that bMIC could be reached in infected patients.

*In vivo* results have shown no or limited reduction in adherent bacteria when simulating a  $< \text{bMIC}$ , but  $> \text{MIC}$  exposure. Conversely, when simulating a  $> \text{bMIC}$  exposure, even if a complete prevention was not observed as expected according to *in vitro* results, a highly significant reduction in biofilm formation was obtained (at least 1.9 log). The differences in the *in vivo* and *in vitro* results are likely related to the higher size of the inoculum in mice ( $10^7$  CFUs per mouse) compared to the inoculum used *in vitro* ( $10^6$  CFUs per wells). To confirm a complete protection of the device, further studies deserved to be done using a lower inoculum, as previously reported by Metsemakers et al. (2015). The different nature of the devices, i.e. polystyrene for wells used *in vitro* and polyurethane for catheters used *in vivo* might have also impact the differential ability to form biofilm in presence of antibiotics. Finally, exposure to antibiotics was also different. For Antibiofilmogram®, concentrations are fixed through the *in vitro* experiment. Conversely, if the target of exposure for cloxacillin was obtained *in vivo*, these are total serum concentrations. Neither the free fraction nor the tissue penetration or its variations at the site of infection were taken into account. These points should be addressed. In the future, other animal models, more complex but likely more relevant, could be useful, including rabbit prosthetic-infected implant model with monitored antibiotic delivery (human-like continuous infusion) (Isiklar et al. 1996; Sheehan et al. 2004).

In this study, we only tested the efficiency of cloxacillin *in vivo*. It could be interesting to evaluate the capacity of other antibiotics that are inefficient in biofilm prevention according to Antibiofilmogram®, such as fosfomycin. Indeed, it could be anticipated that the fosfomycin regimen would be associated to poor efficacy in biofilm prevention, even at high concentrations, which may confirm that the efficiency of the bMIC of cloxacillin was not solely due to the higher concentration of drugs administered.

Finally, only three strains were tested *in vivo* and all the isolates included in this study were isolated from BJIs. It could be of great interest to include *S. aureus* strains from other biofilm infections as well as methicillin-resistant *S. aureus* to study the antibiotic efficiency on resistant strains. However, BJIs are mainly caused by staphylococci, and biofilms play a key role in the management of these infections, supporting the clinical relevance of this study (Arciola *et al.* 2015).

The current clinical guidelines for orthopedic infection devices are only based on the MIC. Despite the administration of antibiotics classified as susceptible on the basis of classical antimicrobial susceptibility tests and optimal management of infection, treatment failures are reported (Jover Saenz *et al.* 2007; Lora-Tamayo *et al.* 2013). The combination of MIC and bMIC could help the clinician to optimize antibiotic therapy and to select drugs showing the best antimicrobial profile, i.e. active on both planktonic and sessile bacteria. Within clinical strains classified as susceptible regarding MIC, the Antibiofilmogram® would help to discriminate in routine the strains able to form biofilm in the presence of antibiotics (classified as resistant regarding bMIC) from the strain not able to form biofilm in the presence of antibiotics (classified as susceptible regarding bMIC).

In the presence of material, it has been shown that only  $10^2$  CFU mL<sup>-1</sup> of *S. aureus* are sufficient to induce an infection (Zimmerli *et al.* 1982). After surgical treatment, this amount of bacteria can be kept. The prosthetic material remaining in place in case of debridement as well as new material during one-stage protocol can be recolonized by residual bacterial inoculum leading to treatment failure (Marculescu *et al.* 2006; Cobo *et al.* 2011; Tornero *et al.* 2012). *In vivo* results revealed that a high log reduction of adherent bacteria can be obtained using the bMIC of cloxacillin. In this context, Antibiofilmogram® could be useful when the bacteria was identified from preoperative biopsy (blood culture, synovial fluid aspiration, true cut sampling performed prior surgery) and could permit to adjust pre-operative and early post-operative antibiotherapy. By preventing colonization of the device, the bMIC could facilitate the immune system to eliminate the remaining bacteria before the reoccurrence of biofilm and avoid relapse. Such new approach and data are of major interest because surgical procedure with only one surgery is less intensive, costs significantly less and may provide outcomes superior to two-stage exchanges (Lorenze *et al.* 1998; Nagra *et al.* 2015). In order to be more representative of the guidelines in the management of BJI, combination therapies should be tested. Indeed, antibiotics are never administered alone. The efficiency of combination therapies is known to be significantly better than antibiotic monotherapies (Zimmerli, Trampuz and Ochsner 2004). Further studies are needed to estimate the bMIC of antibiotic combination, especially with rifampin which is considered to be a key molecule for the treatment of biofilm-associated infection (Zimmerli *et al.* 1998). To finish, the bMIC could be useful for patients with prosthetic devices who develop *S. aureus* bacteremia. Indeed, the risk of the prosthesis becoming infected is high and can occur in nearly half of patients (Murdoch *et al.* 2001; Chu *et al.* 2005). Administration of antibiotics able to reduce the risk of colonization could be interesting in terms of cost, morbidity and mortality by reducing the number of patients infected.

To our knowledge, there are no studies that investigated the capacity of antibiotics to inhibit biofilm formation. Further studies were needed to confirm these preliminary results of Antibiofilmogram®. Finally, the determination of bMIC could be applied to a large variety of infections with medical devices such

as drug delivery systems, prosthetic vascular grafts or urinary catheters as well as cystic fibrosis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sophie Assant for her help and advice. The authors (BioFilm Control) would like to thank Aurelie Comby, Laurine Gastal, Jerome Groelly for excellent technical assistance, and Arnaud Clement for data analysis. The authors (Vivexia) would like to thank Delphine Labrousse, Davy Hayez, Nicolas Taveau and Sandrine Albac for excellent *in vivo* technical assistance.

## FUNDING

This work was partly supported by a grant from the 15th Fonds Unique Interministériel (FUI) call for projects. TB, CP and SB are members of Biofilm Control SAS, Saint-Beauzire, France. A CIFRE fellowship from Biofilm Control and the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) for JT is gratefully acknowledged.

**Conflict of interest.** None declared.

## REFERENCES

- Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD *et al.* Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Adv Exp Med Biol* 2015;**830**:29–46.
- Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R *et al.* A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Meth* 2007;**68**:605–12.
- Chu VH, Crosslin DR, Friedman JY *et al.* Staphylococcus aureus bacteremia in patients with prosthetic devices: costs and outcomes. *Am J Med* 2005;**118**:1416.
- Cluzel RA, Lopitiaux R, Sirot J *et al.* Rifampicin in the treatment of osteoarticular infections due to staphylococci. *J Antimicrob Chemoth* 1984;**13** (Suppl C):23–9.
- Cobo J, Miguel LG, Euba G *et al.* Early prosthetic joint infection: outcomes with debridement and implant retention followed by antibiotic therapy. *Clin Microbiol Infec* 2011;**17**: 1632–7.
- El Samad Y, Havet E, Bentayeb H *et al.* Treatment of osteoarticular infections with clindamycin in adults. *Med Maladies Infect* 2008;**38**:465–70.
- Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop* 2015;**86**:147–58.
- Isiklar ZU, Darouiche RO, Landon GC *et al.* Efficacy of antibiotics alone for orthopaedic device related infections. *Clin Orthop Relat R* 1996;**332**:184–9.
- Izano EA, Amarante MA, Kher WB *et al.* Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Appl Environ Microb* 2008;**74**:470–6.
- Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemoth* 2014;**69** (Suppl 1):i37–40.
- Jiranek WA, Waligora AC, Hess SR *et al.* Surgical treatment of prosthetic joint infections of the hip and knee: changing paradigms? *J Arthroplasty* 2015;**30**:912–8.
- Jover Saenz A, Barcenilla Gaité F, Torres Puig Gros J *et al.* Total prosthetic knee and hip joint infection. Descriptive epidemiology, therapeutics and evolution in a secondary hospital during ten years. *An Med Intern* 2007;**24**:19–23.

- Kremers HM, Nwojo ME, Ransom JE et al. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am* 2015;97:837–45.
- Kurtz SM, Lau E, Watson H et al. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty* 2012;27:(61–65):e61.
- Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis* 2013;56:182–94.
- Lorenze M, Huo MH, Zatorski LE et al. A comparison of the cost effectiveness of one-stage versus two-stage bilateral total hip replacement. *Orthopedics* 1998;21:1249–52.
- Lovering AM, Zhang J, Bannister GC et al. Penetration of linezolid into bone, fat, muscle and haematoma of patients undergoing routine hip replacement. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:73–7.
- McCarthy H, Rudkin JK, Black NS et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:1.
- Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD et al. Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. *Clin Infect Dis* 2006;42:471–8.
- Metsemakers WJ, Emanuel N, Cohen O et al. A doxycycline-loaded polymer-lipid encapsulation matrix coating for the prevention of implant-related osteomyelitis due to doxycycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Control Release* 2015;209:47–56.
- Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Perez A et al. *In vitro* susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Ag* 2013;41:521–3.
- Murdoch DR, Roberts SA, Fowler VG, Jr et al. Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2001;32:647–9.
- Nagra NS, Hamilton TW, Ganatra S et al. One-stage versus two-stage exchange arthroplasty for infected total knee arthroplasty: a systematic review. *Knee Surg Sport Tr A* 2015.
- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56:e1–25.
- Peel TN, Cheng AC, Buising KL et al. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Ch* 2012;56:2386–91.
- Sheehan E, McKenna J, Mulhall KJ et al. Adhesion of *Staphylococcus* to orthopaedic metals, an *in vivo* study. *J Orthop Res* 2004;22:39–43.
- Song Z, Borgwardt L, Hoiby N et al. Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. *Orthop Rev* 2013;5:65–71.
- Stepanovic S, Vukovic S, Dakic I et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Meth* 2000;40:175–9.
- Stewart PS. Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol Spectr* 2015;3:1–13.
- Tornero E, Garcia-Oltra E, Garcia-Ramiro S et al. Prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Int J Artif Organs* 2012;35:884–92.
- Turnidge J. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Ag* 1999;12 (Suppl 2):S23–34.
- Wu H, Moser C, Wang HZ et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* 2015;7:1–7.
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645–54.
- Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P et al. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 1982;146:487–97.
- Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M et al. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA* 1998;279:1537–41.

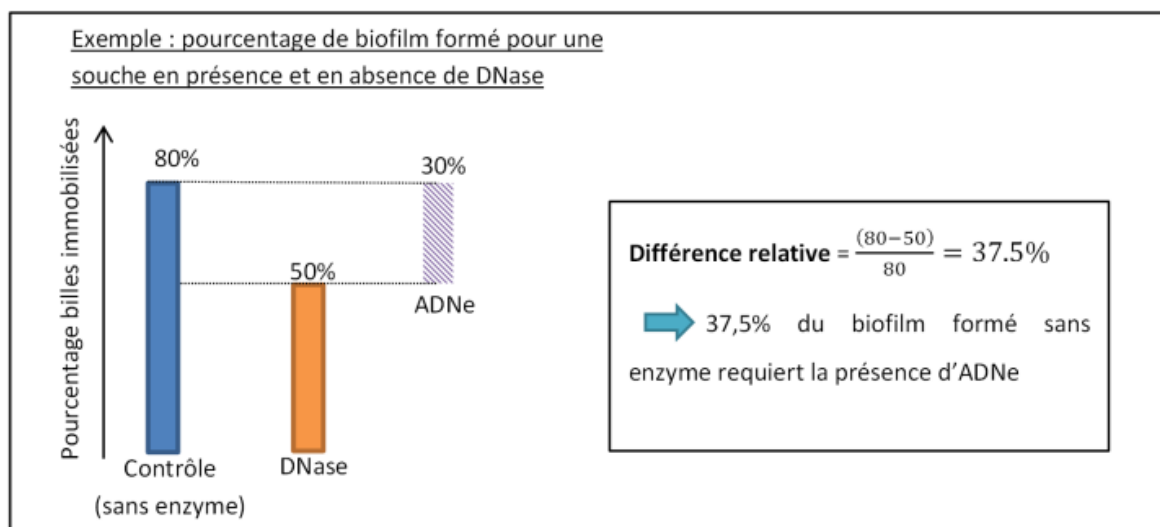
## 1.2 Deuxième Publication: Association between biofilm formation and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* from prosthetic joint infections

Tasse J, Trouillet-Assant S, Josse J, Provot C, Badel-Berchoux S, Bernardi T, Laurent F

*Article en cours de soumission dans PLOS ONE - 2017*

Les premiers résultats d'Antibiofilmogramme® obtenus dans la publication précédente ont mis en évidence un comportement particulier des souches testées vis-à-vis de la cloxacilline, de la vancomycine et de la teicoplanine. Contrairement aux autres antibiotiques pour lesquelles les CMIb étaient systématiquement supérieures ou inférieures aux concentrations critiques (comportement homogène de toutes les souches étudiées), certaines souches étaient capables d'initier un biofilm en présence de concentrations supérieures aux concentrations critiques alors que d'autres souches ne parvenaient pas à former un biofilm en présence d'antibiotique à des concentrations inférieures aux concentrations critiques. Afin d'expliquer ces résultats, nous avons décidé de caractériser la capacité de formation de biofilm de l'ensemble des souches via plusieurs approches :

- Une étude de la formation de **biofilm précoce** au travers de la réalisation de cinétique d'adhésion et de formation de biofilm en BioFilm Ring Test® (0 à 8 h).
- Une étude sur la quantité de **biofilm mature** produite à 24 h en Cristal Violet.
- Une étude **qualitative** des composants intervenant dans l'initiation d'un biofilm via l'utilisation de deux enzymes dégradants spécifiquement des composants de la matrice en BioFilm Ring Test®. Nous avons ainsi pu évaluer le rôle de **l'ADNe** (au travers l'utilisation de DNase), et le rôle des **protéines** (au travers l'utilisation de protéinase K) dans la formation de biofilm précoce. Les enzymes ont été ajoutées au milieu de culture dès le début de l'incubation, au moment de la mise en plaque. Le pourcentage de billes immobilisées après 6 h d'incubation a été comparé à la condition contrôle (sans enzyme) et les résultats ont été exprimés en différence relative selon la formule illustrée dans l'exemple qui suit :



**Figure 28 : Exemple du calcul de la différence relative d'un biofilm formé en présence de DNase pour une souche, reflétant le rôle de l'ADNe dans la formation du biofilm.**

Les souches ont également été caractérisées par des puces à ADN, révélant la présence de plus de 300 gènes ou allèles d'intérêt et permettant une affiliation à un clone. Nous avons analysé les résultats obtenus sur la formation de biofilm en groupant les souches en fonction du **complexe clonal** (CC) auxquelles elles appartenaient. L'analyse a été conduite sur les 4 CC principaux retrouvés (CC5 (n=6), CC15 (n=5), CC30 (n=7) et CC45 (n=6)) en collaboration avec le service de biostatistique des Hospices Civils de Lyon.

Les souches appartenant au CC30 ont révélé une vitesse de formation de biofilm précoce significativement moins élevées que les autres CC. Les souches du CC5 et du CC30 formaient significativement moins de biofilm mature (Cristal Violet) que les deux autres CC. Le CC45 formaient significativement plus de biofilm mature que les autres CCs. Les essais réalisés en présence d'enzymes ont mis en avant que l'ADNe était fortement impliqué dans la formation de biofilm précoce pour les souches appartenant aux CC5, CC15 et CC30. À l'inverse les protéines étaient impliquées plus fortement sur la formation de biofilm précoce pour les souches appartenant au CC45.

Enfin, en groupant les résultats d'Antibiofilmogramme® en fonction des CC, nous avons pu observer pour le CC30 que la proportion de souche dont la formation de biofilm est inhibée à des concentrations inférieures aux concentrations critiques était plus importante que pour les autres CC,

quel que soit l'antibiotique. Cette tendance pourrait être liée à la faible vitesse de formation de biofilm précoce observée en BioFilm Ring Test pour ce CC.

Au final, dans cette étude, nous avons pu démontrer que la capacité de formation de biofilm des souches cliniques responsable d'IOA sur matériel était directement liée à leur fond génétique.

# Association between biofilm formation and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections

Jason Tasse<sup>1,2</sup>, Sophie Trouillet Assant<sup>1</sup>, Jérôme Josse<sup>1</sup>, Christian Provot<sup>2</sup>, Stéphanie Badel-Berchoux<sup>2</sup>, Thierry Bernardi<sup>2</sup>, Frédéric Laurent<sup>1</sup>

<sup>1</sup> French National Reference Centre for Staphylococci, International Centre for Infectiology Research – Inserm U1111, Hospices Civils de Lyon, Lyon 69000, France

<sup>2</sup> BioFilm Control, Saint-Beauzire 63360, France

**Correspondence:** tasse.jason@gmail.com; phone: +33 472 003 770

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, biofilm, PJIs, clonal complex, bMIC

## ABSTRACT

Biofilm formation is considered as a critical virulence factor responsible for treatment failure and chronicity in Prosthetic Joint Infections (PJIs) caused by *Staphylococcus aureus*. Various clonal lineages may have different biofilm forming capacities. The aim of this study was to investigate the correlation between clonal complex (CC) and biofilm phenotype on 30 clinical *S. aureus* isolates based on i) the BioFilm Ring Test<sup>®</sup> for early biofilm formation and Crystal Violet assay for mature biofilm formation, ii) the biofilm composition using DNase and proteinase K and iii) the biofilm Minimal Inhibitory Concentration (bMIC) of cloxacillin, teicoplanin and vancomycin. Regarding the early biofilm formation, CC30 revealed a slower phenotype than CC5, CC15 and CC45. Strains associated with CC45 produced a large amount of mature biofilm compared to other CCs. The biofilm formation of strains belonging to CC5, CC15 and CC30 was highly related to extracellular DNA whereas for strains belonging to CC45 it was more related to proteins. Finally, the percentage of bMIC susceptible strains belonging to CC30 was higher than the overall mean for cloxacillin, teicoplanin and vancomycin. In conclusion, the biofilm phenotype of clinical *S. aureus* isolates from PJIs is correlated with the CC affiliation.

---

## INTRODUCTION

Prosthetic joint infections (PJIs) are largely considered difficult to treat. They require surgical procedure including debridement-lavage or prosthesis replacement associated with a prolonged antimicrobial therapy (1,2). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a leading cause of PJIs accounting for approximately a third of these infections in France and elsewhere (3,4). Despite an optimal management, failure of treatments and relapse of the infection are reported in 10 to 20% of the patients (5). One of the main bacterial factors responsible for this complication is the formation of a biofilm (6,7).

A biofilm is defined as a structured community of bacteria attached to an abiotic or a biotic surface and enshrouded in a matrix composed of polysaccharides, proteins, extracellular DNA (eDNA) and host components (8,9). Within the biofilm, bacteria are protected from the host immune system and display a phenotypic antibiotic tolerance (10). Classically, the minimal inhibitory concentration (MIC) is determined for the clinical isolates involved in infections and is used to develop an optimal antimicrobial chemotherapy. However, this approach only explores the antimicrobial activity against planktonic bacteria, and does not take into account the sessile form of bacteria. Hence, classical MICs are not predictive of the antibiotic efficacy against biofilm. In a previous study, we reported that the preventive biofilm MIC (bMIC), corresponding to the antibiotic concentration required to prevent the biofilm installation, can be assessed using a new method called Antibiofilmogram® (11). Determination of bMIC is a promising tool to prevent biofilm infection in a large variety of clinical contexts, especially when medical devices are implanted. We found that cloxacillin, teicoplanin and vancomycin have a strain-dependent bMIC distribution pattern. However, no explanation was proposed at this time to understand why some strains do or do not have the capacity to form biofilm in the presence of a specific concentration of antimicrobials. We hypothesized that these trends might be due to specific biofilm phenotypes (i.e. qualitative, quantitative and/or dynamic features) related to the clonal lineage of the strains.

The aim of the present study was to investigate if a correlation could be established between the clonal lineages and the biofilm phenotypes of a collection of 30 clinical *S. aureus* strains responsible for PJIs. The isolates were characterized using the Alere StaphyType DNA microarray covering 334 target sequences (approximately 170 distinct genes and their allelic variants). By comparison with a database of reference strains previously subjected to multi-locus sequence typing (MLST), the isolates were assigned to clonal complex (CC) (12). Biofilm phenotypes were investigated based on i)



the kinetic of formation using the BioFilm Ring Test® and Crystal Violet assay, ii) the biofilm composition using enzymes targeting specific biofilm matrix components, and iii) the bMIC.

## MATERIAL AND METHODS

**Collection of *S. aureus* strains.** Thirty strains of methicillin-susceptible *S. aureus* were selected from a collection of isolates responsible for a first episode of well-documented PJI at the Lyon University Hospital, France, from 2001 to 2010. The collection of clinical data and clinical strains was approved by the French South-East ethics committee (reference number 2013-018). All the strains were characterized using the Alere StaphyType DNA microarray (StaphyType; Clondiag, Germany) (12) (table 1). The antibiotic susceptibility was tested using the Vitek-2 Gram-positive card (AST-P549, bioMérieux, France) and showed that all strains were susceptible for cloxacillin and glycopeptides (data not shown). The capacity of cloxacillin, vancomycin and teicoplanin to prevent biofilm formation was assessed using the Antibiofilmogram® method (11) and interpreted according to the MIC breakpoint fixed by the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2015 (EUCAST-CASFM) guidelines. We classified the strains as bMIC resistant (bMIC-R) if the bMIC was higher than the breakpoint MIC value and as bMIC susceptible (bMIC-S) if the bMIC was lower than the breakpoint MIC value.

**BioFilm Ring Test®.** The kinetic of biofilm formation was assessed using the BioFilm Ring Test® method adapted from *Chavant et al* (13). This technique is based on the visualization of the immobilization of magnetic microbeads embedded in biofilm. Briefly, *S. aureus* strains stored at -20°C were subcultured on Columbia sheep blood agar (COS, bioMérieux, France) at 37°C for 24h. A brain-heart infusion (BHI, bioMérieux, France) was then inoculated with 3 colonies and incubated at 37°C overnight. The bacterial suspension was standardized to  $OD_{600} = 1 \pm 0.05$  (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences, USA) and diluted 1:250 in sterile BHI to obtain a final concentration of approximately  $4.10^6$  UFC/mL. The bacterial suspension was supplemented with 1% magnetic beads (TONER 4, Biofilm Control, France) and 200 µL were deposited in duplicate for each timepoint (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 h – 37°C) in a microplate (BD Falcon 96 Flat Bottom Transparent, USA). After incubation, 100 µL of liquid contrast solution was added on the top of each well and the microplate was placed on a magnetic block for 1 min. During magnetization, if no biofilm was initiated, free magnetic beads were attracted on the center of the well, leading to the formation of a visible spot. Conversely, if a biofilm developed, beads were trapped and no or a weak spot was formed. The plate was scanned using the Biofilm Control plate reader and the intensity of the spot analyzed and

expressed as a biofilm formation index (BFI). Each observed BFI ( $BFI_o$ ) was normalized to a percentage of magnetic beads (Pmb) using control wells with ( $BFI_{ref}$ ) and without ( $BFI_{min}$ ) beads using the formula:  $Pmb = \frac{BFI_{ref} - BFI_o}{BFI_{ref} - BFI_{min}}$ . Each experiment was realized 3 times in duplicate.

**Crystal Violet assay.** Mature biofilm formation was evaluated using the crystal violet assay (14). The  $OD_{600}$  of overnight bacterial suspensions were adjusted to  $1 \pm 0.05$ , before a 1:100 dilution in sterile BHI + 1% glucose (D-(+)-glucose, Biosolve, France). 100  $\mu$ L were transferred in a microplate (24 h - 37°C), in quadruplicate. Negative control wells were prepared with BHI alone. After incubation, planktonic bacteria were removed with three washes in water. The biofilm was fixed in 100  $\mu$ L of 99% methanol (VWR International, France) for 20 min. Microplates were washed and bacteria stained with 100  $\mu$ L of 0.1% crystal violet (Merck, France) for 10 min. Excess stain was rinsed away, the dye bound to biofilm solubilized in 100  $\mu$ L of 33% acetic acid and the  $OD_{620}$  was read using a micro ELISA Auto Reader (Model 680, BioRad, USA). The control  $OD_{620}$  was subtracted from the  $OD_{620}$  of tested strain. Each experiment was realized 3 times in quadruplicate.

**Growth Rate.** Bacteria were grown in presence of the enzymes used to unveil the role of biofilm matrix components in early biofilm formation, to check for any effect on growth rate. Briefly, DNase (DN25, Sigma Aldrich, USA) and proteinase K (P2308, Sigma Aldrich, USA) were added (100 $\mu$ g/mL and 50 $\mu$ g/mL respectively) to a bacterial suspension standardized to  $4.10^6$  UFC/mL in BHI and microplates were filled with 200  $\mu$ L per well. Control wells were filled with BHI complemented with buffer alone. The growth rate was monitored every 15 minutes (orbital shaking and measure of the  $OD_{600}$ ) for 24 h at 37°C using a microplate reader (Infinite® 200 PRO device Tecan). The instantaneous growth rates ( $\mu$ ) and generation time ( $\theta$ ) were calculated on the basis of 4 consecutive OD measurement (1 h period) according to the formula  $X = X_0 e^{\mu t}$  and  $\theta = \ln 2 / \mu$ , where  $t$  is time (h),  $X$  is the biomass at  $t$  and  $X_0$  is the biomass at  $t = 0$  as previously described (15). For each well, the minimum calculated generation time was selected to estimate the maximal growth rate. The generation time was estimated as the mean of three experiments performed in duplicate.

**Determination of essential components of early biofilm formation.** The Biofilm Ring Test® method was adapted to quantify the attachment and initiation of biofilm formation in the presence of specific enzymes. Standardized bacterial suspensions containing 1% magnetic beads were supplemented with DNase (100  $\mu$ g/mL), proteinase K (50  $\mu$ g/mL) or buffer alone and incubated at 37°C in a 96-well microplate (200 $\mu$ L/well). Negative controls consisted of 200  $\mu$ L of sterile BHI containing magnetic beads and enzyme. The plate was revealed after 6 h of incubation, as described

above. The capacity of the strains to form biofilm in presence of enzymes was expressed using the relative difference (RD):  $RD = \frac{Pmb_{without\ enzyme} - Pmb_{with\ enzyme}}{Pmb_{without\ enzyme}} \times 100$ . RD = 0 indicates an equal biofilm formation with or without enzyme, i.e no implication of the targeted component in the initial steps of biofilm formation. Conversely, RD = 100 indicates an absence of biofilm in the presence of enzyme, i.e the targeted component is necessary for the initial steps of biofilm formation. Each experiment was realized 3 times in duplicate.

**Statistical analysis.** Descriptive statistics were used to estimate the frequencies of the study variables, which are described as the means and the standard deviations of the mean (S.E.M). Differences between CC groups were analyzed using Kruskal–Wallis test.

## RESULTS

### Clonal complex affiliation

Out of the 30 clinical strains of *S. aureus*, 24 belonged to one of the 4 major CCs, i.e CC5 (n=6), CC15 (n=5), CC30 (n=7) and CC45 (n=6). The remaining 6 were shared between CC8 (n=2), CC22 (n=1), CC50 (n=1), CC88 (n=1) and CC398 (n=1). Due to sample size, the correlation between CC and the biofilm phenotype was investigated only for the 4 major CCs.

### Kinetic of biofilm formation

The kinetic of early biofilm formation was evaluated using the BioFilm Ring Test<sup>®</sup>, whereas the mature biofilm formation was evaluated using the crystal violet assay. Although all the strains were able to produce biofilm, its formation was significantly slower for CC30 than for CC5, CC15 and CC45 at early time points (fig.1A,  $p < 0.05$  at 2 h, and  $p < 0.01$  at 3 h, 4 h and 5 h). Regarding mature biofilm formation, CC5 strains produced significantly less biofilm after 24 h than CC15 and CC45 strains (figure 1B,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively). The maturation appeared also to be CC-dependent, with CC45 producing significantly more biofilm than CC5, CC15 and CC30 at 24 h ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  respectively). CC15 produces more biofilm than CC5 and CC30 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$  respectively). Finally, CC5 and CC30 do not show any difference between each other. In summary, CC30 showed a slow biofilm formation phenotype with moderate mature biofilm production whereas CC5 revealed a phenotype of rapid biofilm formation with moderate mature biofilm production. CC15 and CC45 combined a rapid and high biofilm production.

---

## Biofilm composition

Since the susceptibility of a staphylococcal biofilm to enzymatic treatments depends on the composition of the biofilm, DNase and proteinase K have been proposed to globally investigate the part of eDNA and proteins, respectively, in the organization/structure of the biofilm matrix (16). This has been investigated by analyzing the relative difference (RD) of beads immobilization in presence or not of the enzymes (DNase I / proteinase K vs buffer). Of note, the generation time was not significantly affected by the treatment with proteinase K or DNase I (respectively,  $\Theta = 25.5 \pm 1.1$  min and  $\Theta = 24.5 \pm 1.1$  min vs  $27.1 \pm 1.3$  min without enzyme).

The DNase I treatment highlights a strong and identical implication of eDNA in the biofilm formation for CC5, CC15 and CC30 strains (figure 2A,  $RD_{DNase} = 64.5 \pm 5.6$ ,  $69.1 \pm 4.0$  and  $78.0 \pm 2.8$  respectively, NS). On the other hand, CC45 strains showed a significantly lower  $RD_{DNase}$  ( $43.1 \pm 3.8$ ,  $p < 0.05$ ) supporting a lower production of eDNA. Interestingly, if the  $RD_{pk}$  was lower than the  $RD_{DNase}$  for CC5 and CC15 and CC30 strains (figure 2B,  $RD_{pk} = 19.9 \pm 3.1$ ,  $24.8 \pm 4.3$ ,  $39.3 \pm 6.6$ ), CC45 displayed a reverse trend ( $RD_{pk} = 54.0 \pm 5.1$ ). These results suggest that the early biofilm formation depends more on eDNA than proteins production for CC5, CC15 and CC30, when the proteins production is more important for CC45.

## bMIC distribution of the main CCs

Finally, we compared the distribution of bMIC-S and bMIC-R strains according to the CCs affiliation. CC30 showed a percentage of susceptible strains higher than the overall mean for cloxacillin, teicoplanin and vancomycin (figure 3A, 3B, 3C, 86% Vs. 40%, 100% Vs. 67% and 86% Vs. 60% respectively). The other CCs showed a bMIC profile distribution with a percentage of susceptible strain similar to the overall mean.

## DISCUSSION

The presence of biofilm in PJIs is associated with treatment failure and persistence of the infection (17). In this study, we found that biofilm formation of clinical strains in terms of kinetic, composition and bMIC is correlated to the CC affiliation.

Indeed, CC30 strains demonstrate a “slow” phenotype regarding early biofilm formation associated with moderate mature biofilm production. By contrast, other complex clonal strains (CC5, CC15 and CC45) have shown a “fast” phenotype of early biofilm formation, with high (CC15 and CC45) or

moderate (CC5) mature biofilm production. This specific behavior has already been observed by *Naicker et al* who reported that CC5 and CC8 strains were high biofilm producer (18). Similar results on strong biofilm formation capacity were reported for CC8 strains (19,20). In our study, only two strains belonging to CC8 were found. This is quite surprising because CC8 was reported as one of the most prevalent CCs in PJI in Western Europe (21). However, the two strains included here were moderate biofilm producer (data not shown).

Our results on CC30 are in accordance with *Cortes et al.* reporting a reduced biofilm production by this CC (20). Furthermore, *Fowler et al* reported that CC5 and CC30 exhibited a specific and significant trend toward more severe infections with frequent hematogenous complications (22). Interestingly, we showed that these two CCs produced significantly less mature biofilm than other, suggesting rather acute-adapted phenotype.

In order to correlate the strain phenotype with the biofilm ability, *Bardiau et al* have studied the association between biofilm formation and capsular profile as well as *agr*-typing in *S. aureus* collected from bovine mastitis. They reported that the majority of high biofilm producers belong to the *agr* group I, corresponding to CC45 in our study (23). However, in a further study, they reported that the majority of high biofilm producers belong to a group of “*cap5-agrI*” (24). Four strains were *cap5-agrI* in our study, belonging to CC8 (n=2), CC22 and CC398, without specific high biofilm forming profiles (data not shown). Finally, *Cafiso et al* reported that *agr* II strains (corresponding to CC5 and CC15 in our study) produce large amounts of biofilm and *agr* III strains (corresponding to CC30) are medium biofilm producers which is in accordance with our results (25).

However, the comparison between studies remains difficult because of the variation in experimental conditions for the biofilm formation assay. Indeed, *Croes et al* reported that the glucose concentration highly influences biofilm formation *in vitro* (19). The higher the glucose concentration was, the more the strain qualified as a strong biofilm producer. Moreover, the origin of strains was variable among studies, ranging from human medical settings to bovine mastitis infections. Of note, the majority of studies were monocentric and thus represented only the local epidemiology.

In this study, we used the BioFilm Ring Test® method to study the kinetics of biofilm formation. This method has the advantage to quantify early biofilm formation without washing steps (13). It can be used to study preventive treatment of bacteria adhesion (26,27). Here, we used this approach to study the role of eDNA and proteins in early biofilm formation. DNase showed high ability to prevent biofilm formation in most of strains. However, biofilm formation of strains belonging to CC45 was

less affected than other strains, suggesting a mechanism of adhesion less dependent to eDNA. A proteinase K treatment reduced the biofilm formation less than a DNase one, suggesting a lesser role for proteins in early biofilm formation. Interestingly, biofilm formation of CC45 strains was more inhibited than in other strains which is consistent with a pivotal role of proteins in the biofilm formation for this CC. Taking together, these results suggest that the production of specific components required for early biofilm formation is correlated with the clonal complex affiliation. Moreover, our study supports that treatments targeting eDNA could be effective at preventing biofilm formation of clinical *S. aureus* strains responsible of PJIs. Finally, adhesion mechanisms linked to PIA were not explored in this study. It will be of interest to investigate this approach by using enzymes able to degrade polysaccharides such as Dispersin B (28).

Finally, we found that the percentage of strains classified as bMIC-S was higher for the CC30 affiliated strains than other CCs. This specific susceptible profile could be explained by a slow phenotype regarding early biofilm formation. In this study, we only explored the biofilm formation profile of 30 clinical isolates. The extensive investigation of larger collections of *S. aureus* strains responsible for PJIs and the correlation with data from genome-wide association studies is mandatory to identify genetic regions involved in the various biofilm formation phenotypes.

## **CONCLUSION**

In conclusion, we found that the biofilm formation phenotype is correlated with genetic lineage in our collection of *S. aureus* responsible of PJIs. CC30 has shown a slower early biofilm formation phenotype than other CCs associated with a higher susceptible Antibiofilmogram® profile for cloxacillin, teicoplanin and vancomycin. The Biofilm Ring Test® assay combined with enzymes can be used to explore the implication of targeted component in the initial step of biofilm formation.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by the 15th Fonds Unique Interministériel (FUI). We acknowledge M. Rabilloud and C. Langlois from Service de Biostatistique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France (CNRS UMR 5558) for statistical analysis.

## **COMPETING FINANCIAL INTEREST**

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

1. Rao N, Ziran BH, Lipsky BA. Treating osteomyelitis: antibiotics and surgery. *Plast Reconstr Surg.* janv 2011;127 Suppl 1:177S-187S.
2. Darley ESR, MacGowan AP. Antibiotic treatment of Gram-positive bone and joint infections. *J Antimicrob Chemother.* 1 juin 2004;53(6):928-35.
3. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer A-I, Gaborit C, Rosset P, et al. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect.* sept 2012;82(1):40-8.
4. Lipsky BA, Weigelt JA, Gupta V, Killian A, Peng MM. Skin, soft tissue, bone, and joint infections in hospitalized patients: epidemiology and microbiological, clinical, and economic outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* nov 2007;28(11):1290-8.
5. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* juill 2015;28(3):603-61.
6. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1 janv 2008;52(1):13-22.
7. Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop.* avr 2015;86(2):147-58.
8. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* févr 2004;2(2):95-108.
9. Zapotoczna M, O'Neill E, O'Gara JP. Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS Pathog.* juill 2016;12(7):e1005671.
10. Stewart PS. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr* [Internet]. juin 2015 [cité 13 mars 2017];3(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4507308/>
11. Tasse J, Croisier D, Badel-Berchoux S, Chavanet P, Bernardi T, Provot C, et al. Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®. *Pathog Dis.* août 2016;74(6).
12. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1 juill 2008;53(2):237-51.
13. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods.* mars 2007;68(3):605-12.
14. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* avr 2000;40(2):175-9.
15. Laurent F, Lelièvre H, Cornu M, Vandenesch F, Carret G, Etienne J, et al. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *J Antimicrob Chemother.* mars 2001;47(3):277-83.
16. Kaplan JB. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs.* sept 2009;32(9):545-54.
17. Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop.* août 2005;(437):7-11.
18. Naicker PR, Karayem K, Hoek KGP, Harvey J, Wasserman E. Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage. *Microb Pathog.* janv 2016;90:41-9.

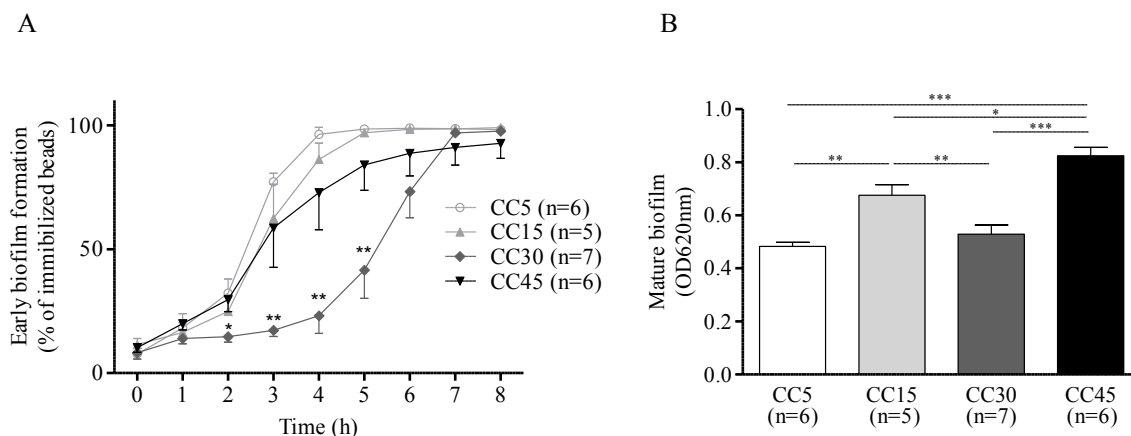
19. Croes S, Deurenberg RH, Boumans M-LL, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. BMC Microbiol. 28 oct 2009;9:229.
20. Côrtes MF, Beltrame CO, Ramundo MS, Ferreira FA, Figueiredo AMS. The influence of different factors including fnbA and mecA expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds. Int J Med Microbiol IJMM. janv 2015;305(1):140-7.
21. Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Molecular fingerprinting of Staphylococcus aureus from bone and joint infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1 avr 2010;29(4):457-63.
22. Fowler VG, Nelson CL, McIntyre LM, Kreiswirth BN, Monk A, Archer GL, et al. Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in Staphylococcus aureus infection. J Infect Dis. 1 sept 2007;196(5):738-47.
23. Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG, Ote I. Associations between properties linked with persistence in a collection of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. Vet Microbiol. 21 févr 2014;169(1-2):74-9.
24. Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graber H, Moroni P, Taminiau B, et al. Existence of two groups of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. Vet Microbiol. 15 mars 2016;185:1-6.
25. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, Nicoletti G, et al. agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing Staphylococcus aureus. FEMS Immunol Med Microbiol. oct 2007;51(1):220-7.
26. Elchinger P-H, Delattre C, Faure S, Roy O, Badel S, Bernardi T, et al. Effect of proteases against biofilms of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Lett Appl Microbiol. 1 nov 2014;59(5):507-13.
27. Iyamba JML, Seil M, Devleeschouwer M, Kikuni NBT, Dehaye JP. Study of the formation of a biofilm by clinical strains of Staphylococcus aureus. Biofouling. 1 sept 2011;27(8):811-21.
28. Kaplan JB, Rangunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob Agents Chemother. juill 2004;48(7):2633-6.



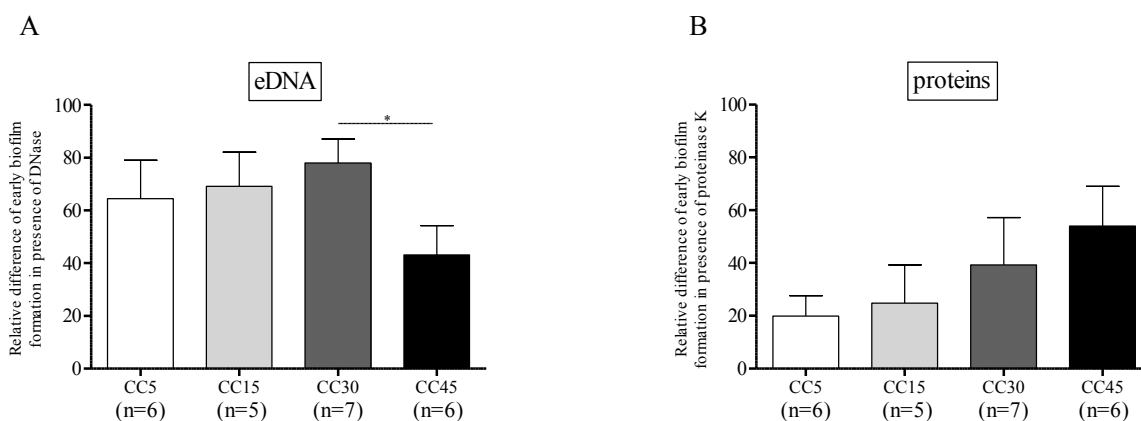
## FIGURES

	CC					total
	5	15	30	45	other	
No. of isolates	6	5	7	6	6	30
<i>agr</i> type	II	II	III	I	I (67%), III (17%) IV (17%)	I (33%), II (37%) III (27%), IV (3%)
<i>cap</i> operon	5	8	8	8	5 (67%), 8 (33%)	5 (33%), 8 (67%)
<b>Biofilm formation</b>						
<i>ica</i> operon	+	+	+	+	+	+
<i>bap</i>	-	-	-	-	-	-
<b>Colonization factors</b>						
<i>bbp</i>	+	+	+	+ (83%) - (17%)	+ (50%), - (50%)	+ (87%), - (13%)
<i>clfA</i>	+	+	+	+	+	+
<i>clfB</i>	+	+	+ (86%) - (14%)	+	+ (50%), - (50%)	+ (87%), - (13%)
<i>can</i>	-	-	+ (43%) - (57%)	+	+ (50%), - (50%)	+ (40%), - (60%)
<i>ebpS</i>	+	+	+	+	+	+
<i>fib</i>	+	+	+	+	+	+
<i>fnbA</i>	+	+	+	+	+ (50%), - (50%)	+ (90%), - (10%)
<i>fnbB</i>	+	+	+ (29%) - (71%)	+	+	+ (83%), - (17%)
<i>sak</i>	+	-	+	+	+ (33%), - (67%)	+ (70%), - (30%)
<i>sasG</i>	+	+	-	-	+ (67%), - (33%)	+ (50%), - (50%)
<i>sdrC</i>	+	+ (80%) - (20%)	+ (14%) - (86%)	+	+ (83%), - (17%)	+ (73%), - (27%)
<i>sdrD</i>	+ (83%) - (17%)	+ (80%) - (20%)	+ (71%) - (29%)	+	+ (50%), - (50%)	+ (77%), - (23%)
<i>vwb</i>	+	+	+	-	+	+ (77%), - (23%)

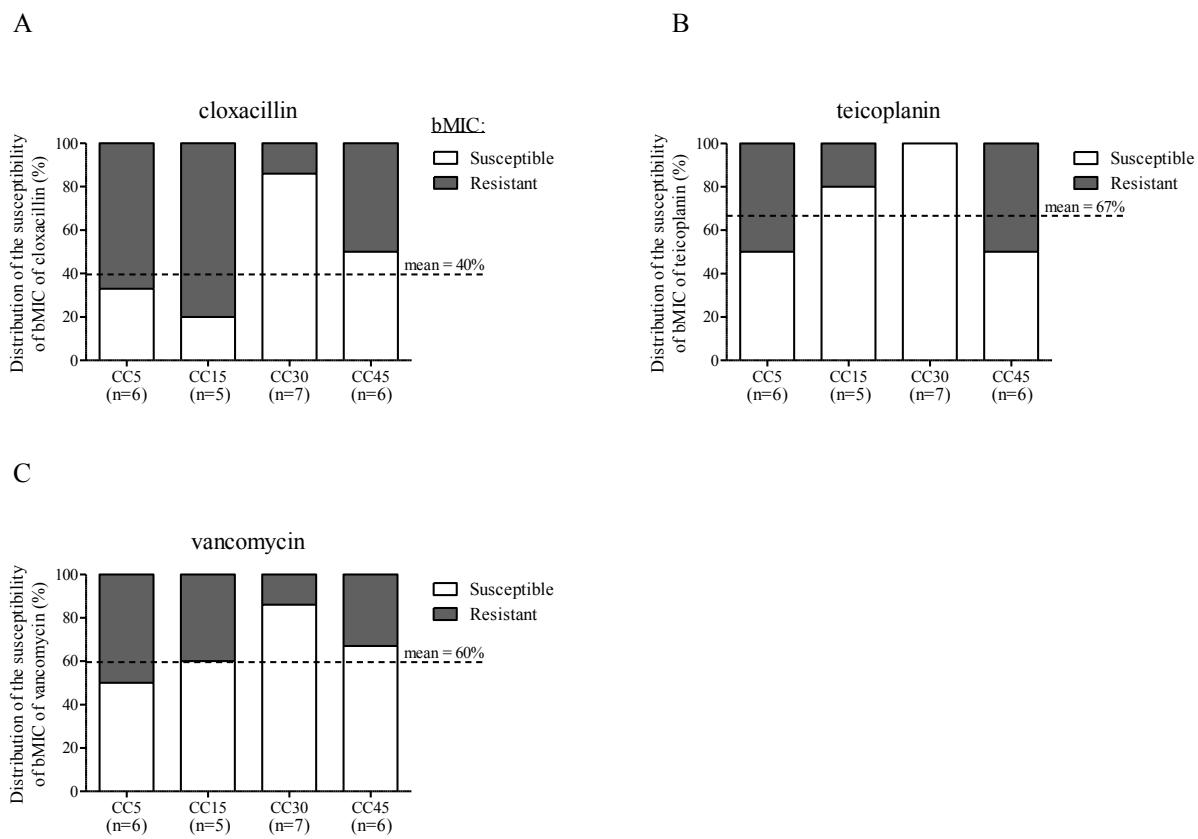
**Table 1.** Virulence factor genes contents of all characterized strains grouped by clonal complex. CC: Clonal Complex; genes coding for: *agr*, accessory gene regulator; *cap*, capsular polysaccharide; *ica*, intercellular adhesion protein A; *bap*, biofilm-associated protein; *bbp*, bone sialoprotein-binding protein; *clfA*, clumping factor ClfA; *clfB*, clumping factor ClfB; *cna*, collagen-binding protein; *ebpS*, cell surface elastin-binding protein; *fib*, fibrinogen-binding protein; *fnbA*, fibronectin binding protein A; *fnbB*, fibronectin-binding protein B; *sak*, staphylokinase; *sasG*, *Staphylococcus aureus* surface protein G; *sdrC*, serine-aspartate repeat protein C; *sdrD*, serine-aspartate repeat protein D; *vwb*, secreted von Willebrand factor-binding protein precursor.



**Figure 1:** Comparison of kinetic of biofilm formation of the main *S. aureus* clonal complex. (A) Kinetics of early biofilm formation using the BioFilm Ring test® assay. Data are represented as the means and S.E.M. of duplicate from three assays. (B) Mature biofilm formation using Crystal Violet assay. Data are represented as the means and S.E.M. of quadruplicate from three assays.



**Figure 2:** Comparison of the role of specific biofilm components for early biofilm formation of the main *S. aureus* clonal complex. Results are expressed as the relative difference of early biofilm formation in presence of DNase (A) or proteinase K (B) after 6 h of incubation using the BioFilm Ring Test® technology. Data are represented as the mean and S.E.M of duplicate from three assays.



**Figure 3:** Distribution of bMIC profile of cloxacillin (A), teicoplanin (B) and vancomycin (C) of the main *S. aureus* clonal complex. The overall mean percentage of susceptible profile of all strains (n = 30) was represented by dotted lines.

### 1.3 Troisième Publication: A steam-based method to preserve structural integrity of biofilm

Tasse J, Cara A, Saglio M, Villet R, Laurent F

*Article en cours de soumission dans Nature Methods - 2017*

Le support le plus utilisé pour étudier la formation d'un biofilm est sans conteste la **microplaque**. En effet, les méthodes en microplaques sont généralement simples à mettre en place, peu onéreuses, et permettent de tester simultanément de nombreuses conditions et/ou souches. Elles sont parfaitement adaptées à un usage haut débit et sont donc présentes aussi bien dans les laboratoires de recherche publique que dans les laboratoires des industriels. Elles permettent aussi bien l'identification de gènes impliqués dans la formation d'un biofilm que le criblage de molécules possédant des propriétés anti-biofilms.

Les biofilms formés peuvent être quantifiés par plusieurs approches :

- une coloration de la biomasse totale par un colorant (généralement le Cristal Violet) suivi d'une mesure de Densité Optique (DO).
- une détermination de la viabilité par dénombrement bactérien sur gélose ou via la mesure de l'activité métabolique par l'utilisation de résazurine (colorant bleu faiblement fluorescent pouvant être réduit en résorufine, un colorant rose fortement fluorescent)
- l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques des composants de la matrice extracellulaire

L'ensemble de ces méthodes nécessitent cependant plusieurs étapes de rinçage afin d'éliminer les bactéries planctoniques et l'excès de colorant selon le protocole utilisé. Les rinçages sont généralement effectués à la pipette, ce qui provoque, même lorsque cette opération est réalisée délicatement, le décrochage aléatoire de quantités variables de biofilms, altérant la **reproductibilité** d'une expérience à l'autre, mais également d'un expérimentateur à l'autre, et par conséquent d'un laboratoire à l'autre.

Une autre limite de ces méthodes est qu'il n'est pas possible de dénombrer les bactéries viables après coloration car les colorants sont généralement toxiques pour la bactérie.

Dans ce dernier travail présenté dans le cadre de cette thèse, nous avons mis au point une nouvelle méthode de rinçage basée sur un phénomène naturelle : la condensation. En effet, nous avons démontré qu'il était possible de rincer les biofilms formés dans les puits d'une microplaque en la

positionnant à l'envers au-dessus d'une source de **vapeur d'eau**. Un système de refroidissement est positionné sur la microplaque afin de protéger les bactéries de la chaleur et de favoriser la condensation. Nous avons démontré que l'intégralité d'une microplaque pouvait être rincée de façon homogène en 35 minutes. De plus, nous avons observé que cette nouvelle méthode est beaucoup moins agressive que la méthode classique à la pipette, et génère des résultats plus reproductibles.

Dans cette étude, nous avons également testé la possibilité de quantifier le biofilm mature en le mettant simplement en suspension dans du PBS et en effectuant une mesure de DO à 490 nm. Cette approche déjà décrite n'avait jamais été comparée aux protocoles de colorations classiques, et permet de réaliser un dénombrement des bactéries viables dans le même puits après mesure de la turbidité. Les essais ont été réalisés sur trois souches de références et ont montré des résultats similaires à ceux obtenus avec une coloration au cristal violet.

En combinant ces deux approches innovantes (rinçage à la vapeur et mesure de la turbidité en PBS) et en les comparant avec le protocole classiquement effectué (rinçage pipette et coloration au cristal violet), nous avons pu montrer que les résultats générés étaient plus reproductibles d'une expérience à l'autre, mais également d'un technicien à l'autre.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence deux processus améliorant les méthodes de mesure de biofilm en microplaques. Simples d'utilisation et peu coûteuses, ces approches requièrent moins de temps techniques que les méthodes utilisées jusque-là et permettent de générer des résultats reproductibles. De plus, le rinçage par la vapeur est moins agressif, et semble préserver l'intégrité structurelle du biofilm.

Une demande de brevet a été déposée pour cette méthode.

# A steam-based method to preserve structural integrity of biofilm

Jason Tasse<sup>1,2,3</sup>, Andrea Cara<sup>1,2,3</sup>, Maude Saglio<sup>1,2,3</sup>, Régis Villet<sup>1,2,3</sup>, Frédéric Laurent<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Pathogénie des Staphylocoques

<sup>2</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

<sup>3</sup>Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

**Corresponding author:** [tasse.jason@gmail.com](mailto:tasse.jason@gmail.com); phone: +33 472 003 770

## ABSTRACT

Management of biofilm-associated infections represents a worldwide challenge, which requires efficient and reliable models to investigate biofilm behavior. We present a simple and robust method adapted from the microplate technique which allows the study of fully preserved biofilm and quantifying both biofilm matrix and viable bacteria from one single well. The proof of concept was performed on *Staphylococci* but the method is suitable for any biofilm-producing microorganisms.

---

**MAIN TEXT**

Biofilm is defined as a community of microorganisms attached to a solid surface and embedded in a matrix facilitating the survival of bacteria in hostile environments. Since its first description in 1978 by Costerton *et al.*,<sup>1</sup> multiple methods have been proposed to investigate biofilm using *in vitro* models, ranging in complexity from bacterial colony growing on specific media<sup>2</sup> to complex continuous culture fermentation systems.<sup>3</sup> One of the most used biofilm model for high-throughput analyses is based on 96-well microtiter plates.<sup>4</sup> This historical device is adaptable to most bacterial or fungal species grown in laboratories and remains widely used for identification of genes essential for surface-attached biomass production in liquid media as well as screening for potential anti-biofilm agents.<sup>5</sup>

In the microplate-based method, cells are grown for a desired period of time before being washed, in order to remove planktonic bacteria. Biofilm can then be assessed by different approaches including staining with a dye (Crystal Violet – CV, Safranin Red or Congo Red) for total biomass quantification,<sup>6</sup> growth ability (colony forming units) for viable cell enumeration,<sup>7</sup> or specific fluorescent probes (FITC, SYPRO Ruby, Calcofluor White) for the quantification of extracellular polymeric components.<sup>8</sup> An alternatively method has been proposed in which biofilm is resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and quantified optically<sup>9,10</sup> but, to our knowledge, no comparison with the classical staining protocol has been performed.

These methods have several limitations. The main one is the lack of reproducibility of the results due to the aggressiveness of washing steps using pipetting,<sup>11</sup> which is likely to be in relation to random detachment of large amounts of biofilm. Furthermore, the native structure/spatial organization of the biofilm is also possibly modified leading to skew measurements. Once the biofilm is stained, it is also no longer possible to evaluate bacterial viability. Moreover, dyes are often toxic, mutagenic, or irritant for the experimenter, environmentally hazardous, and require protective equipment.<sup>12</sup>

In this study, we propose a new method in which steam is used as soft washing method, and biofilm matrix and bacteria can be concomitantly quantified without staining.

The new washing method is based on water vapor condensation. To remove planktonic bacteria without altering the biofilm integrity, the support (microplate), in which biofilm was formed, needs to be placed upside down above a source of steam, the bottom being in contact with a cooling system (Fig. 1a). Water droplets form and accumulate on the biofilm surface before falling back along

with the non-adherent bacteria (Fig. 1b). This soft washing process was tested on a 24 h-old biofilm of a *S. aureus* strain (SH1000) formed in a 96-well plate. Viable cell count was measured every 10 min over 1 h to determine the time needed to correctly remove planktonic bacteria (Fig. 1c). Results indicate that a threshold was reached after 35 min, corresponding to the minimal time required to ensure maximal biofilm wash.

The homogeneity of the steam washing between wells of the same microplate was investigated. For this, the mean number of viable bacteria among wells of the same row (and then the same column) were compared using one way analysis of variance (ANOVA); the null hypothesis was that the biofilm formed was identical between rows (and between columns). Results showed that the biofilm cell count was similar in both rows ( $p=0.1452$ , Fig. 1d) and columns ( $p=0.1183$ , supplementary Fig. 1a).

The steam washing method therefore appears adapted to the removal of planktonic bacteria. In this context, we tested the possibility to combine the steam washing method with the CV assay. First, biofilms of three reference strains described as biofilm producer (*S. aureus* SH1000) or non-biofilm producers (*S. epidermidis* ATCC 12228 and *S. carnosus* TM300) were washed using either the classical pipette method or the steam method before being stained using CV, following which excess stain was removed by steam washing or pipette. Staining ( $OD_{620}$ ) for all strains were higher using steam washing (Fig. 2a) which is likely to be due to the non-aggressive washing process. As control wells without bacteria were prepared and ODs were subtracted from the values for strain samples, these data suggest that ATCC 12228 and TM300 have a residual (even low) ability to adhere and/or to form weak biofilm. Furthermore, the standard deviation for the SH1000 strain was interestingly lower using steam washing (0.234 vs. 0.441) which indicates a stronger reproducibility of this technique.

We then hypothesized that biofilm formation could be measured without a staining step, by measuring the turbidity of biofilm resuspended in PBS. An absorbance spectrum was determined using steam-washed biofilms of reference strains (SH1000, ATCC 12228 and TM300) and found that OD measured at a wavelength from 400 to 600 nm discriminated between biofilm producers and non-biofilm producers (data not shown). Using PBS turbidity ( $OD_{490}$ ), we were able to discriminate producer strains from non-producer strains in way similar to that when CV staining and  $OD_{620}$  was used (Fig. 2a). Interestingly, using this non-bactericidal protocol, viable cell count can be performed on the same well by plating the suspension. In agreement with data obtained with CV staining and  $OD_{620}$ , results showed that counts using steam washing were higher than using pipette washing for all strains (Fig. 2b). Again, the standard deviation for the SH1000 strain was lower using steam washing,



indicating a better reproducibility (0.100 vs. 0.165). In addition, biofilm formation by clinical *S. aureus* strains were in agreement with the results obtained with the 3 reference strains (Supplementary Fig. 2a, b), and steam washing was found to be homogenous based on PBS turbidity ( $OD_{490}$ ), confirming data obtained using biofilm cell count (data not shown).

To confirm that bacteria were not killed by the steam washing step, biofilms were examined by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a Live/Dead staining. Qualitative image analysis showed that most of the cells were alive (green) irrespective of the washing method (Fig. 2c). Moreover, the biomass, mean thickness and maximum thickness calculated using Comstat2 software were higher for steam washing than pipette washing (Supplementary Table 1). This corroborated the previous non-quantitative observations of biofilm formed in the 96-well plates (Fig. 2d).

Measurement (CV staining using pipette washing and PBS turbidity using steam washing) of three technicians was investigated. The standard deviations were lower using steam washing and turbidity measurement than when using pipette washing and CV staining for all three technicians (0.026, 0.043, and 0.054 vs. 0.389, 0.343, and 0.363; Fig. 2e) indicating that the increase reproducibility of PBS turbidity using steam wash is conserved between technician.

In conclusion, we propose two easily adaptable processes to improve biofilm investigation. First, a new method to efficiently and carefully wash biofilm with steam for microtiter plate assays. Second, the quantification of biofilm using PBS turbidity instead of staining with a dye. These processes can be easily standardized, are time and cost saving, require less technical time and reduced manipulations leading to highly reproducible data. As the biofilm integrity is preserved, this new method is going to make possible the investigation of thin, early and/or fragile biofilms (as described here for strains ATCC 12228 and TM300), the exploration of the roles of intact extracellular matrix,<sup>13</sup> the high-throughput screening of anti-biofilm compounds, or the easy achievement of antimicrobial susceptibility assays on biofilm.<sup>7</sup>

## ONLINE METHODS

**Bacterial strains.** *S. aureus* strain SH1000 (biofilm producer)<sup>14</sup>, *S. epidermidis* strain ATCC 12228 (non-biofilm producer)<sup>15</sup>, *S. carnosus* strain TM300 (non-biofilm producer)<sup>16</sup> and 5 clinical *S. aureus* strains responsible of prosthetic joint infections were used in this study.

**Biofilm experimentation.** All strains were first subcultured on Colombia blood agar plates (bioMérieux) and incubated overnight at 37°C. Brain Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson) was

inoculated with 3 colonies and incubated 24 h at 37°C. Inoculum was then standardized to  $OD_{600} = 1 \pm 0.05$  (Amersham Biosciences) and diluted in sterile BHI plus 1% glucose (Biosolve) to obtain a final suspension of  $1.5 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. The latter was added to 200 µL per well into a 96-well polystyrene microplate (Greiner bio-one) and incubated 24 h at 37°C in a humid chamber. Negative control wells were prepared with medium alone. After incubation, plates were first inverted to remove growth medium. For classical washing, 200 µL of PBS 1X (Thermo Fisher Scientific, Gibco) were carefully added to the wells using a pipette, and then removed by inversion of the plate. This step was repeated twice. For steam washing, microplates were placed above a steam generating system in contact with a cooling device. The process was semi-covered to enhance condensation (Fig. 1a,b). Microplates were then recovered and tapped on absorbent paper to remove excess liquid accumulated by condensation. To evaluate biofilm formation, two approaches were used. For crystal violet staining, 150 µL of dye were added per well and incubated at room temperature for 5 min. Excess stain was washed using pipette or steam method as previously described (see above). Plates were air dried and the remaining dye was then resolubilized with 200 µL of 33% (v/v) glacial acetic acid per well. Staining ( $OD_{600}$ ) was measured by using a micro ELISA Auto Reader, Model 680 (BioRad, USA). For PBS turbidity, biofilm was resuspended in 200 µL of PBS 1X and homogenized with a tip. The microplate was put in an ultrasonic bath for 10 min (40 Hz), in order to detach trapped bacteria and to remove clusters and the turbidity ( $OD_{490}$ ) was then measured. The control OD (wells with medium alone) was deduced from the values for strain samples for all condition. Bacterial count was assessed on the same wells that PBS turbidity biofilm evaluation, by plating serial dilutions onto Trypcase Soy agar (TSA; bioMérieux) plates and incubation for 24 h at 37°C. Each experiment was performed at least three times in quadruplicate for each strain.

**Kinetics of steam washing.** To determine the time required to remove planktonic bacteria, the kinetics of steam washing was investigated using SH1000 strain. A 24-h old biofilm was prepared in seven microplates as previously described (see above) and then washed with steam for 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min. The microplate corresponding to 0 min was not washed. Biofilm were resuspended in 200 µL of PBS 1X and sonicated for 10 min (40 Hz). Bacterial count of 3 wells for each condition was measured by plating serial dilutions onto TSA plates incubated 24 h at 37°C. The experiment was performed three times.

**Equivalent biofilm formation assay.** To assess whether, under the experimental conditions used, there was asymmetry in biofilm formation depending on the position of the wells of the plate, a test for equivalent biofilm was done on SH1000 strain. A 24-h old biofilm (formed in each of the 96-well

microplate) was washed with steam. After resuspension and sonication of biofilm in PBS 1X, colony counting of each well was performed by plating serial dilutions, grouped by row or column, and compared using one-way ANOVA. If  $p \leq 0.05$ , the null hypothesis that biofilm cell counts was equivalent in each row or column was rejected. Conversely,  $p > 0.05$  then biofilm cell density was similar between rows or columns. The experiment was performed three times.

**Confocal laser scanning microscopy.** To evaluate biofilm structure and to confirm that bacteria were not killed by steam washing, confocal laser scanning microscopy (CLSM) was performed on a 24h-old biofilm of SH1000. Briefly, biofilm was formed on 8-well uncoated microslides (iBidi) as previously described (see above) and washed with either steam or pipette. Biofilm were fluorescently stained with Syto9 and PI from the Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes) following the manufacturer's instruction. Biofilms were incubated 30 min at room temperature in the dark before being rinsed with steam or by pipette. Images were acquired in an ZEISS LSM800, Full GaAsP detectors (Leica Microsystems) CLSM. Biofilms were observed using a 20 x dry lens (Plan-Apochromat 20x/0.8 M27, Leica Microsystems). For both conditions, images were acquired at 2524 x 2524 resolution in at least 5 different regions of each surface analyzed. 3D reconstructions were performed using Imaris (version 8.0) software (bitplane), and biofilm quantification was performed using Comstat2 (University of Denmark).<sup>16-17</sup>

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by the 15th Fonds Unique Interministériel (FUI). We acknowledge S. Gris for technical drawing, E. Chatre and C. Chamot from the PLATIM, Microscopy facility of SFR Biosciences (UMS3444/US8) for perfect technical assistance, and Philip Robinson for proof-reading.

## **AUTHOR CONTRIBUTION**

J.T., M.S., A.C. performed experiments; J.T., F.L., R.V. wrote the manuscript; F.L., R.V. supervised the project.

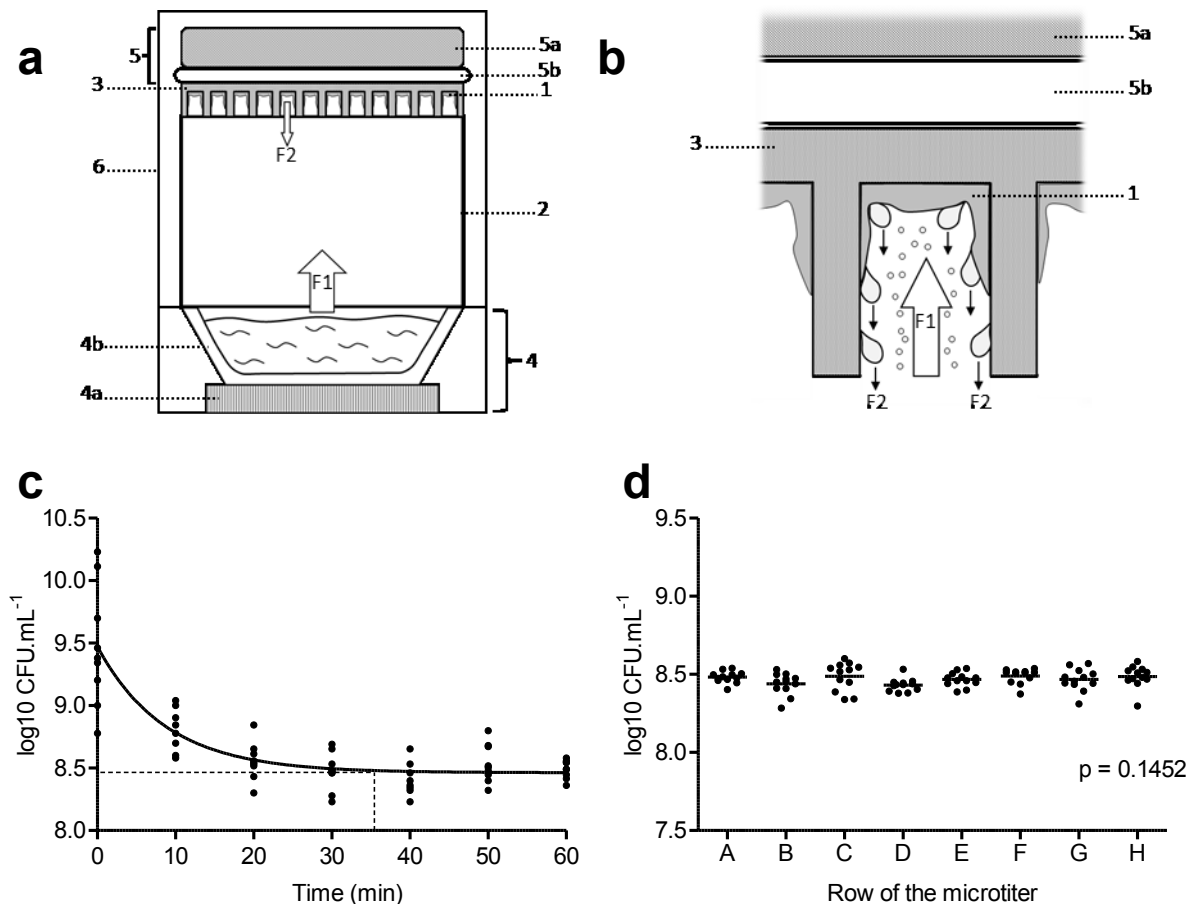
## **COMPETING FINANCIAL INTEREST**

The authors declare no competing financial interests.

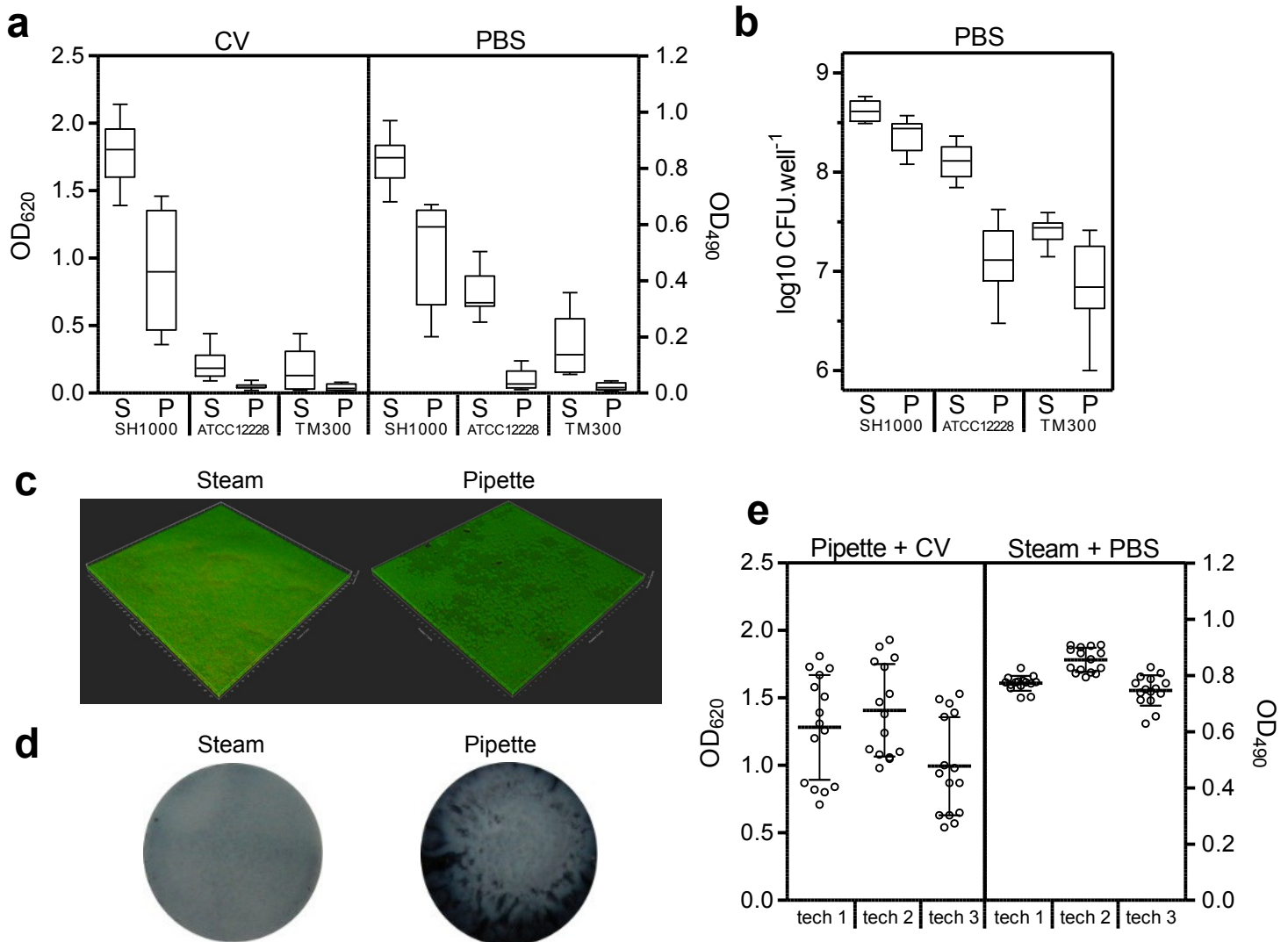
## REFERENCES

1. Costerton, J.W., Geesey, G.G. & Cheng, K.J. *Sci. Am.* 238, 86–95 (1978).
2. Freeman, D.J., Falkiner, F.R. & Keane, C.T. *J. Clin. Pathol.* 42, 872–874 (1989).
3. Donlan, R.M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4980–4988 (2004).
4. Christensen, G.D. et al. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996–1006 (1985).
5. Grossman, T.H., O'Brien, W., Kerstein, K.O. & Sutcliffe, J.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2446–2449 (2015).
6. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. & Švabić-Vlahović, M. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179 (2000).
7. Harrison, J.J. et al. *Nat. Protoc.* 5, 1236–1254 (2010).
8. Chen, M.-Y., Lee, D.-J., Tay, J.-H. & Show, K.-Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 467–474 (2007).
9. Foulston, L., Elsholz, A.K.W., DeFrancesco, A.S. & Losick, R. *mBio* 5, (2014).
10. Freitas, A.I., Vasconcelos, C., Vilanova, M. & Cerca, N. *J. Basic Microbiol.* 54, 750–757 (2014).
11. Azeredo, J. et al. *Crit. Rev. Microbiol.* 1–39 (2016).
12. Couper, J.R., Penney, W.R. & Fair, J.R. (Gulf Professional Publishing: 2009).
13. Dragoš, A. & Kovács, Á.T. *Trends Microbiol.* 0, (2017).
14. Horsburgh, M.J. et al. *J. Bacteriol.* 184, 5457–5467 (2002).
15. Zhang, Y.-Q. et al. *Mol. Microbiol.* 49, 1577–1593 (2003).
16. Heydorn, A. et al. *Microbiol. Read. Engl.* 146 ( Pt 10), 2395–2407 (2000).
18. at <<http://www.comstat.dk/>>

## FIGURES



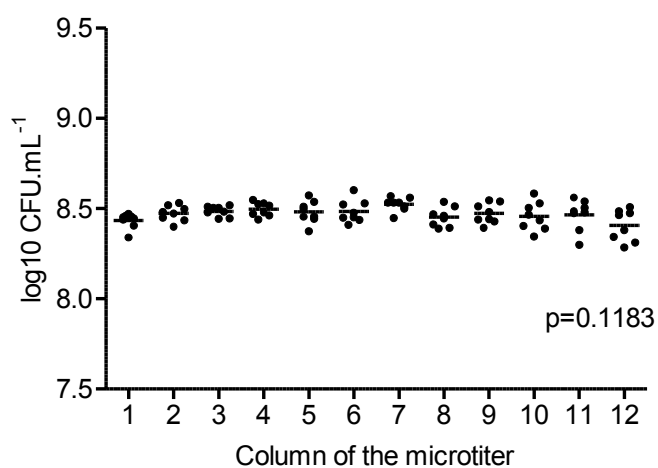
**Figure 1.** Steam washing process design. (a) Cross sectional view of steam washing system. After 24-hour formation of biofilm in the microplate, the liquid media is eliminated by reversing and the microplate is hung upside down in the system. The wash system of biofilm (1) is composed of a holding device (2) configured to hold a microplate (3). A steam generating system (4), composed of a heating unit (4a) and a reservoir (4b) create a steam flow (F1) leading to the formation of droplets (F2) by condensation that removes non-adherent bacteria and media. To enhance condensation and protect bacteria from heat, a cooling system (5), composed of a cooling device (5a) and a thermal transmission device (5b) is in contact with the microplate. A semi-closed cover (6) enhances condensation. (b) Zoom view on a well of the microplate in the wash system. (c) Steam washing kinetic (based on colony counting) of a 24h-old biofilm formed by *S. aureus* strain (SH1000). Data represent three experiments in triplicate. (d) Variability from well to well of a 24 h-old biofilm formed by *S. aureus* strain SH1000 washed using steam within a 96-wells microplate (based on colony counting). Each point represents the mean of 3 experiments. Results were grouped by row. Statistically significant differences determined by one-way ANOVA ( $p = 0.1452$  mean biofilm should be similar between rows)



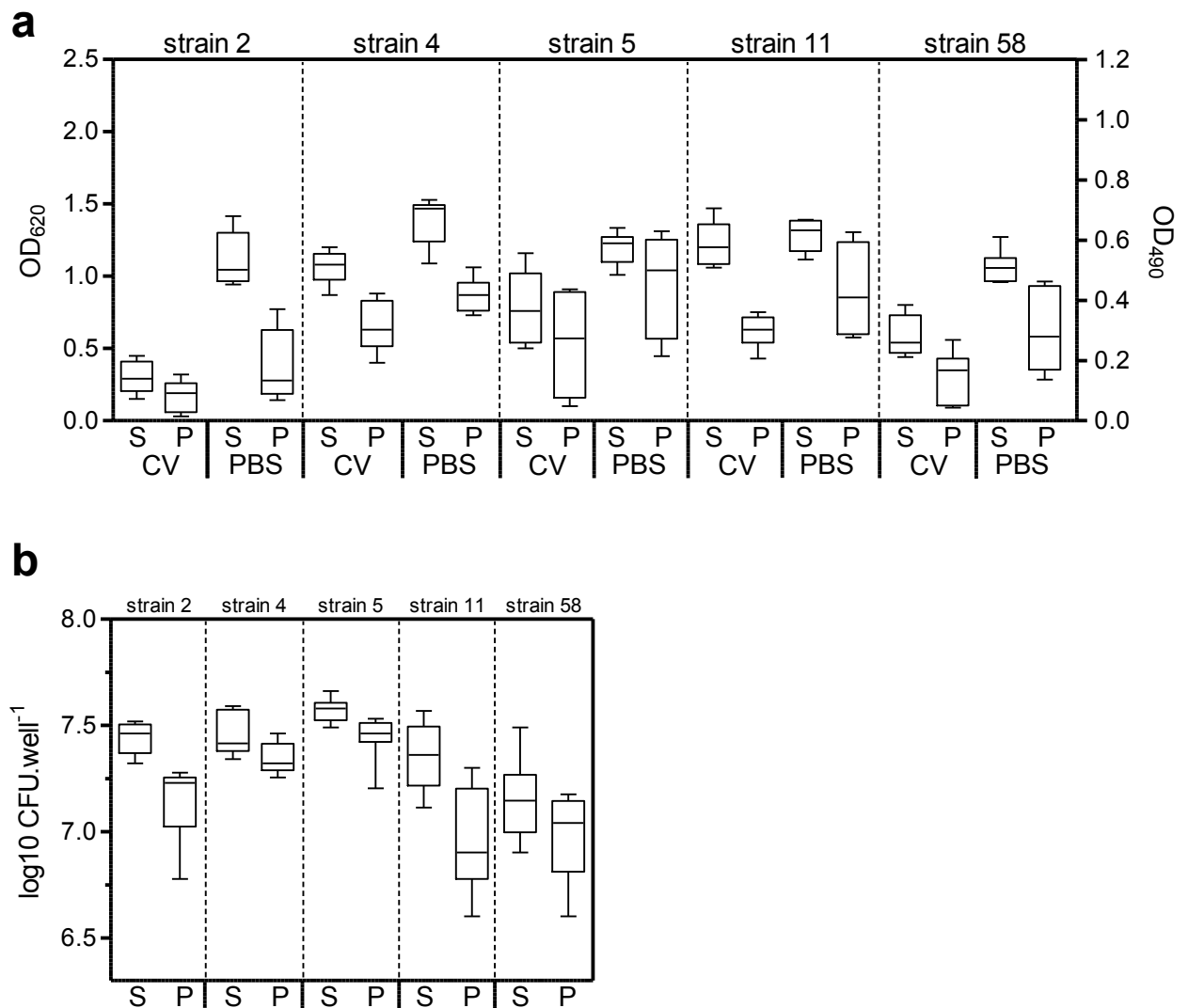
**Figure 2.** Application of steam washing process. (a) Biofilm quantification by crystal violet coloration (OD<sub>620</sub>) or PBS turbidity (OD<sub>490</sub>) for SH1000 (biofilm producer strain), ATCC 12228 and TM300 (non-biofilm producer strains). Biofilms were washed using steam (S) or pipette (P). Data shown as box plot of three experiments in quadruplicate. (b) Viable cell count of bacteria assessed after PBS turbidity. Data shown as box plot of three experiments in quadruplicate. (c) CLSM of SH1000 bacteria biofilm washed using steam (left) or pipette (right). Images are 3D visualization of representative biofilm structures for each wash method stained with Syto-9 and PI. Images represent an area of approximately 320 x 320 μm. (d) Representative pictures of the bottom of microplate wells of SH1000 biofilm washed with steam (left) or pipette (right). (e) Conservation of the increase reproducibility of PBS turbidity using steam between technicians. Data represent three experiments in quadruplicate.

Wash method	Biomass ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	Mean thickness ( $\mu\text{m}$ )	Maximum thickness ( $\mu\text{m}$ )
<b>Pipette</b>	8.69 $\pm$ 0.46	9.14 $\pm$ 0.48	10.91 $\pm$ 0.48
<b>Steam</b>	11.06 $\pm$ 0.90	11.84 $\pm$ 1.13	14.43 $\pm$ 1.60

**Supplementary table 1.** Quantification of SH1000 biofilm measured by CLSM using Comstat2. Values were means  $\pm$  SD of 5 pictures.



**Supplementary Figure 1.** Variability from well to well of a 24 h-old biofilm formed by *S. aureus* strain (SH1000) within a 96-wells microplate based on colony counting. Each point represents the mean of 3 experiments. Results were grouped by column. Statistically significant differences determined by one-way ANOVA ( $p = 0.1183$  mean biofilm should be similar between columns)



**Supplementary Figure 2.** Application of steam washing process on clinical *S. aureus* isolates. (a) Biofilm quantification by crystal violet coloration (OD<sub>620</sub>) or PBS turbidity (OD<sub>490</sub>) on five clinical *S. aureus* strains isolated from patient with PJIs. Biofilms were washed using steam (S) or pipette (P). Data shown as box plot of three experiments in triplicate. (b) Viable cell count of bacteria assessed after PBS turbidity. Data shown as box plot of three experiments in triplicate.



## 2 DISCUSSION

Les travaux de recherche menés pendant cette thèse sont le fruit d'une collaboration réussie entre une entreprise, la société BioFilm Control, un laboratoire public, l'équipe INSERM U1111 « Pathogénie des Staphylocoques » du Centre International de Recherche en Infectiologie, et un centre hospitalier universitaire, les Hospices Civils de Lyon. Nous avons pu réaliser les premiers essais d'Antibiofilmogramme® *in vitro*, confirmer les résultats obtenus avec la cloxacilline *in vivo*, et étudier le lien entre la capacité de formation de biofilm et le fond génétique des souches. Enfin, nous avons pu décrire une nouvelle méthode de rinçage et de quantification des biofilms matures en microplaque. Ces travaux posent les bases d'une approche préventive de la prise en charge des patients à risque de développer une infection impliquant un biofilm. En effet avec l'Antibiofilmogramme®, l'objectif visé n'est pas d'améliorer les traitements curatifs, l'administration d'antibiotiques ayant montré ses limites dans l'éradication d'un biofilm, mais au contraire d'empêcher ou de diminuer les risques qu'un biofilm se forme. Lors des premières étapes de formation d'un biofilm, les bactéries encore sous forme planctonique doivent adhérer au matériel avant d'initier la synthèse de matrice extracellulaire qui conduira à la formation d'un biofilm mature. A ce stade, une antibiothérapie préventive efficace peut stopper le processus et empêcher que l'infection évolue vers une forme chronique. Au cours de nos travaux, nous nous sommes consacrés à la place de l'Antibiofilmogramme® dans la prise en charge des IOA dues aux staphylocoques.

### **L'Antibiofilmogramme®: un modèle *in vitro***

L'Antibiofilmogramme® est un modèle de test diagnostique *in vitro* permettant de mesurer l'activité préventive des antibiotiques sur l'installation des bactéries en biofilm. La **CMib**, correspondant à la plus faible concentration d'un antibiotique nécessaire pour **prévenir** la formation de biofilm, apporte une information supplémentaire qui, couplée à la mesure de la **CMI**, correspondant à la plus faible concentration inhibant toute croissance visible à 24 h, pourrait aider le clinicien dans le choix de l'antibiothérapie optimale notamment chez les patients porteurs de matériel prothétique. En effet, l'Antibiofilmogramme® pourrait permettre de sélectionner, parmi les antibiotiques classés comme efficaces par la méthode d'antibiogramme classique (CMI), ceux possédant une activité prévenant la formation de biofilm (CMib).

La technologie BioFilm Ring Test® est basée sur la mesure du déplacement de microbilles magnétisables sous l'action d'un champ magnétique généré par un aimant. L'atténuation du

mouvement de ces microbilles permet d'estimer indirectement la formation d'un biofilm (200). En se soustrayant aux étapes de rinçage, cette approche originale permet de quantifier la formation de biofilm précoce de façon **reproductible**, prérequis indispensable à une utilisation en routine clinique. En effet, l'évaluation de l'activité des antibiotiques en laboratoire hospitalier, permettant de choisir l'antibiothérapie qui sera administrée aux patients, doit se faire au travers de méthodes fiables permettant l'obtention de résultats reproductible et répétable indépendamment du technicien et du laboratoire, et dans un délai compatible avec des décisions thérapeutiques. L'Antibiofilmogramme® répond à ces attentes via un protocole **standardisé** incluant :

- **l'utilisation de microplaques** prêtes à l'emploi contenant différentes concentrations d'antibiotiques sous forme congelée au fond des puits
- une **standardisation de l'inoculum** par des méthodes déjà utilisées en routine pour les antibiogrammes (Mac Farland)
- une **automatisation de l'incubation, de la phase d'aimantation et de la lecture** (en cours de développement par la Société Biofilm Control)

Récemment, une étude publiée par *Manner et al* s'est intéressée à l'effet préventif des antibiotiques sur la formation de biofilm sur deux souches de *S. aureus* et une souche de *S. epidermidis* (391). La méthode a été réalisée en microplaque en mesurant l'activité des antibiotiques sur la formation de biofilm à 18 h en mesurant la biomasse totale par coloration au Cristal Violet et en mesurant la viabilité bactérienne par la méthode résazurine. La CMIb a été déterminée sur la base de la définition de *Gupta* correspondant à la plus faible concentration d'antibiotique réduisant de 90 % la formation de biofilm par rapport à la condition contrôle sans traitement (392). Les résultats obtenus avec l'Antibiofilmogramme® sont corrélés aux résultats de réduction de la biomasse mesurée en Cristal Violet dans cette étude pour les antibiotiques communs testés (clindamycine, rifampicine, acide fusidique, linézolide, teicoplanine, daptomycine). Ces résultats, combinés avec ceux que nous présentons, suggèrent que l'Antibiofilmogramme® est capable d'apporter la même information sur la capacité préventive des antibiotiques sur l'installation en biofilm que la méthode utilisée par *Manner et al*. De plus, l'Antibiofilmogramme® permet l'obtention d'un résultat dans un délai plus court (4 h contre 24 h) avec un protocole moins lourd.

Un certain nombre de critiques peuvent être évoquées sur l'approche que nous avons choisie. L'une d'entre elles est que les conditions de réalisation de la méthode Antibiofilmogramme® s'éloignent des conditions réelles de formation du biofilm *in vivo*. En effet, la surface sur laquelle les bactéries adhèrent dans la microplaque (polystyrène) ne correspond pas au support sur lequel les bactéries se

trouvent confrontées lors d'une infection. Hors, nous avons vu dans l'introduction de ce document que ce paramètre avait un impact majeur sur l'adhésion bactérienne (393). De la même manière, le milieu de culture utilisé (BHI) est un milieu semi-synthétique riche éloigné de l'environnement dans lequel le biofilm se forme *in vivo*. En effet, l'environnement « patient » est complexe, correspondant plutôt à un milieu pauvre en nutriments et stressant pour la bactérie du fait de la pression du système immunitaire et de la réponse inflammatoire (125). Certains éléments qui entrent dans la composition *in vivo* de la matrice des biofilms, comme la fibrine, sont également absents dans les conditions actuelles de l'Antibiofilmogramme® (133). Tous ces paramètres suggèrent que le biofilm formé dans les modèles *in vitro* en microplaque est différent du biofilm formé *in vivo* chez le patient. Ces différences entre les biofilms *in vitro* et *in vivo* ont d'ailleurs été décrites dans la littérature. Ainsi, l'observation des biofilms par des méthodes de microscopie a montré que : i) les biofilms *in vivo* étaient plus fins que ceux obtenus *in vitro*, ii) la structure « en champignon » décrite dans la partie bibliographique n'était jamais observée *in vivo* (394,395). Il faut néanmoins noter que ces deux différences concernent les étapes de maturation du biofilm qui ne sont pas ciblées dans la méthode Antibiofilmogramme®.

Au final, ces critiques peuvent être écartées car l'intérêt de l'Antibiofilmogramme® ne repose pas sur sa similarité avec la clinique, mais sur sa **valeur prédictive**. Par comparaison, les méthodes d'antibiogramme classiques mesurant les CMI ne cherchent pas à mimer ce qui se passe *in vitro* et ne sont pas représentatives de la réalité clinique. Les CMI sont déterminées visuellement après 18 à 24 h d'incubation dans un milieu artificiel, le milieu Mueller-Hinton. Certaines méthodes automatisées parmi les plus utilisées comme la technique Vitek (bioMérieux) ne déterminent même pas les CMI vraies, mais se basent uniquement sur l'interprétation de cinétique de croissance en présence de différentes concentrations d'antibiotiques via des algorithmes pour calculer les CMI. Dans tous les cas, l'objectif de ces méthodes est de corrélérer une valeur (CMI réelle ou calculée, diamètre d'inhibition) obtenue via des protocoles très **standardisés** et **reproductibles**, avec des données cliniques de succès ou d'échecs de traitements avec les antibiotiques testés. De ce point de vue, l'Antibiofilmogramme® se veut dans la continuité des mesures de CMI et répond aux impératifs de standardisation de méthode et de reproductibilité des résultats et est donc adapté à une utilisation en milieu hospitalier.

### **Etude de la prédictivité de l'Antibiofilmogramme®**

Afin d'étudier la valeur prédictive de l'Antibiofilmogramme®, un recueil rétrospectif de données cliniques et de souches d'IOA a été mis en place pendant cette thèse et a permis le recrutement de

105 souches bactériennes associées pour chacune d'elle à une centaine de paramètres cliniques. Pour chacun de ces patients, le traitement reçu a été associé à un succès (correspondant à l'absence de rechute clinique et/ou microbiologique par la même bactérie responsable de l'infection initiale dans un délai de deux ans après arrêt du traitement) ou à un échec. Parmi les 105 souches, nous en avons sélectionné 29 pour réaliser les essais d'Antibiofilmogramme® (15 succès et 14 échecs). En corrélant les résultats d'Antibiofilmogramme® avec les données cliniques, nous avons pu caractériser l'activité de prévention anti-biofilm de l'antibiothérapie qu'avait reçue chaque patient. L'hypothèse était que **la prédiction du succès pouvait être améliorée par la mesure du caractère « présence du biofilm » de l'antibiothérapie défini par l'Antibiofilmogramme®**. Nous nous attendions à ce que l'antibiothérapie du groupe de patient ayant conduit à un succès soit associée à l'utilisation d'antibiotiques prévenant la formation de biofilm de la souche responsable de l'infection. Il est rapidement apparu que plusieurs biais liés à la complexité des IOA nous empêcheraient de vérifier cette hypothèse notamment:

- la diversité **physiopathologique** des situations cliniques incluant les ostéites, arthrites et spondylodiscite ; avec et sans matériel.
- la diversité des **antibiothérapies** administrées aux patients. En effet, la durée de l'antibiothérapie variait de 22 jours à plusieurs années dans les cas d'un traitement suspensif, avec une moyenne de 199 jours. Le nombre d'antibiotiques prescrits variait de 2 à 8 avec une moyenne à 4,52 par patient. La majorité des patients avait reçu au cours de leurs traitements à la fois des antibiotiques efficaces et non efficaces sur la prévention de la formation de biofilm sur la base de l'Antibiofilmogramme®.

Afin de pouvoir étudier la prédictivité de l'Antibiofilmogramme®, deux autres approches ont alors été développées: la mise en place d'une étude clinique prospective et la réalisation d'un modèle *in vivo*.

Sur la base de l'expérience acquise dans le cadre de l'étude rétrospective effectuée, une **étude clinique prospective** a été mise en place au sein des Hospices Civils de Lyon. Nous avons été en charge de la rédaction du dossier qui a été validé par le Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Est II le 4 mars 2015 et enregistré à la Commission National de l'Informatique et des Libertés (CNIL). Par rapport au recueil rétrospectif, nous avons restreint l'inclusion des patients aux IOA sur matériel. De plus, les repiquages des souches sur géloses ainsi que la congélation des souches pouvant impacter le phénotype bactérien et par conséquent modifier les résultats d'Antibiofilmogramme®, un critère strict a été mis en place dans ce recueil. En effet, le nombre de repiquage de la souche bactérienne avant le test d'Antibiofilmogramme ne devait pas être supérieur

à 2 ; les souches devaient être expédiées en temps réel ( $\pm 2$  jours) à BioFilm Control qui réalisait les essais dès réception. Cette procédure nous a permis de réaliser les essais sur des souches n'ayant pas subi de congélation, et par conséquent plus représentatives de leur état physiologique au moment de l'infection. Afin de pallier la difficulté de la diversité de l'antibiothérapie observée lors du recueil rétrospectif, une nouvelle hypothèse a été formulée : **l'administration d'une antibiothérapie post-chirurgicale (J0 à J+7) prévenant la formation de biofilm selon les résultats de l'Antibiofilmogramme® est associée à un risque plus faible de rechute.** En effet, une antibiothérapie post-chirurgicale empêchant le biofilm de se former permettrait au système immunitaire d'éradiquer les bactéries résiduelles. A l'inverse, une antibiothérapie post-chirurgicale ne prévenant pas la formation de biofilm permettrait aux bactéries d'un biofilm dans un délai d'une semaine, réduisant l'efficacité des autres molécules administrées par la suite. Dans ce cas, il est possible de réaliser une étude de **cohorte** selon un critère de concordance entre les résultats d'antibiogramme et d'Antibiofilmogramme® de l'antibiothérapie administrée au patient avec comme critère d'efficacité la présence/absence de souches de *S. aureus* en fin d'antibiothérapie. Les patients sont alors divisés en trois groupes :

- Concordant : résultat de l'antibiogramme sensible et Antibiofilmogramme® sensible pour au moins 1 antibiotique prescrit pendant les 7 jours suivant la chirurgie.
- Discordant : résultat de l'antibiogramme sensible et Antibiofilmogramme® résistant pour l'ensemble des antibiotiques prescrit pendant les 7 jours suivant la chirurgie.
- Autre : tous les autres cas.

Il est possible de calculer le risque relatif (RR) mesurant l'association entre les succès ou échecs thérapeutiques et les résultats d'Antibiofilmogramme®. Sur la base d'un taux de rechute de 30 %, d'un taux de concordance de 50 %, et en émettant l'hypothèse que l'association sera forte entre le groupe concordant et l'absence de rechute (90 %), une inclusion de 40 patients permettrait de mettre en avant un RR = 5 et un Odds Ratio = 9, significative à un risque d'erreur alpha = 0,05 selon le test de Fisher. L'étude est en cours et totalise actuellement une trentaine de patients inclus. Néanmoins, les délais important d'inclusion et de suivi des patients (jusqu'à 1 an après arrêt du traitement) nous ont conduits à élaborer une autre approche permettant d'évaluer la prédictivité de l'Antibiofilmogramme® dans des délais compatibles avec les contraintes du projet BIOFILM.

Nous avons choisi de nous tourner vers la mise au point d'un **modèle *in vivo*** original d'infection sur cathéter en position sous cutané chez la souris, en collaboration avec le laboratoire Vivexia sous la

direction du Dr Delphine Croisier. Nous avons étudié l'activité préventive de la cloxacilline sur l'installation en biofilm en utilisant 3 souches de *S. aureus*. Le choix s'est porté sur cette molécule en raison de son rapport CMIb/CMI élevé et d'un ajustement possible du modèle pharmacocinétique pour atteindre *in vivo* ces concentrations cibles. L'objectif était de démontrer que **la CMIb déterminée *in vitro* par l'Antibiofilmogramme® était prédictive de l'action préventive de l'antibiotique sur la formation de biofilm *in vivo***. L'approche originale de cette méthode a reposé sur la comparaison de deux posologies d'un même antibiotique, ciblant des concentrations sériques correspondant à la CMI et à la CMIb. Les résultats pour les 3 souches testées ont montré une réduction faible ou nulle de la colonisation des cathéters à la concentration sérique correspondant à la CMI, et à l'inverse une réduction de 2 à 3 logs à la concentration sérique correspondant à la CMIb. Au final, le modèle utilisé suggère que la valeur de la CMIb de la cloxacilline mesurée *in vitro* par l'Antibiofilmogramme® est corrélée à une activité de cet antibiotique sur la prévention de la formation d'un biofilm *in vivo*, c'est-à-dire dans un environnement complexe faisant intervenir l'ensemble des paramètres *in vivo* incluant le système immunitaire.

Cependant une critique possible de ce modèle est que la diminution de colonisation observée pourrait être due uniquement à la plus forte concentration d'antibiotique administrée et à l'effet bactéricide induit. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de compléter ces travaux en utilisant un antibiotique ne prévenant pas la formation de biofilm sur la base de l'Antibiofilmogramme®, comme la fosfomycine. On peut alors s'attendre à ne pas observer de différence de colonisation malgré une augmentation des doses administrées à l'animal. Cette approche permettrait de montrer que l'Antibiofilmogramme®, en plus d'être capable de déterminer la concentration nécessaire à la prévention de la colonisation d'un matériel, est également capable d'identifier les antibiotiques n'ayant pas d'action préventive *in vivo* sur les biofilms. Une autre approche afin de se rapprocher des conditions cliniques des IOA serait d'utiliser d'autres modèles animaux. En effet, l'action préventive de la cloxacilline sur la colonisation du matériel n'a été étudiée que sur un cathéter en position sous cutanée. L'utilisation de modèles d'infections sur prothèse articulaire chez le lapin permettrait l'étude de l'activité des antibiotiques sur la formation de biofilm dans un environnement osseux et sur un matériel prothétique (396).

### **Utilisation clinique de l'Antibiofilmogramme®**

La CMIb déterminé par l'Antibiofilmogramme® apparaît comme un nouveau paramètre permettant d'améliorer la prise en charge des patients dans les situations cliniques où le risque de formation d'un biofilm est élevé. Ainsi, nous avons vu dans la revue de la littérature que le risque de

colonisation du matériel lors d'une bactériémie à *S. aureus* est élevé, atteignant 30 % à 40 % selon les études ([Cf. 1.2.1](#)). La prise en charge des bactériémies débute généralement par une antibiothérapie probabiliste après réalisation d'hémocultures. Par la suite, l'antibiothérapie est adaptée séquentiellement sur la base de l'identification du germe et de l'antibiogramme (397). Dans le cas d'une bactériémie à *S. aureus*, les hémocultures peuvent se positiver après quelques heures et jusqu'à 5 jours d'incubation. L'isolement du germe nécessite par la suite 18 à 24h supplémentaire. Il est donc possible de disposer des résultats d'Antibiofilmogramme® 4 h après l'obtention des colonies, soit 30 h à 6 jours post-prélèvement d'hémoculture. Il faut cependant ajouter un délai entre le début des symptômes et le prélèvement qui peut être important, notamment pour les patients non hospitalisés. Ce délai semble impacter le risque de colonisation des prothèses en cas de bactériémie comme le suggère le fait que la majorité des souches isolées ont une origine communautaire, et non hospitalière (20,398,399). D'après ces études, le diagnostic et l'antibiothérapie empirique rapide dont bénéficient les patients déjà hospitalisés au moment de la bactériémie, est associés à un plus faible risque de colonisation du matériel. Les données d'Antibiofilmogramme® pourraient donc servir pour les patients porteurs de prothèse présentant une bactériémie en dehors de l'hôpital. Une étude clinique est nécessaire pour savoir si l'administration d'un traitement efficace sur la base de l'Antibiofilmogramme® peut être associée à un plus faible risque de colonisation, malgré le délai entre i) la bactériémie et donc l'initiation possible de la formation d'un biofilm et, ii) l'adaptation de l'antibiothérapie sur la base de l'Antibiofilmogramme®.

L'Antibiofilmogramme® pourrait également apporter une aide précieuse lors de la prise en charge des changements de prothèse en cas d'infection à staphylocoques. Pour la majorité des patients, la prise en charge débute par un acte chirurgical, associé en préopératoire ou en post-opératoire immédiat à une antibiothérapie. Selon la situation clinique, le matériel peut être conservé (arthrotomie-lavage) ou retiré avec une réimplantation en 1 temps ou en 2 temps. Dans toutes ces situations, des bactéries résiduelles au niveau du site opératoire et donc en contact avec le matériel peuvent être présentes. Le risque de recolonisation du matériel est donc important. En effet, un modèle *in vivo* a montré que  $10^2$  UFC étaient suffisantes pour induire une infection en présence de matériel contre plus de  $10^8$  UFC en l'absence de matériel (18). Dans certaines situations, la bactérie responsable de l'infection est connue au moment de la repose de la prothèse (en cas d'hémocultures positives, de biopsies ou ponctions articulaire préopératoires), offrant l'opportunité de réaliser un Antibiofilmogramme® et de disposer des résultats au moment du choix de l'antibiothérapie post-chirurgicale. Les recommandations Nord-Américaines et de la SPLIF incluent les  $\beta$ -lactamines et les

glycopeptides (2,52). Or, nous avons pu observer que la capacité de prévention de la formation de biofilm de ces molécules était souche-dépendante. Il est donc possible que l'Antibiofilmogramme® puisse identifier un facteur de risque lié à l'utilisation de ces molécules en fonction de la souche, permettant d'orienter alors l'utilisation d'autres antibiotiques également recommandée, et possédant une activité préventive sur les biofilms, comme la clindamycine ou le linézolide.

### **Mesure de l'efficacité des traitements curatifs sur les biofilm formés**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'Antibiofilmogramme® mesure l'effet préventif des antibiotiques sur l'installation en biofilm, et non l'effet curatif sur un biofilm installé. Afin d'être compatible avec une utilisation en routine hospitalière, une méthode mesurant l'effet **curatif** des biofilms doit être : i) **reproductible**, ii) **standardisée**, iii) utilisable en routine et iv) **haut débit** (mesure de plusieurs conditions (antibiotiques) en un seul test). Actuellement, les méthodes en microplaque 96 puits associant une mesure de la biomasse en Cristal Violet et/ou une mesure de la viabilité par résazurine ou dénombrement sur gélose, ainsi que la méthode du Calgary Biofilm Device, répondent aux critères de standardisation et de haut débit (195,196,400,401). Cependant, les résultats manquent de reproductibilité en raison des étapes de rinçage nécessaires, à l'élimination des bactéries planctoniques, de l'antibiotique ou des colorants. Nous avons vu dans le troisième travail présenté dans cette thèse que l'utilisation d'une méthode de rinçage par la **vapeur** associée à une mesure de la biomasse par reprise du biofilm en milieu PBS et une mesure de la viabilité des bactéries par dénombrement des colonies sur gélose, permettait d'obtenir des résultats répétables et reproductibles. Cette technique devra être cependant standardisée et optimisée afin d'être adapté à une utilisation dans un laboratoire de routine (automatisation du rinçage, mesure de la viabilité par résazurine permettant l'obtention du résultat 24 h avant la méthode de dénombrement). Cette approche, combinée avec l'Antibiofilmogramme®, permettrait aux laboratoires hospitaliers de se doter de techniques fiables pour l'étude de l'activité des antibiotiques sur les biofilms, aussi bien sur l'aspect préventif que curatif. Cependant, des études cliniques démontrant que les mesures d'efficacité des traitements sur un biofilm formé permettraient d'améliorer la prise en charge des patients sont nécessaires.

### **Lien entre la capacité de formation de biofilm et le fond génétique**

Dans le deuxième travail présenté dans cette thèse, nous avons montré que la capacité de formation de biofilm était variable d'une souche à l'autre et qu'une corrélation pouvait être établie avec le fond génétique des souches (regroupés en fonction de leur affiliation à un complexe clonal). Une



approche originale menée dans cette étude a consisté à caractériser la formation de biofilm d'un point de vue **quantitatif** (réalisation de cinétiques d'adhésion en BioFilm Ring Test® et évaluation de la production de biofilm mature en Cristal Violet) et **qualitatif** (détection des composants nécessaires à l'initiation du biofilm (ADNe et protéines) au travers de l'utilisation d'enzymes dégradant spécifiquement ces composants (DNase et protéinase K)).

Nous avons pu observer que les souches appartenant au CC30 présentaient une cinétique d'adhésion significativement plus lente que les autres CC en BioFilm Ring Test. Cependant, les tests statistiques appliqués aux cinétiques d'adhésion ont été réalisés heure par heure sans tenir compte de l'allure globale de la courbe. Afin de pallier à ce problème, une collaboration a été initiée avec le service de biostatistique des HCL et a conduit au recrutement d'un étudiant en Master 2. L'objectif du projet est de mettre en place une méthode d'analyse des données via des modèles de mélange permettant de regrouper les cinétiques partageant une trajectoire commune (400). L'étude est en cours et pourrait permettre à l'avenir de disposer de modèles mathématiques et statistiques robustes pour l'analyse des résultats de cinétique en BioFilm Ring Test®.

Nous avons également pu observer que les souches appartenant au CC30 présentaient une proportion de souches CM1b-S à la cloxacilline, teicoplanine et vancomycine plus importante que la moyenne de l'ensemble des souches testées. Cependant, en raison de l'effectif faible des souches incluses, aucune corrélation statistique n'a pu être faite entre l'affiliation au CC et les résultats d'Antibiofilmogramme®. L'inclusion de nouvelles souches est en cours et pourrait permettre à l'avenir d'établir des liens entre le taux de succès et d'échec de la prise en charge des IOA et des facteurs bactériens comme la capacité de formation de biofilm ou l'appartenance de la souche à un CC.

### **3 PERSPECTIVES**

La plaque Antibiofilmogramme® pour les IOA a été conçue afin de pouvoir déterminer les **CMlb** après **4h** d'incubation, par une mesure de l'intensité du spot généré par les microbilles après aimantation. Une approche intéressante serait de tester s'il est possible de déterminer les **CMI** à partir de la même plaque, en laissant se poursuivre l'incubation pendant **18h**, et en mesurant non plus l'immobilisation des billes, mais simplement la croissance bactérienne par absorbance (turbidité du milieu). Cette approche demande cependant des étapes d'optimisation. Actuellement, la lecture de CMlb ne peut se faire qu'après l'ajout d'un liquide de contraste (opacifiant) à la surface des puits, ce qui empêche toute mesure ultérieure de DO dans les puits. Une alternative au liquide de contraste pourrait être d'utiliser pour les plaques, un "capot" opaque blanc mimant le liquide de contraste actuellement utilisé. Cependant, des phénomènes optiques altérant l'acquisition de l'image constituent à l'heure actuelle un verrou technologique qui devra être résolu. De plus, les spots générés au centre des puits pourraient altérer la mesure d'absorbance. La solution pourrait être d'effectuer une lecture excentrée, le trajet optique ne traversant plus alors le spot généré par les microbilles. Néanmoins, l'immobilisation partielle des billes dans la zone de passage du faisceau pourrait là encore poser des problèmes. Une dernière solution serait un transfert des suspensions obtenues après 18h d'incubation dans chacun des puits, dans une plaque jumelle pour assurer une lecture simple de la turbidité de chaque puits. Cette approche induit un coup ainsi qu'une étape de transfert qui pourrait être automatisée.

Dans notre étude, les Antibiofilmogrammes® ont été réalisés sur 29 souches de *S. aureus* d'IOA pour 11 antibiotiques classiquement utilisés pour ce type d'infection. Chaque antibiotique a été testé à 8 concentrations différentes selon un schéma de dilution d'ordre 2 encadrant les concentrations critiques (tableau 6). Les essais ont été réalisés en plaque 96 puits, la première colonne étant consacré aux conditions contrôles de croissance (4 puits) et de stérilité (4 puits). Au vu des résultats obtenus, il semble possible **d'optimiser** la plaque Antibiofilmogramme® en diminuant le nombre de puits testés sans perte d'information.

Dans l'hypothèse où les CMI sont déterminés à partir des plaques Antibiofilmogramme®, la **catégorisation clinique** des souches en **sensible** (S), **intermédiaire** (I) ou **résistante** (R) nécessite d'inclure uniquement les concentrations critiques c et C. La souche est interprétée résistante en cas de croissance à ces deux concentrations, intermédiaire en cas de croissance uniquement à la

concentration c, et sensible en l'absence de croissance à ces deux concentrations. Pour la plupart des antibiotiques testés, l'EUCAST-CASFM n'a défini qu'une seule concentration critique (c = C) limitant l'interprétation à seulement deux catégories, "sensible" ou "résistant". Pour la plaque Antibiofilmogramme® pour les IOA, seuls 13 puits sont donc nécessaires pour catégoriser cliniquement les souches pour les 11 antibiotiques actuellement inclus.

	Contrôle	Cloxacilline	Téicoplanine	Vancomycine	Daptomycine	Fosfomycine	Ofloxacine	Rifampicine	Gentamicine	Acide Fusidique	Linézolide	Clindamycine
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	negative	16	16	16	8	128	64	8	8	8	16	16
B	positive	8	8	8	4	64	32	4	4	4	8	8
C	negative	4	4	4	2	32	16	2	2	2	4	4
D	positive	2	2	2	1	16	8	1	1	1	2	2
E	negative	1	1	1	0.5	8	4	0.5	0.5	0.5	1	1
F	positive	0,5	0.5	0.5	0.25	4	2	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
G	negative	0,25	0.25	0.25	0.125	2	1	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25
H	positive	0,125	0.125	0.125	0.0625	1	0.5	0.0625	0.0625	0.0625	0.125	0.125

**Tableau 6 : Plan de la plaque Antibiofilmogramme® pour les IOA à staphylocoques représentant les concentrations d'antibiotiques testées. Les lignes rouges représentent les concentrations critiques définies selon les recommandations EUCAST-CASFM 2016.**

Dans la même logique de diminution du nombre de puits, lorsque l'on regarde les résultats obtenus sur les 29 souches de *S. aureus* d'IOA, on constate que la répartition des CMib est très variable selon l'antibiotique testé (tableau 7).

	Contrôle	Cloxacilline	Téicoplanine	Vancomycine	Daptomycine	Fosfomycine	Ofloxacine	Rifampicine	Gentamicine	Acide Fusidique	Linézolide	Clindamycine
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	negative	10%	10%	17%	90%	100%	3%		48%			3%
B	positive	14%	17%	7%	7%		24%		41%			
C		45%	17%	28%	3%		10%		10%		7%	
D		21%	55%	31%			31%			17%	59%	
E		10%		17%			17%			45%	24%	
F							7%			28%	3%	
G							7%			10%	7%	10%
H								100%				86%

**Tableau 7 : Répartition en pourcentage des résultats d'Antibiofilmogramme® obtenus sur la collection de 29 *S. aureus* d'IOA en fonction du plan de la plaque Antibiofilmogramme® pour les IOA. Les lignes rouges représentent les concentrations critiques définies selon les recommandations EUCAST-CASFM 2016.**

On peut observer que l'intégralité des CMib de la fosfomycine sont supérieures à la concentration la plus forte testée (puits A6 = 128 µg/mL). Cet antibiotique ne semble pas efficace pour prévenir la formation de biofilm chez *S. aureus*. Si ce résultat était confirmé sur un nombre plus important de souches, cet antibiotique pourrait être retiré de la plaque. A l'inverse, les CMib de la rifampicine sont systématiquement inférieures à la concentration la plus faible testée (puits H8 = 0.0625 µg/mL). Il serait intéressant de diminuer la gamme de concentration, afin de pouvoir déterminer les CMib. Enfin, la distribution pour les autres antibiotiques varie entre 3 et 7 concentrations, permettant alors de réduire la gamme de 1 à 5 puits selon la molécule testée. Il est à noter que la souche ayant une CMib à 16 µg/mL à la clindamycine (puits A12) est une souche résistante ayant une CMI = 16 µg/mL,

empêchant par conséquent l'utilisation de cet antibiotique dans cette situation clinique. Au final, il semble possible de pouvoir **restreindre les gammes de concentrations** d'antibiotiques testées. Dans notre exemple, **46 puits** sur les 84 contenant des antibiotiques pourraient être retirés. Ces résultats sont cependant préliminaires en raison du nombre faible de souche testée (n=29), de la provenance monocentrique des souches, et de la représentation d'une seule espèce pour un seul type d'infection. De plus, les souches incluses ont un profil multi-sensible, ne permettant pas de conclure sur l'effet de mécanisme de résistance dans la formation du biofilm.

En conclusion, nous avons vu que le nombre de conditions nécessaires pour catégoriser cliniquement les CMI des souches pour les 11 antibiotiques n'est que de 13 puits. Les gammes de concentrations testées pour les CMIb peuvent être réduites, tout comme le nombre de conditions contrôle (1 puits pour le témoin de croissance, 1 puits pour le contrôle stérilité). En procédant ainsi, il est possible de gagner potentiellement **48 puits**, soit près de **50 %** de la plaque.

Cette optimisation permettrait **d'inclure de nouveaux antibiotiques** utilisés en clinique dans la plaque des IOA, comme la **ceftaroline**, une céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération possédant une activité contre les SARM et ayant montré son efficacité sur des modèles *in vivo* d'IOA (402,403), la **pristinamycine**, un antibiotique non recommandé mais offrant une alternative thérapeutique intéressante (404), et qui est utilisé par certaines équipes françaises pour le traitement des IOA malgré l'absence de consensus, le **cotrimoxazole**, ou la **céfazoline** à l'origine utilisée en antibioprofylaxie, et utilisée actuellement en thérapeutique suite à une rupture mondiale de la cloxacilline

Il est important de noter que les recommandations concernant l'antibiothérapie des IOA sur matériel spécifient de débuter le traitement en associant deux molécules (2,52). En effet, l'association d'antibiotiques possède plusieurs avantages dont : i) l'obtention possible d'une synergie, ii) l'élargissement du spectre d'activité en cas de traitement probabiliste, iii) la prévention de l'émergence de mutants résistants. Il serait intéressant de tester les associations sur la base des recommandations thérapeutiques des IOA, afin d'être en adéquation avec les traitements cliniques utilisés. Cependant, la détermination des concentrations à inclure dans le test est complexe, en raison du nombre important de conditions pouvant être testées (variation de la concentration de l'antibiotique A et de l'antibiotique B induisant une multitude de combinaisons). Des études d'optimisation ciblant les concentrations clés sont nécessaires afin de pouvoir inclure cette approche dans les plaques Antibiofilmogramme®.

Enfin, dans la revue de la littérature effectuée dans ce document, nous avons pu voir que la plupart des antibiotiques pouvaient, à faible concentration, **induire** la formation de biofilm ([Cf. 2.1.4 Effet](#)

[d'induction](#)). Ces concentrations sub-inhibitrices peuvent être retrouvées dans un contexte infectieux chez l'homme en raison de la posologie, de la voie d'administration, de la mauvaise diffusion de certaines molécules au niveau osseux, et de la difficulté de diffusion au niveau des biofilms (368). L'administration d'un antibiotique favorisant la formation de biofilm pourrait alors constituer un **facteur de risque** dans la prise en charge des patients. Certaines études ont mis en avant que ce phénomène était souche dépendant, notamment chez *S. aureus* (370), suggérant l'intérêt d'avoir un test en routine hospitalière qui permettrait d'identifier les souches pour lesquelles l'administration d'un antibiotique favoriserait la formation de biofilm.

Au final, l'Antibiofilmogramme® pourrait à l'avenir combiner 2 informations complémentaires sur l'activité des antibiotiques permettant d'affiner le choix de l'antibiothérapie administrée aux patients :

- la **classique CMI**, reflétant l'efficacité de l'antibiotique sur les bactéries **planctoniques** et permettant de catégoriser cliniquement les souches S, I ou R.
- la **CMIB**, permettant de sélectionner parmi les antibiotiques efficaces sur les bactéries planctoniques (CMI) ceux possédant en plus une activité **préventive sur la formation de biofilm**.

Enfin, le nombre de nouvelles molécules et de nouvelles classes de molécules décrites ayant une activité sur les biofilms ne cesse d'augmenter. De nombreux projets de recherche visent à en découvrir de nouvelles grâce au développement de techniques de criblage haut débit (232,405–407). À l'avenir, plusieurs de ces molécules pourraient obtenir une autorisation de mise sur le marché permettant leur utilisation en thérapeutique. Tout comme ce fut le cas pour les antibiotiques, leur emploi s'accompagnera probablement d'une adaptation bactérienne conduisant à l'acquisition de mécanismes de résistance à ces molécules. Il sera alors nécessaire de tester la sensibilité des souches avant de les administrer aux patients. Dans ce contexte, il sera nécessaire de disposer de tests diagnostiques fiables et reproductibles pour étudier l'efficacité de ces molécules sur les biofilms bactériens, concernant aussi bien leur activité préventive que curative. L'antibiofilmogramme® et la méthode de rinçage à la vapeur et quantification en PBS qui ont été développés et optimisés au cours de cette thèse représentent un ensemble technologique pouvant répondre à ces besoins futurs.

## 4 ANNEXE

### 4.1 Premier article: Adaptive processes of *Staphylococcus aureus* isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients.

Cellular Microbiology (2016)

doi:10.1111/cmi.12582

## Adaptive processes of *Staphylococcus aureus* isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients

Sophie Trouillet-Assant,<sup>1,2\*,†</sup> Lucie Lelièvre,<sup>1,†</sup>  
 Patrícia Martins-Simões,<sup>1,2</sup> Luiz Gonzaga,<sup>3</sup>  
 Jason Tasse,<sup>1,2</sup> Florent Valour,<sup>1,4</sup>  
 Jean-Philippe Rasigade,<sup>1,2,5</sup> François Vandenesch,<sup>1,2,5</sup>  
 Rafael Lucas Muniz Guedes,<sup>3</sup>  
 Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos,<sup>3</sup>  
 Jocelyne Caillon,<sup>6</sup> Sebastien Lustig,<sup>7</sup> Tristan Ferry,<sup>1,4</sup>  
 Cédric Jacqueline,<sup>6,‡</sup> Guilherme Loss de Moraes<sup>3,‡</sup> and  
 Frédéric Laurent<sup>1,2,5,‡</sup>

<sup>1</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Pathogenesis of staphylococcal infections, University of Lyon 1, Lyon, France.

<sup>2</sup>Department of Clinical Microbiology, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

<sup>3</sup>Bioinformatics Laboratory – LABINFO, National Laboratory of Scientific Computation – LNCC/MCTI, Petrópolis, Brazil.

<sup>4</sup>Infectious Diseases Department, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

<sup>5</sup>National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

<sup>6</sup>University of Nantes, Medical School, UPRES EA 3826, Nantes, France.

<sup>7</sup>Orthopedic Surgery Department, Northern Hospital Group, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

#### Summary

*Staphylococcus aureus* bone and joint infection (BJI) is associated with significant rates of chronicity and relapse. In this study, we investigated how *S. aureus* is able to adapt to the human environment by comparing isolates from single patients with persisting or relapsing BJIs that were recovered during the initial and recurrent BJI episodes. *In vitro* and *in vivo* assays and whole-genome sequencing analyses revealed that the recurrent isolates induced a reduced inflammatory response, formed more biofilms, persisted longer

in the intracellular compartments of host bone cells, were less cytotoxic and induced less mortality in a mouse infection model compared with the initial isolates despite the lack of significant changes at the genomic level. These findings suggest that *S. aureus* BJI chronicization is associated with an *in vivo* bacterial phenotypical adaptation that leads to decreased virulence and host immune escape, which is linked to increased intraosteoblastic persistence and biofilm formation.

#### Introduction

*Staphylococcus aureus* is known as one of the leading pathogens responsible for bone and joint infections (BJIs), particularly in the presence of a prosthetic joint or orthopaedic device (Tande and Patel, 2014; Tong *et al.*, 2015). Despite the combination of adequate surgical treatment and an optimally prolonged course of antimicrobial chemotherapy, these infections are associated with a high rate of relapse and can evolve to a chronic disease (Osmon *et al.*, 2013; Tande and Patel, 2014). Indeed, many clinical observational studies have demonstrated that *S. aureus* BJIs can persist asymptotically before relapse occurs months or years after the initial episode, even in immunocompetent hosts (Greer and Rosenberg, 1993; Bosse *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2007).

Although the involvement of multidrug-resistant *S. aureus* strains, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), may contribute to this persistence, the rate of treatment failure remains high, even in cases of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) BJI (Sheehy *et al.*, 2010). Thus, Wieland *et al.* (2012) and Valour *et al.* (2014) reported treatment failure rates of 12.2% (5/41) and as high as 24.2% (16/66) in native MSSA BJI respectively.

The physiopathology of the chronicization of BJIs is incompletely understood. Two main bacterial factors have been proposed to explain the persistence of *S. aureus* BJIs: biofilm formation (Brady *et al.*, 2008; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Sanchez *et al.*, 2013) and the internalization and persistence of bacteria in osteoblasts (Hudson *et al.*, 1995; Ellington *et al.*, 1999; Jevon *et al.*,

Received 17 February, 2016; accepted 20 February, 2016.

\*For correspondence. E-mail sophie.assant@chu-lyon.fr; Tel. +33 (0) 472 07 1837; Fax +33 (0) 472 07 1842.

†Co-first authors.

‡Co-senior authors.

## 2 S. Trouillet-Assant et al.

1999; Ellington *et al.*, 2003) accompanying bacterial phenotype switching to small-colony variants (von Eiff *et al.*, 1997; Kahl *et al.*, 1998; Proctor *et al.*, 2006; Sendi *et al.*, 2006; von Eiff *et al.*, 2006; Tuchscher *et al.*, 2010; Loffler *et al.*, 2014). Intracellular and biofilm-embedded bacteria remain protected from both the action of the host immune system and the majority of antimicrobial agents (Conlon, 2014).

We and others have previously shown that *S. aureus* isolates recovered from populations of patients with chronic BJIs are better adapted to the intracellular compartment than those recovered from different patients with acute BJIs (Kalinka *et al.*, 2014; Valour *et al.*, 2015). However, all of the studies that have suggested the implications of these bacterial mechanisms that allow for the adaptation of *S. aureus* isolates during the progression from acute to chronic BJIs are supported either by *in vitro* and *in vivo* models of staphylococcal long-term infections based on laboratory isolates or by comparisons of two distinct sets of clinical isolates, i.e. isolates recovered from patients presenting with acute BJIs and isolates recovered from patients presenting with recurrent BJIs (Tuchscher *et al.*, 2010; Kalinka *et al.*, 2014; Valour *et al.*, 2015). To date, no study has compared isolates recovered from the same patient at the time of the initial diagnosis and at the time of chronicization. Here, we selected three such pairs of isolates that were recovered from three patients dealing with chronic recurrent BJIs (Table 1). We compared the isolates of each pair by using a large panel of phenotypic *in vitro* and *in vivo* assays and applied genomic comparisons to determine whether *S. aureus* is able to adapt its phenotype *in vivo* to a novel environment and subsequently induce chronic infection.

## Results

### *The recurrent S. aureus isolates were stronger producers of mature biofilm*

The crystal violet staining method revealed that the recurrent isolates from patients 2 and 3 formed signifi-

cantly more mature biofilms ( $132 \pm 23\%$  and  $241 \pm 67\%$  respectively) than the initial isolates (100%) after 48 h ( $P < 0.01$  for both; Fig. 1). Notably, no difference was observed in the isolates recovered from patient 1.

### *The recurrent S. aureus isolates persisted longer in the osteoblasts despite the same capacities for adhesion and internalization*

Despite the same capacities for adhesion and internalization of the initial and recurrent *S. aureus* isolates ( $P > 0.05$ ; Figs 2A, 2B and S1), we next evaluated whether the isolates were cleared as efficiently by the osteoblasts. Using the murine osteoblast-like cells, the persistence levels of the recurrent isolates obtained from patients 1, 2 and 3 that were observed 72 h post infection were 1.18-, 2.00- and 2.07-fold greater respectively ( $P < 0.01$  for all) than those of the initial isolates (Fig. S1). When using human primary osteoblasts, the intracellular bacteria counts 48 h post infection were 1.08-, 1.78- and 4.26-fold greater for the recurrent isolates recovered from patients 1, 2 and 3 respectively, compared with the initial isolates ( $P = 0.105$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  respectively; Fig. 2C). Taken together, these data suggest that the recurrent *S. aureus* isolates tended to persist in the osteoblasts for longer than the initial isolates.

### *The recurrent S. aureus isolates caused less cellular damage and tended to induce a less osteoblastic inflammatory response*

We also determined the cytotoxicities to the MC3T3 cells and human primary osteoblasts that were induced by measuring lactate dehydrogenase (LDH), which is released by damaged cells into the culture supernatant. Regardless of the osteoblasts tested, the relative LDH amounts released from the osteoblasts infected with the recurrent isolates from patients 1, 2 and 3 were significantly lower than those from the cells infected with the initial isolates within each pair [ $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  for the MC3T3 cells (Fig. S1) and  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  for the human primary cells (Fig. 2D)]. These data demonstrate that the recurrent isolates

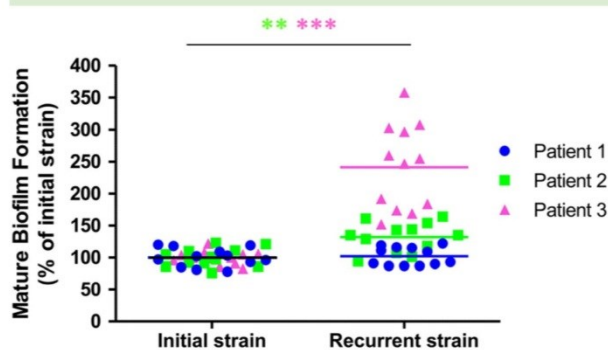
**Table 1.** Characteristics of the patients and isolates.

Patient no.	Sex, age (year)	Site of infection	Duration of symptoms (days) <sup>a</sup>	Surgical treatment	Duration of antibiotherapy (days)	Time to failure or relapse (days) <sup>b</sup>	MLST type	<i>spa</i> type
1	M, 26	Tibia osteosynthesis material	12	Material removed	82	0	ST15 (CC15)	385
2	M, 80	Total knee arthroplasty	3	Irrigation and debridement	191	10	ST25 (CC25)	78
3	F, 82	Total hip arthroplasty	3	Irrigation and debridement	98	36	ST15 (CC15)	84

<sup>a</sup> Evolution delay at the time of diagnosis of the first episode, i.e. time from orthopaedic device implantation to isolation of initial *S. aureus* strain.

<sup>b</sup> Time from antibiotic interruption to relapse/failure.

The *S. aureus* multilocus sequence typing (MLST) and the *S. aureus* protein A (*spa*) typing were performed as previously described [41,42]. M, male; F, female; ST, sequence type; MLST, multilocus sequence typing.



**Fig. 1.** Evaluation of the biofilm-forming abilities of the *S. aureus* clinical isolates. Quantification of mature biofilm formation 24 h post incubation in BHI + 1% glucose by the crystal violet staining method for the initial and recurrent isolates recovered from three different patients. All of the results are expressed as percentages of the values obtained for the initial strains. The horizontal bars denote the means derived from three independent experiments conducted in quadruplicate. The statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test.

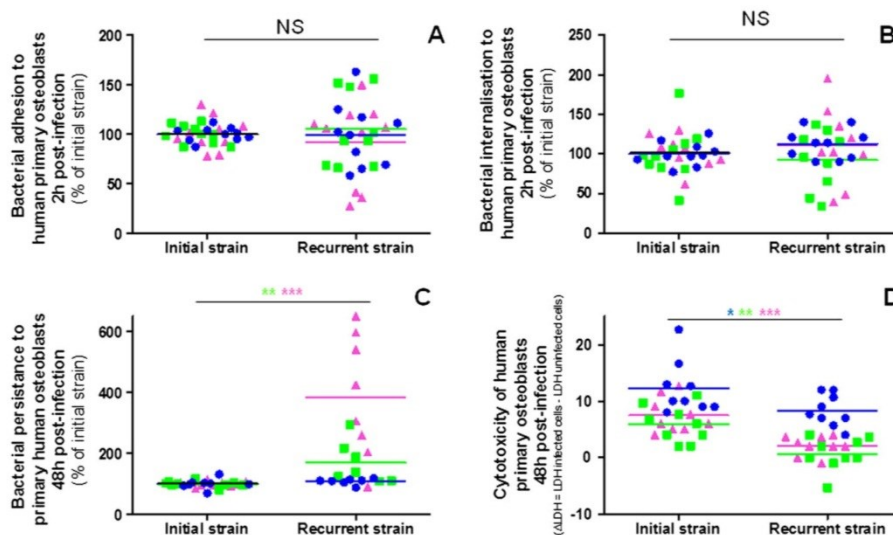
were less cytotoxic and less virulent than the initial isolates.

Following these observations, we hypothesized that the recurrent isolates induced a lower cellular activation than the initial isolates. We then analysed the cytokine release profiles in the cellular supernatant by using Luminex™

technology. Although not all of the differences were significant (using Mann–Whitney test between the initial and recurrent isolates for each patient), we observed that the recurrent isolates from all three patients induced less cytokine production for all of the tested cytokines. Depending on the tested cytokine (i.e. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-5, IL-6 and IL-4), the human osteoblasts infected with the recurrent *S. aureus* isolates secreted cytokines at levels that were 1.07- to 11.79-fold lower than those of the osteoblasts that were infected with the initial isolates (Fig. 3). Similar results were observed when the MC3T3 cells were used (data not shown). These data are indicative of a tendency towards the induction of a reduced inflammatory response by the recurrent *S. aureus* isolates compared with the initial isolates.

*The S. aureus isolates recovered from the recurrent bone and joint infections exhibited lower levels of hemolysin alpha expression*

Because it has previously been demonstrated that the secretion of bacterial virulence factors is responsible for cell death and cellular activation, we quantified the secretions of hemolysin alpha (hla) by the initial and recurrent isolates as a marker of staphylococcal virulence expression based on the capacity of hla to induce



**Fig. 2.** Comparison of the adhesion, internalization and persistence levels in osteoblasts and cytotoxicity induced by the initial and recurrent *S. aureus* isolates by using the gentamicin protection assay. Human primary osteoblasts were infected with *S. aureus* at mois of 250:1 (for 2 h at 37°C).

A. The adhesion levels to the human primary osteoblasts were estimated at 2 h post-infection.

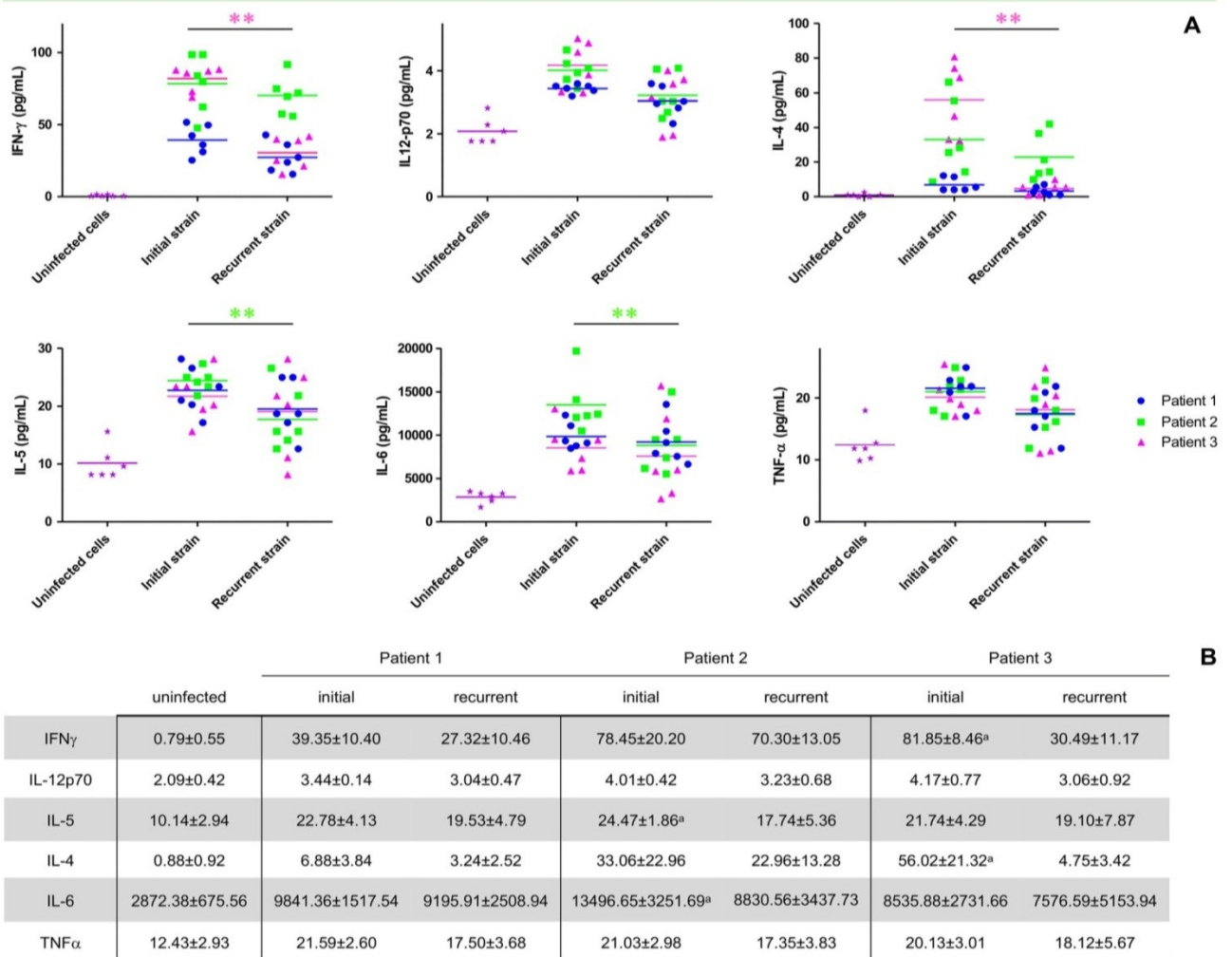
B. The invasion capacities were assessed by quantifying the viable intracellular bacterial loads at 3 h post infection after gentamicin treatment for the primary human osteoblasts.

C. The intracellular bacterial persistence capacities were estimated at 48 h post infection. All of the results are expressed as percentages of the values (cfu recovered after host cell lysis) obtained for the initial strains. The horizontal bars denote the means derived from three independent experiments conducted in triplicate.

D. Cytotoxicity was estimated by quantifying LDH release by the infected osteoblasts at 48 h post infection. The horizontal bars denote the means derived from three independent experiments conducted in triplicate. The results are expressed as the differences in LDH release between the infected and uninfected cells ( $\Delta$ LDH). The statistical analyses were performed by using the Mann–Whitney test.



## 4 S. Trouillet-Assant et al.



**Fig. 3.** Cytokine release profiles of osteoblasts infected by *S. aureus*.

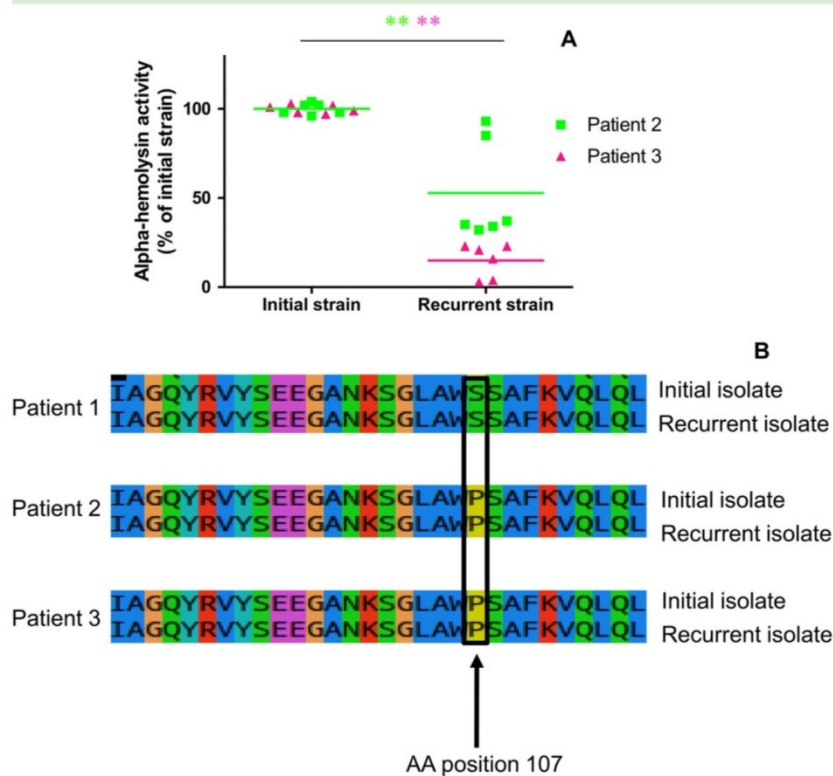
To identify the cytokine-release profiles, human primary osteoblasts were infected with initial and recurrent isolates. The supernatants were collected 2 days later, and the cytokine levels in the cell culture supernatants were quantified by using the Luminex® (ProcartaPlex™ Human Essential Th1/Th2 Cytokine Panel 6-plex, Affymetrix eBioscience®, Austria) assay. The horizontal bars denote the means derived from three independent experiments conducted in duplicate. All of the *P* values were calculated by using the Mann–Whitney test. IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor; IFN, interferon.

haemolysis. The haemolytic activities of the recurrent *S. aureus* isolates of patients 2 and 3 were 2- and 6.5-fold lower respectively than those of the initial ones ( $P < 0.01$ ; Fig. 4A). No hla activity was detected for the isolates recovered from patient 1. Thereafter, whole-genome sequencing (WGS) analysis of this locus sequence was applied to both the initial and the recurrent strains from patient 1 and revealed the presence of a non-synonymous mutation that changed the amino acid at position 107 (P → S) (Fig. 4B). This non-synonymous substitution (using *S. aureus* stain NCTC8325 as the reference) was located in the triangle region (Gouaux *et al.*, 1997; Menestrina *et al.*, 2001) within which non-synonymous substitutions affecting the amino acids at positions 110 and 152 are known to diminish the lytic activity of hla and at positions

100, 104 and 108 have also been implicated in cell lysis (Walker and Bayley, 1995).

#### *The recurrent isolates were less virulent based on two in vivo mouse models*

These *in vitro* data led us to confirm these findings *in vivo* by using two mouse models to compare the virulences of the initial and recurrent isolates that were collected from patient 3. First, the bacterial colony-forming unit (cfu) counts from the blood at 1, 3 and 24 h after the challenge revealed no difference in the bacteraemia level between the isolates recovered from the initial and recurrent BJIs using the acute intraperitoneal infection model. Nevertheless, the recurrent isolates persisted for a longer duration in the intraperitoneal compartment than the initial isolates

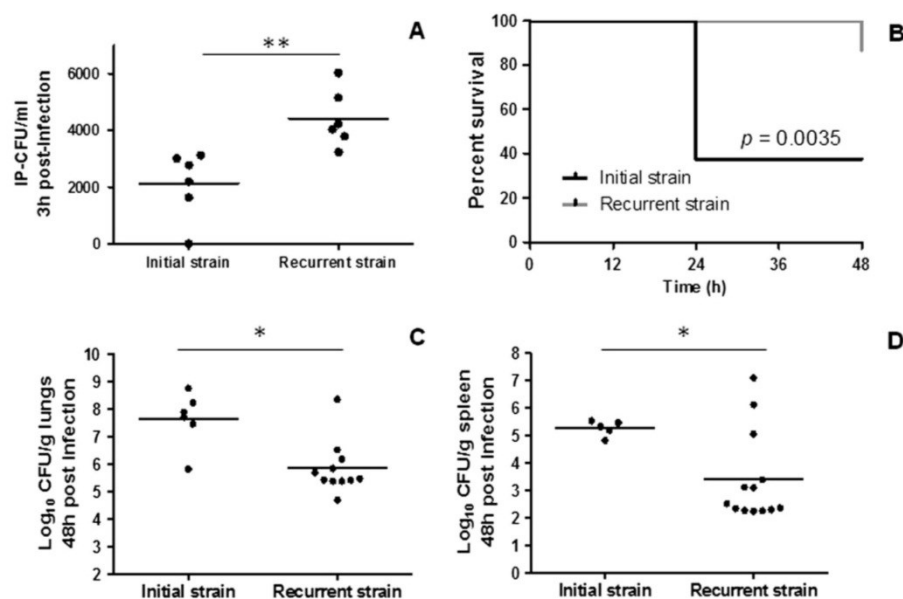
**Fig. 4.** Hemolysin alpha activity.

A. The quantification of hla production was performed by using rabbit erythrocytes and the supernatants of bacterial suspensions incubated in BHI at 37°C for 48 h. The OD<sub>450</sub> values, which are directly correlated with haemolysis, were then measured. Notably, no hla activity was detected in the isolates recovered from patient 1. All of the *P* values were calculated by using the Mann–Whitney test. The horizontal bars denote the means derived from three independent experiments conducted in duplicate.

B. Alignments of the hla protein region between amino acids 87 and 116 are shown for all three pairs of strains. The amino acids at position 107, at which a non-synonymous mutation was observed in both strains isolated from patient 1, are indicated by a black rectangle and a black arrow.

( $4,407 \pm 1,009$  vs  $2,117 \pm 1,176$  cfu ml<sup>-1</sup> respectively at 3 h post infection;  $P < 0.01$ ; Figs 5A and S2). When using the lung infection model, at 24 and 48 h post infection, the bacterial counts in the lungs and spleens of the animals challenged with the initial isolates were significantly greater than those in the organs recovered from the survivors

animals infected with recurrent isolates ( $P < 0.05$ , except for the counts in the spleen after 24 h, Figs 5B, 5C and S2). Finally, the isolates recovered from the acute initial episode of BJI caused greater mortality than the recurrent isolates as early as 24 h post infection [62% (10/16) vs 0% (0/16),  $P < 0.01$ ; Fig. 5D]. The data from both animal models

**Fig. 5.** In vivo models of intraperitoneal infection and lung infection mimicking pneumonia in mice.

Intraperitoneal infection model. A. CD-1 female mice were intraperitoneally inoculated with  $5 \times 10^6$  cfus per mouse in 0.5 ml of PBS. After 3 h, the mice were sacrificed, and 4 ml of PBS was intraperitoneally injected to recover the surviving bacteria. Bacterial quantification was performed by plate counting. The horizontal bars represent the means. Lung infection model.

D. Six-week-old RjOrl:SWISS mice were infected transtracheally with 75  $\mu$ l of a bacterial suspension of  $10_9$  cfu ml. B. The survival of the mice over 48 h following intratracheal inoculation is expressed as percentages from three independent experiments (each group,  $n = 8$ ).

C. D. Bacterial loads in the lungs and spleen were estimated by plate counting 48 h post infection. The black lines denote the means. Significant differences were obtained by using the Mann–Whitney test.

## 6 S. Trouillet-Assant et al.

suggest that the *S. aureus* isolate recovered from the recurrent infection was less virulent than the isolate collected during the initial infection.

*Genomic comparisons of the initial and recurrent S. aureus isolates recovered from the same patients revealed no significant differences*

We were next interested in exploring the molecular mechanisms responsible for *in vivo* and *in vitro* changes observed with the recurrent *S. aureus* isolates. We aimed to determine whether these mechanisms could be related to the presence of specific mutations or the accumulation of mutations in specific genomic regions, including virulence genes, gene expression regulators and regulatory regions. For this purpose, we performed WGS of the three pairs of isolates and performed intrapatient comparisons of the genomes (Table S2). The genome sizes with the pairs were nearly identical with the exception of the isolates from patient 3, in which a plasmid was lost in the recurrent isolate. This plasmid, also recovered in CC15 pairs of patients 1, carries 23 open reading frames

(ORFs), among which we identified resistance genes to antibiotics (*bla* operon) and heavy metals (cadmium) and a bacteriocin operon.

Totals of nine, eight and six variants (SNPs and/or insertion–deletions) were identified within the pairs obtained from patients 1, 2 and 3 respectively (Table 2). Only a low number of these variants occurred in coding DNA sequences (CDSs), but all of the impacted CDS and intergenic regions varied across the different pairs. Notably, we did not find any variants that affected the major regulatory systems that are known to control the expression of virulence in *S. aureus* (Table S3).

### Discussion

In this study, we investigated whether the prolonged contact of clinical *S. aureus* isolates with human hosts during the progression from acute to chronic BJIs led to bacterial adaptations that modified the virulence phenotype and/or genotype of *S. aureus*. For this, three pairs of isolates collected from three patients with recurrent MSSA

**Table 2.** Variants identified for the three couples of initial and recurrent isolates.

Patient	Location	Nucleotide position (initial isolate)	Variant	Initial isolate	Recurrent isolate	Genomic context	Protein	Changes in protein
1	chr	2124297	SNP (synonymous)	A	T	Intragenic (locus 2183)	DeoC	None
	chr	2135204	SNP	A	G	Intergenic	nap	nap
	chr	2292532	SNP	C	T	Intergenic	nap	nap
	chr	2292604	SNP	T	G	Intergenic	nap	nap
	chr	2292613	SNP	T	A	Intergenic	nap	nap
	chr	2292623	SNP	G	A	Intergenic	nap	nap
	chr	2483885	SNP (non-synonymous)	C	T	Intragenic (locus 3936)	Hypothetical protein	Glu → Lys
	chr	2484200	SNP (non-synonymous)	A	G	Intragenic (locus 3936)	Hypothetical protein	Trp → Arg
	chr	2484215	SNP (non-synonymous)	T	C	Intragenic (locus 3936)	Hypothetical protein	Thr → Ala
2	chr	1026283	SNP	T	C	Intergenic	nap	nap
	chr	1026318	SNP	G	A	Intergenic	nap	nap
	chr	1945070	SNP	C	A	Intergenic	nap	nap
	chr	2210965	SNP	G	A	Intergenic	nap	nap
	chr	2302808	SNP	T	A	Intergenic	nap	nap
	chr	2302809	SNP	A	T	Intergenic	nap	nap
	chr	962982	Indel	T	–	Intragenic (locus 4177)	comK	Frameshift
	chr	1487044	SNP (non-synonymous)	G	A	Intragenic (locus 4679)	Hypothetical protein	Pro → Leu
3	chr	234389	SNP	G	A	Intergenic	nap	nap
	chr	255401	SNP	T	C	Intergenic	nap	nap
	chr	272577	Indel	TGAT	–	Intragenic (locus 3764)	EssC	Frameshift
	chr	1040917	Indel	TGAT	–	Intragenic (locus 1060)	GTP-binding protein, TypA/BipA-like protein	Frameshift
	chr	1591517	Indel	–	GACC	Intragenic (locus 1616)	Uridine kinase	Frameshift
	chr	1839176	SNP (non-synonymous)	A	G	Intergenic (pseudogene 4150)	Membrane-associated protein	STOP → W

All variants occurring in CDSs were validated by PCR and subsequent Sanger sequencing. When non-synonymous substitutions occurred, the amino acids are indicated using the three-letters IUPAC abbreviations. nap, not applicable; –, absence; chr, chromosomal

BJI at the time of the initial diagnosis and the time of relapse were compared in various *in vitro* and *in vivo* models.

*In vivo*, biofilm formation is classically associated with treatment failure, notably in the case of foreign material-related infections (McConoughey *et al.*, 2014). Here, we demonstrated that the isolates collected from patients 2 and 3 during the chronic phase of BJI exhibited an increased capacity to form mature biofilm compared with the respective strains collected during the initial phase of infection. For patient 1, the capacity to form mature biofilms did not vary between the acute and recurrent isolates, which suggests that the adaptations for the chronicity of *S. aureus* depend on the host and/or isolate. Interestingly, although all three patients presented orthopaedic device-associated infections, only patient 1 had undergone material removal at the time of the initial infection. This observation may suggest that the persistence of material could play a role in the adaptive response of *S. aureus* towards increased biofilm formation. Studies comparing pairs of isolates collected from patients with recurrent BJIs with and without abiotic materials are required.

Several authors have suggested that the life of *S. aureus* in the intracellular compartment is part of the long-term infection process (von Eiff *et al.*, 2006). Our data revealed no differences between the initial and recurrent isolates in terms of their abilities to adhere to and invade osteoblasts. These results are in line with those reported by Kalinka *et al.* (2014), who compared a set of *S. aureus* isolates collected from patients suffering from acute infection with isolates collected from other patients who experienced BJI relapses. We demonstrated that the isolates recovered from recurrent BJIs exhibited the following characteristics compared with the isolates collected from the same patients during the acute phase: (i) they persisted intracellularly for much longer, (ii) they induced a lower level of cellular death and (iii) they induced less severe host cellular activation as reflected by cytokine release. This is in line with the data that we also obtained for biofilm data and suggest that a phenotypic *in vivo* adaptation of the initial isolates occurs during their 'stay' in the host cells. Interestingly, these original data are in agreement with our previous findings based on hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates and MSSA isolates from acute or chronic BJIs, which demonstrated that interactions between osteoblasts and *S. aureus* are a major physiopathological mechanism in the clinical presentation of BJIs (Rasigade *et al.*, 2013; Valour *et al.*, 2015).

Furthermore, two *in vivo* models were used to test one of the three pairs of clinical isolates and highlighted the diminished virulence of the isolate recovered from the recurrent BJI compared with the initial isolate. The

intraperitoneal infection model revealed that the recurrent isolate persisted longer in the peritoneum. By using this model, Cohn (1962) demonstrated that the reduction of viable bacteria in the intraperitoneal cavity is related to phagocytosis and the intracellular killing of bacteria caused by the local attraction of leucocytes to the peritoneum. In this model, the greater persistence of the recurrent isolates observed in our model was possibly related to a diminished ability to stimulate the immune system and be recognized by immune cells. The lung infection model that mimics pneumonia definitively demonstrated that the recurrent isolates were less virulent based on the bacterial counts in the lung and spleen and the mortality rates.

To our best knowledge, this is the first study to demonstrate the adaptive phenotypes of isolates recovered from the same patients during the progression of BJI. One of the limits of the present study was the low number of tested isolates, which was a result of the difficulty of obtaining isolates responsible for both the initial and chronic phases of infection from the same patients. Experiments with more pairs of isolates should be performed to reinforce our conclusions. Despite these limitations, our data clearly highlight the adaptations of *S. aureus* during the course of the chronicization of BJIs. The variation in the intensity of this adaptation across the pairs of isolates is likely related to intraindividual bacterial variability, the variable delay between the initial and recurrent infections and the differential management of the patient (as illustrated for patient 1 with material removal).

Taken together, these *in vivo* and *in vitro* data reveal that prolonged contact of *S. aureus* with the human microenvironment induces profound and stable bacterial adaptations that lead to a decrease in virulence. These adaptations can occur because of environmental pressures within the bone, such as inflammatory responses, hypoxia, nutrient deficiency, osmolarity, low pH, intracellular factors, biofilm and antibiotic therapies. Notably, despite antibiotic treatment over several months, all of the recurrent isolates harboured the same antibiotic susceptibility profiles and minimum inhibitory concentrations than initial isolates. These data suggest that the bacterial adaptive phenomenon does not affect and is not affected by the level of antibiotic resistance.

In addition to BJI, only a few studies have reported *S. aureus* adaptations over the course of human chronic infectious diseases. One such study applied comparative genome sequencing to three *S. aureus* isolates that were obtained sequentially over 26 months from the airway of a cystic fibrosis patient and revealed variations in phage content and genetic polymorphisms in genes that influence antibiotic resistance and the global regulation of virulence (McAdam *et al.*, 2011). The identified genetic

variations correlated with differences in growth rate, haemolytic activity and antibiotic sensitivity, which implies a profound effect on the ecology of *S. aureus*. Specifically, a high rate of often non-synonymous mutations and multiple independent indel polymorphisms affected the activity of SigB, which is a staphylococcal alternate transcription factor that is involved in the stress response. Similar observations were also reported by Tuchscherer *et al.* (2015) in BJI animal models, which suggests that SigB could be a key player in adaptation in chronic infections. However, the genomic comparisons between the initial and recurrent isolates conducted in our study revealed no significant changes in the core genome. Specifically, no mutations were observed in SigB or its operon or in any of the main regulators of *S. aureus*. Additionally, our results suggest that the adaptation to chronicity in the context of BJIs is not a result of the accumulation of specific or shared mutations in any other genes associated with the expression of virulence.

Interestingly, the number of identified mutations was limited, which excludes the hypothesis of the selection of a hypermutator subpopulation that might have allowed for rapid genetic adaptation. Moreover, in the three pairs of isolates, the non-synonymous substitutions and indels in the protein-coding regions affected different pathways. In view of the diversity and/or lack of predicted functions of the genes that were affected in the three pairs, it is highly unlikely that these mutations correspond to a phenotypic convergence that allows for a switch to a chronic bacterial pattern. Nevertheless, only experimental validation of the influences of these genetic changes on the chronicity phenotype in isogenic isolates will allow us to reach a definitive conclusion.

In light of our results, an alternative scenario is that in the context of BJIs, the phenotypic changes that led to the decreased virulence of the isolates involved in recurrence/relapse might have been a result of regulation at the transcriptomic/proteomic levels. This hypothesis is supported by recent observations reported by our group that revealed the roles of non-coding RNA in bacterial persistence and decreases in virulence (Romilly *et al.*, 2014). Nevertheless, further studies investigating the roles of the host response and/or bacterial epigenetic factors in the regulation of virulence in the context of chronic BJIs are underway.

To conclude, the present study using clinical isolates demonstrated that *S. aureus* possesses a plethora of resources for adapting to the novel stressful environment encountered during the infection of humans. Our results demonstrate that *S. aureus* isolates involved in BJI are able to modify *in vivo* their phenotype including intraosteoblastic behaviours and ability to form biofilm to constitute bacterial reservoir, leading to chronicity and relapse. Our study encourages the use and development

of therapeutic strategies targeting intracellular and biofilm-embedded bacteria to avoid or eradicate chronic BJIs.

## Experimental procedures

### Ethics statement

All animal work was approved by the Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4 (CECCAPP) under identification no. ENS\_2014\_027. The clinical portion of this study was conducted with the approval of the French South-East ethics committee (no. CAL2013-018 and no. CAL2011-21 for collections of human primary osteoblasts and clinical isolates respectively). In accordance with the French legislation, written informed patient consent was not required for any part of the study.

### Patient selection

Three patients with persisting or relapsing MSSA BJIs were included in this study. The data related to clinical characteristics, time to relapse or failure of treatment and surgical and antibiotic treatments are summarized in Table S1. Antimicrobial susceptibility tests were performed by using the disc diffusion method or the E-test<sup>®</sup> method for glycopeptides, penicillin G and oxacillin (Table S1) and revealed no differences between the initial and recurrent strains in any patient.

### Biofilm formation

Mature biofilm formation was quantified by using the tissue culture plate method with crystal violet as previously described (Valour *et al.*, 2013). This method allows for the semiquantitative measurement of mature biofilms (Stepanovic *et al.*, 2007) (Supporting Information).

### Infection of osteoblasts with *S. aureus*

Murine osteoblast-like cells [MC3T3, CRL-2593<sup>™</sup> purchased from LGC Standards (Teddington, UK)] and human primary osteoblasts were infected (2 h, 37°C) at multiplicities of infection (MOI) of 50:1 and 250:1 respectively to allow for the adhesion and internalization of the bacteria. Next, we used the gentamicin protection assay to select the intracellular bacteria as previously described (Trouillet *et al.*, 2011). Cytotoxicity, inflammatory responses, bacterial adhesion, internalization and intracellular persistence were then evaluated (Supporting Information).

### Hemolysin alpha production

Hemolysin alpha production was determined by using rabbit erythrocytes as described by Qiu *et al.* (2010) with modification. Briefly, *S. aureus* isolates were cultured in brain-heart infusion (BHI; 37°C, 48 h). The bacterial samples were centrifuged (5 min, 3000 r.p.m.), and 200 µl of the culture supernatant at serial dilution was mixed with rabbit erythrocytes (2% PBS). After incubation for 60 min at 37°C, the samples were centrifuged (2000 r.p.m., 5 min), and the OD<sub>450</sub> values of the supernatants were measured.

### Mouse intraperitoneal and lungs infection models

Female CD-1 mice (8 to 10-week old) were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, USA). Groups of six mice were intraperitoneally inoculated with  $5 \times 10^6$  cfu per mouse in 0.5 ml of PBS. After 1 and 3 h, the mice were sacrificed, and 4 ml of PBS was intraperitoneally injected to recover the surviving bacteria. Blood samples were also collected via intracardiac puncture into heparinized tubes. The bacterial quantification was performed by plate counting.

Six-week-old RjOrl:SWISS mice (20–24 g) were purchased from Janvier Laboratories (Le-Genest-Saint-Isle, France). Pneumonia was induced after inoculation of 75  $\mu$ l of a bacterial suspension adjusted to  $10^9$  cfu ml<sup>-1</sup> as previously described (Roquilly *et al.*, 2010) (Supporting Information).

### Genome sequencing and comparative genomics

The DNA extractions were performed by using the QIAcube R automated system (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The libraries were prepared according to the Ion Xpress™ Plus genomic DNA fragment library preparation protocol. The libraries were sequenced on an Ion 318™ Chip v2 by using an Ion PGM™ system. Details concerning assembly and annotation, SNP analysis in intragenic as well as intergenic regions and detection of the presence/absence of ORFs are available in Supporting Information.

### Statistical analyses

Differences in the quantitative data between the initial and relapse-associated isolates were analysed independently for each patient with the two-tailed Mann–Whitney *U*-test. Because of the exploratory nature of the work, no correction for multiple hypothesis testing was applied.

### Accession numbers

This whole-genome shotgun sequencing project has been deposited in DNA Data Bank of Japan/European Molecular Biology Laboratory/Genbank (DDBJ/EMBL/GenBank) under genome accession IDs CP012970–CP012980.

### Acknowledgements

We thank Sacha Flammier for her excellent technical expertise. This research was funded by scientific grants from the Association des Biologistes de l'Ouest (ABO 2013-03), the Fondation pour la Recherche Médicale (ING20111223510) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/202.903/2015 – CNE). The funders had no role in the study design, data collection and interpretation or the decision to submit the work for publication.

### Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

### References

- Bosse, M.J., Gruber, H.E., and Ramp, W.K. (2005) Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis: a case report. *J Bone Joint Surg Am* **87**: 1343–1347.
- Brady, R.A., Leid, J.G., Calhoun, J.H., Costerton, J.W., and Shirliff, M.E. (2008) Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 13–22.
- Cohn, Z.A. (1962) Determinants of infection in the peritoneal cavity: I. response to and fate of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* in the mouse. *Yale J Biol Med* **35**: 12–28.
- Conlon, B.P. (2014) *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. *Bioessays* **36**: 991–996.
- Ellington, J.K., Harris, M., Webb, L., Smith, B., Smith, T., Tan, K., and Hudson, M. (2003) Intracellular *Staphylococcus aureus*: a mechanism for the incidence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* **85**: 918–921.
- Ellington, J.K., Reilly, S.S., Ramp, W.K., Smeltzer, M.S., Kellam, J.F., and Hudson, M.C. (1999) Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* **26**: 317–323.
- Gouaux, E., Hobaugh, M., and Song, L. (1997) Alpha-hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci* **6**: 2631–2635.
- Greer, R.B., and Rosenberg, A.E. (1993) Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 6-1993. A 69-year-old woman with a sclerotic lesion of the femur and pulmonary nodules. *N Engl J Med* **328**: 422–428.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**: 1034–1043.
- Hudson, M.C., Ramp, W.K., Nicholson, N.C., Williams, A.S., and Nousiainen, M.T. (1995) Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* **19**: 409–419.
- Jevon, M., Guo, C., Ma, B., Mordan, N., Nair, S.P., Harris, M., *et al.* (1999) Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* **67**: 2677–2681.
- Kahl, B., Herrmann, M., Everding, A.S., Koch, H.G., Becker, K., Harms, E., *et al.* (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **177**: 1023–1029.
- Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D., Hansen, U., Niemann, S., *et al.* (2014) *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int J Med Microbiol* **304**: 1038–1049.
- Löffler, B., Tuchscher, L., Niemann, S., and Peters, G. (2014) *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int J Med Microbiol* **304**: 170–176.
- McAdam, P.R., Holmes, A., Templeton, K.E., and Fitzgerald, J.R. (2011) Adaptive evolution of *Staphylococcus aureus* during chronic endobronchial infection of a cystic fibrosis patient. *PLoS One* **6**: e24301.

- McConoughey, S.J., Howlin, R., Granger, J.F., Manring, M.M., Calhoun, J.H., Shirtliff, M., et al. (2014) Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol* **9**: 987–1007.
- Menestrina, G., Serra, M.D., and Prevost, G. (2001) Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* **39**: 1661–1672.
- Osmon, D.R., Berbari, E.F., Berendt, A.R., Lew, D., Zimmerli, W., Steckelberg, J.M., et al. (2013) Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **56**: e1–e25.
- Proctor, R.A., von Eiff, C., Kahl, B.C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., and Peters, G. (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* **4**: 295–305.
- Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Jiang, Y., Xia, L., et al. (2010) Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One* **5**: e9736.
- Rasigade, J.P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., Diep, B.A., Sapin, A., Lhoste, Y., et al. (2013) PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS One* **8**: e63176.
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., et al. (2014) A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **10**: e1003979.
- Roquilly, A., Gautreau, L., Segain, J.P., de Coppet, P., Sebille, V., Jacqueline, C., et al. (2010) CpG-ODN and MPLA prevent mortality in a murine model of post-hemorrhage-*Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS One* **5**: e13228.
- Sanchez, C.J., Jr., Ward, C.L., Romano, D.R., Hurtgen, B.J., Hardy, S.K., Woodbury, R.L., et al. (2013) *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro. *BMC Musculoskelet Disord* **14**: 187.
- Sendi, P., Rohrbach, M., Graber, P., Frei, R., Ochsner, P.E., and Zimmerli, W. (2006) *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis* **43**: 961–967.
- Sheehy, S.H., Atkins, B.A., Bejon, P., Byren, I., Wyllie, D., Athanassou, N.A., et al. (2010) The microbiology of chronic osteomyelitis: prevalence of resistance to common empirical anti-microbial regimens. *J Infect* **60**: 338–343.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., and Ruzicka, F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **115**: 891–899.
- Stevens, Q.E., Seibly, J.M., Chen, Y.H., Dickerman, R.D., Noel, J., and Kattner, K.A. (2007) Reactivation of dormant lumbar methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis after 12 years. *J Clin Neurosci* **14**: 585–589.
- Tande, A.J., and Patel, R. (2014) Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev* **27**: 302–345.
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G., Jr. (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* **28**: 603–661.
- Trouillet, S., Rasigade, J.P., Lhoste, Y., Ferry, T., Vandenesch, F., Etienne, J., and Laurent, F. (2011) A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods* **86**: 145–149.
- Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S.M., Noto Llana, M., Pfortner, H., Niemann, S., et al. (2015) Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. *PLoS Pathog* **11**: e1004870.
- Tuchscher, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., et al. (2010) *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis* **202**: 1031–1040.
- Valour, F., Bouaziz, A., Karsenty, J., Ader, F., Lustig, S., Laurent, F., et al. (2014) Determinants of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* native bone and joint infection treatment failure: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis* **14**: 443.
- Valour, F., Rasigade, J.P., Trouillet-Assant, S., Gagnaire, J., Bouaziz, A., Karsenty, J., et al. (2015) Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin Microbiol Infect* **21**(6): 568.e1–568.e11.
- Valour, F., Trouillet-Assant, S., Rasigade, J.P., Lustig, S., Chanard, E., Meugnier, H., et al. (2013) *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One* **8**: e67240.
- von Eiff, C., Bettin, D., Proctor, R.A., Rolauffs, B., Lindner, N., Winkelmann, W., and Peters, G. (1997) Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin Infect Dis* **25**: 1250–1251.
- von Eiff, C., Peters, G., and Becker, K. (2006) The small colony variant (SCV) concept – the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* **37**(Suppl 2): S26–S33.
- Walker, B., and Bayley, H. (1995) Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J Biol Chem* **270**: 23065–23071.
- Wieland, B.W., Marcantoni, J.R., Bommarito, K.M., Warren, D.K., and Marschall, J. (2012) A retrospective comparison of ceftriaxone versus oxacillin for osteoarticular infections due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **54**: 585–590.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Fig. S1.** Comparison of the adhesion, internalization and persistence levels in osteoblasts' and host cells' damage induced by the initial and recurrent *S. aureus* isolates by using the gentamicin protection assay.

**Fig. S2.** *In vivo* models of intraperitoneal infection and lung infection mimicking pneumonia in mice.

## 4.2 Deuxième article: Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection.

Journal of Medical Microbiology (2015), 64, 1021–1026

DOI 10.1099/jmm.0.000125

### Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection

Claire Marquès,<sup>1,2</sup> Jason Tasse,<sup>3,4</sup> Anne Pracros,<sup>2</sup> Valérie Collin,<sup>1</sup> Christine Franceschi,<sup>1</sup> Frédéric Laurent,<sup>3,4</sup> Sonia Chatellier<sup>1</sup> and Christiane Forestier<sup>2</sup>

Correspondence  
Christiane Forestier  
Christiane.forestier@udamail.fr

<sup>1</sup>bioMérieux SA, 38390 La Balme-les-Grottes, France

<sup>2</sup>Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup>Department of Clinical Microbiology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup>INSERM U1111, International Center for Research in Infectiology, University of Lyon 1, UMR CNRS 5308, Lyon, France

Treatment of orthopaedic infections remains challenging owing to the inability of antibiotics to eradicate biofilms and prevent their regrowth. The present study characterized the effects of 12 antibiotics on *in vitro* biofilm formed by a representative strain of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from a bone infection. Determination of the minimum biofilm eradication concentrations indicated that *in vitro* eradication of 24 h-old biofilms required concentrations up to 51 200 times higher than MICs. The influence of the same panel of antibiotics was also investigated on biofilm formation at concentrations including the breakpoints, by numbering viable cells in the suspensions (individual cells) and the biofilm biomass. Except for fusidic acid, the presence of antibiotics during the initial steps of biofilm formation resulted in significant decreases in the number of sessile viable bacteria at the highest concentrations tested. Ceftarolin, daptomycin, fosfomycin, gentamicin, ofloxacin, rifampicin and vancomycin were the most effective drugs. Confocal microscopy analysis indicated that daptomycin was more efficient at bacteria lysis than gentamicin and vancomycin. However, viable individual cells were still detectable in the assays performed with ceftarolin, fosfomycin, ofloxacin, rifampicin and vancomycin at concentrations for which no sessile cells were detected. Although none of the molecules tested was effective at classical therapeutic concentrations against 24 h-old MSSA biofilms, all except fusidic acid were able to impair biofilm formation at concentrations near the breakpoints. However, presence of viable individual unattached cells could imply a significant risk of microbial dissemination and increased risk of infections.

Received 21 April 2015

Accepted 3 July 2015

### INTRODUCTION

Orthopaedic joint replacement is an increasingly common surgical procedure worldwide, sometimes complicated by the advent of prosthetic joint infections (PJIs), which entail major morbidity (Darouiche, 2004). PJIs are mainly caused by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (Del Pozo & Patel, 2009). The prevalence of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and methicillin-

resistant *S. aureus* (MRSA) can vary highly from one hospital to another, but overall in European countries, including France, *S. aureus* accounts for 13–44.1 % of PJIs, with the majority being MSSA (Titécot *et al.*, 2013; Aggarwal *et al.*, 2014). All species are known to form biofilm on the implants, which impairs the action of antibiotics and immune cells. These mechanisms are major sources of persistent infections.

The high resistance of biofilm bacteria to antibiotics was initially attributed to reduced drug penetration into the biofilm core caused by a physical barrier formed of extracellular polymeric substances (Suci *et al.*, 1994). However, reduced bacterial growth rate, active starvation response and changes in bacterial gene expression also contribute

Abbreviations: CC, clonal complex; CLSI, Clinical and Laboratory Standard Institute; MBC, minimum bactericidal concentration; MBEC, minimum biofilm eradication concentration; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; PJI, prosthetic joint infection; MIC, minimal inhibitory concentration.



to biofilm resistance (Evans *et al.*, 1990; Mah *et al.*, 2003; Zhang & Mah, 2008; Nguyen *et al.*, 2011). This inherent resistance makes biofilm-associated infections very difficult to overcome (Stewart & Costerton, 2001; Donlan & Costerton, 2002).

Sub-MICs of antibiotics such as  $\beta$ -lactam antibiotics have been shown to induce biofilm formation by MSSA (Ng *et al.*, 2014), so that bacterial cells may become buried deep within biofilms during the course of routine antibiotic therapy (Odenholt, 2001; Singh *et al.*, 2010).

The choice of antibiotic therapy is currently based on data obtained by methods using planktonic bacteria, which are not representative of biofilm bacteria. The present study aimed to determine the drug concentrations required to eradicate *in vitro* *S. aureus* biofilm and/or to inhibit biofilm formation using a representative clinical strain of MSSA isolated from a bone infection.

## METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** Thirty strains of MSSA isolated from patients with monomicrobial PJIs and hospitalized in Lyon, France, were initially characterized. Among these, strain LYO-S2 was isolated in 2001 from a patient suffering from a PJI after total knee arthroplasty. The PJI was classified as early (time from arthroplasty to symptoms <3 months) or chronic (time from initiation of symptoms to diagnosis >4 weeks). A two-stage revision of infected knee arthroplasty was performed. Initial treatment consisted of cefotaxime (6 g day<sup>-1</sup>) and vancomycin (2 g day<sup>-1</sup>) for 4 days, followed by oxacillin (12 g day<sup>-1</sup>) and fosfomycin (12 g day<sup>-1</sup>) for 55 days. Ofloxacin (400 mg day<sup>-1</sup>) and pristinamycin (4 g day<sup>-1</sup>) were then orally administered for 88 days. The outcome was favourable during 3-year clinical follow-up. All isolates were stored at -80 °C in trypticase soy (TS, Oxoid) broth containing 15 % glycerol (v/v). They were subcultured onto Columbia agar (bioMérieux) at 37 °C for 18–24 h.

The molecular characterization of the isolates was performed using a DNA microarray (*S. aureus* genotyping – Identibac; Alere Technologies) according to the manufacturer's instructions. The Ridom Staph type standard protocol and the Ridom *SpaServer* (<http://www.ridom.com>) were used for *spa* typing.

*S. aureus* ATCC 29213 was used as a quality control strain for MIC. Bacteria were grown on Mueller–Hinton (MH) and TS agar (Conda), and in MH (Conda) and modified MH (mMH) (bioMérieux) broth.

The panel of antibiotics used comprised ceftarolin (Forest Laboratories), daptomycin (Novartis), fosfomycin (Ercros), gentamicin (Unipex), fusidic acid, erythromycin, oxacillin, rifampicin (Sigma-Aldrich), linezolid (Pharmacia & Upjohn), ofloxacin (MP Biomedicals), pristinamycin (Aventis Pharma) and vancomycin (Alpharma).

**MIC and minimum bactericidal concentration (MBC) determination.** MICs were determined as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). MBCs were determined by subculturing broth dilutions of the MIC assay on TS agar.

**Determination of minimum biofilm eradication concentration (MBEC).** MBECs corresponded to the lowest concentrations giving rise to a negative subculture from 24 h-old biofilm. MBECs were determined using MBEC<sup>TM</sup> high-throughput assay plates (Innovotech) according to the manufacturer's instructions.

**Effect of antibiotics on early biofilm formation.** Biofilms were formed on polystyrene pegs of the MBEC device using a bacterial inoculum of  $8 \times 10^5$  c.f.u. ml<sup>-1</sup> in mMH broth containing twofold dilutions of antibiotics. After 4 h of incubation at 37 °C with shaking (4 rocks min<sup>-1</sup>), viable bacteria from the suspensions (individual unattached cells or cells shed from the surface of the biofilm) were enumerated by plating serial dilutions on TS agar. In parallel, biofilms formed on the pegs were rinsed with saline and transferred to new microtitre plates, and the number of sessile viable cells was counted after sonication (10 min at room temperature) by plating serial dilutions on TS agar.

**Biofilm confocal microscopy analysis.** The effects of antibiotics on biofilm formation were observed on biofilms formed on glass strips (Fisher Scientific) in a 24-well polystyrene microtitre plate

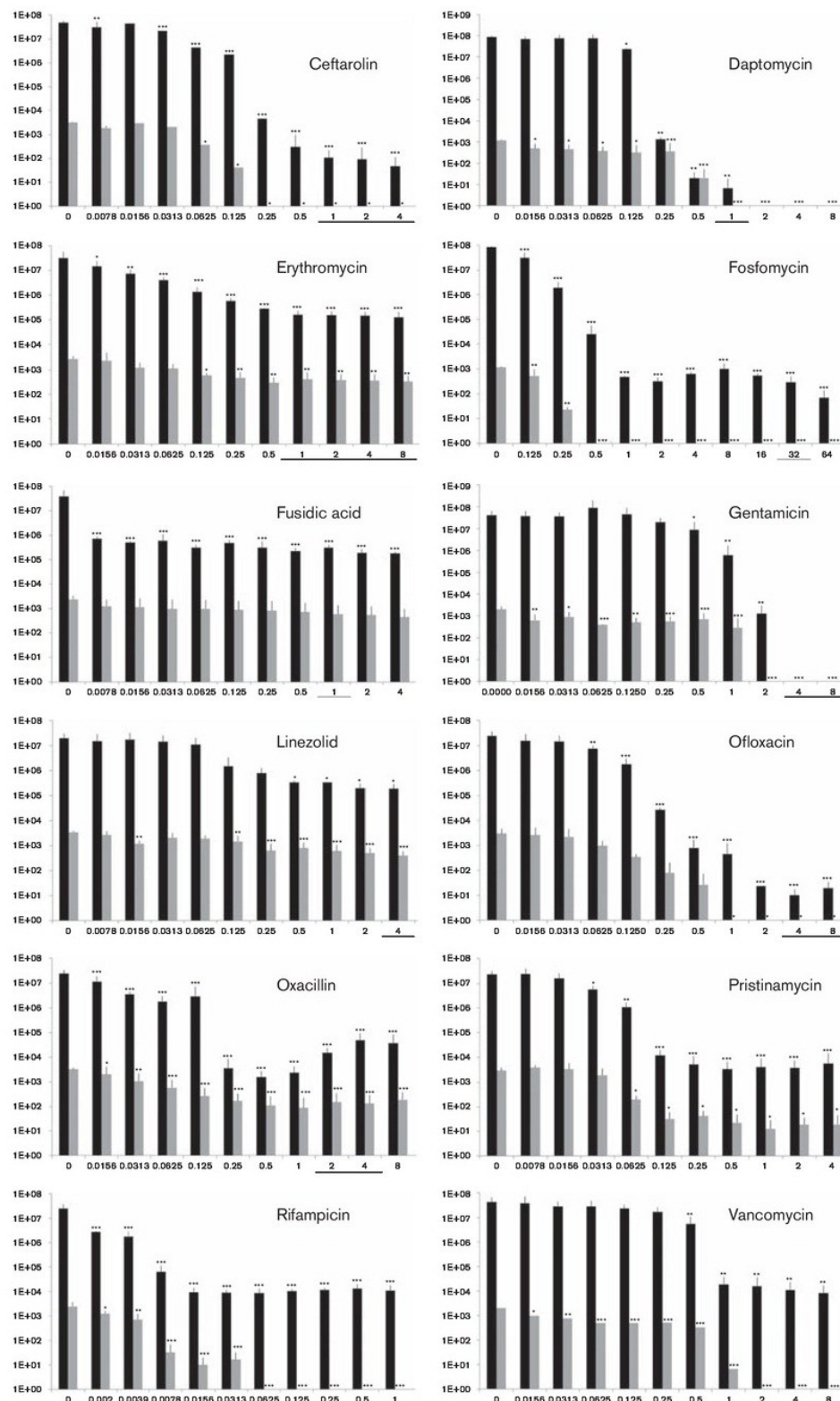
**Table 1.** *In vitro* antibacterial and antibiofilm activities of antibiotics against *S. aureus* strain LYO-S2

ND, Not defined.

Antibiotic	MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )*	MBC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	MBEC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )†
Ceftarolin	0.25	0.25	6400
Daptomycin	0.25	1	>25 600
Erythromycin	1	>16	6400
Fosfomycin	4	ND	>25 600
Fusidic acid	0.25	>64	1600
Gentamicin	1	8	6400
Linezolid	1	>128	6400
Ofloxacin	0.25	2	12 800
Oxacillin	0.5	>64	25 600
Pristinamycin	0.5	>8	400
Rifampicin	0.016	1	40
Vancomycin	2	2	3200

\*The MIC values of the antibiotics against *S. aureus* ATCC 29213 were within the CLSI accuracy range.

†The MBEC determinations were obtained using 24 h-old biofilm.



**Fig. 1.** Enumeration of viable bacteria within biofilms formed by *S. aureus* strain LYO-S2 (grey) and in the biofilm supernatants (black) in the presence of 12 antibiotics at different concentrations after 4 h incubation. Antibiotic concentrations ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) are indicated along the *x*-axes and cell viability along the *y*-axes (c.f.u.  $\text{ml}^{-1}$ ; threshold 10 c.f.u.  $\text{ml}^{-1}$ ). Each determination was performed three times. The significant differences between c.f.u.  $\text{ml}^{-1}$  values were calculated using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. Significant differences: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . The horizontal bars below the concentration scale indicate the breakpoints as defined by the CLSI (black) or the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (grey). Results are shown as means  $\pm$  SEM.

(Becton Dickinson) containing mMH and antibiotics (vancomycin, 0.125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 0.0625 MIC; gentamicin, 0.125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 0.125 MIC; daptomycin, 0.0625  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 0.125 MIC). Briefly, each well, containing  $10^7$  bacterial cells with or without antibiotics (control), was incubated for 24 h at 37 °C with shaking. For daptomycin, the mMH was supplemented with calcium (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

To assess the effect of the same molecules on 24 h-old biofilm, 24 h-old biofilms formed without antibiotic were further incubated for 24 h in the presence of antibiotics at concentrations below the MBECs.

Prior to image acquisition, each biofilm was fluorescently labelled with the Live/Dead Fixable Dead Cell Stain kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and fixed with formaldehyde, 4 % (v/v) (Acros Organics). Observations were made using the motorized stage of a Leica SPE confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems) at the ICCF platform (<https://www.gred-clermont.fr/directory/platform/fr/plate-forme-dimagerie-confocale/>). All biofilms were scanned at 400 Hz with a  $\times 40$ , 1.15 N.A. glycerol immersion objective lens equipped with a 488 nm laser set. Images were visualized with Imaris software (version 7.6.5).

**Statistics and reproducibility of results.** All assays were made in triplicate. Data were compared using Dunnett's test and expressed as mean  $\pm$  SE. *P* values of  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

Among the 30 strains characterized by determination of their clonal complex (CC), seven belonged to CC45, and the other isolates were distributed over CC5 (six isolates), CC30 (six isolates), CC15 (four isolates) and minor CCs. Twelve isolates harboured an *agr-1* allele, whereas *agr-2*, *agr-3* and *agr-4* alleles were detected in ten, seven and one isolates, respectively. Regarding the presence of antibiotic resistance genes, the *bla* operon and *fosB* were detected in the majority of the isolates (22 and 18, respectively) and four of them harboured *ermC*. Numerous genes encoding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules were also detected, including *fnbA*, *sdrC*, *sdrA* and the *ica* operon. All strains were able to form biofilm (data not shown) and further experiments were carried out with an isolate chosen from among the most common type, i.e. strain LYO-S2 (CC45 and *agr-1* allele).

The MICs of the 12 tested antibiotics ranged from 0.02 to 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and the MBCs from 0.25 to  $> 128 \mu\text{g ml}^{-1}$  (Table 1). *In vitro* eradication of 24 h-old biofilms required concentrations (MBECs) up to 51 200 times higher than the MICs (Table 1).

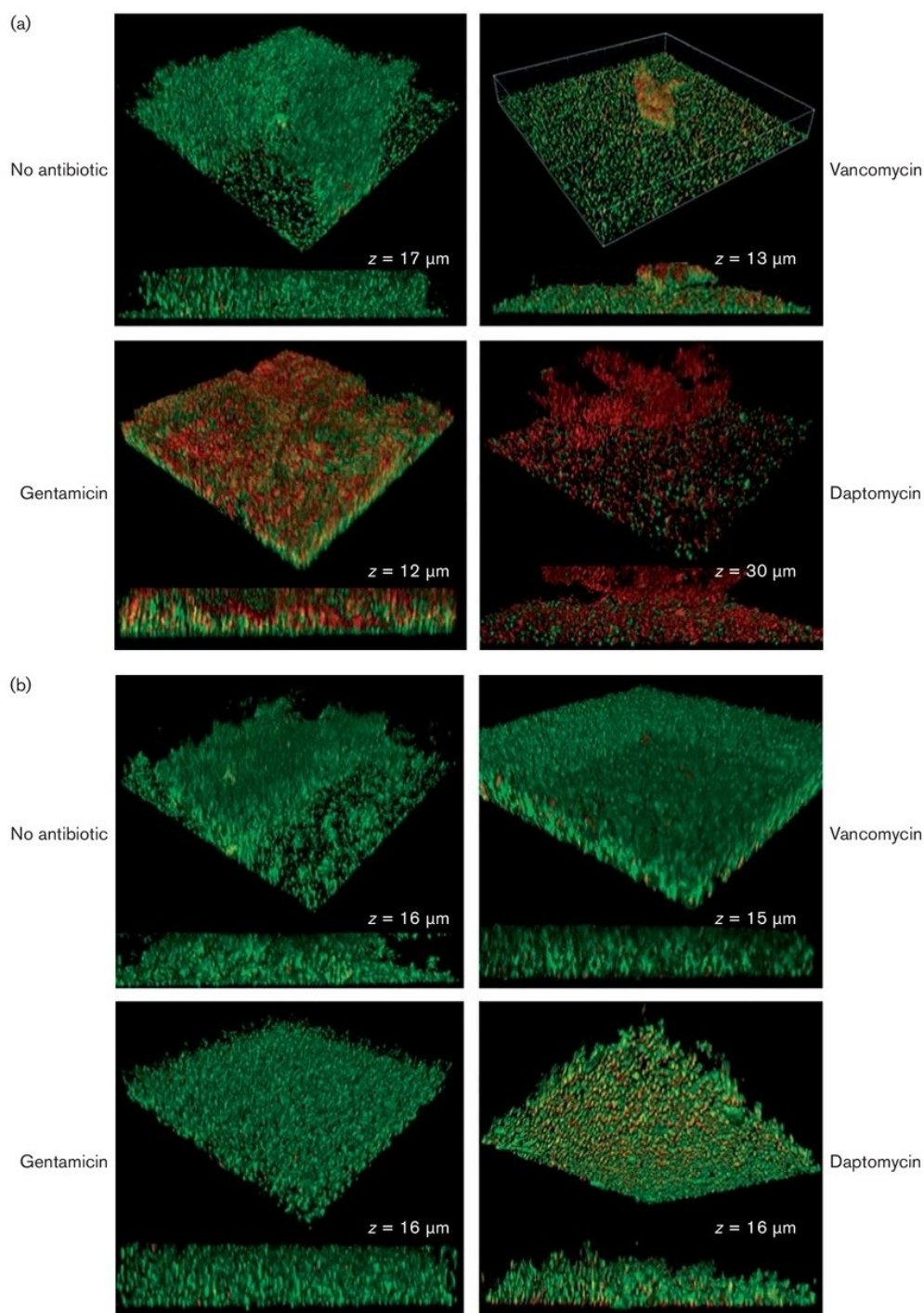
When biofilms were formed in the presence of antibiotics, viable bacteria significantly decreased after 4 h of incubation in both the suspensions and biofilms for all antibiotics tested, except for fusidic acid with sessile cells (Fig. 1). The numbers of unattached and sessile viable bacteria were below the threshold of detection for daptomycin and gentamicin at the highest concentrations tested. By contrast, ceftarolin, fosfomycin, ofloxacin, rifampicin and vancomycin gave rise to undetectable levels of sessile cells at the highest drug concentrations tested, while unattached cells remained cultivable.

Confocal microscopy analysis showed dense and highly structured biofilms in the control, with mostly live cells (Fig. 2a). These structures were impaired when biofilms were formed in the presence of daptomycin and vancomycin, but the presence of gentamicin did not seem to greatly modify the biofilm architecture.

When added to 24 h-old biofilms, vancomycin, daptomycin and gentamicin did not modify the biofilm architecture, but were effective in killing bacteria within the biofilms, particularly daptomycin (Fig. 2b).

## DISCUSSION

The MSSA clinical strain tested in this study exhibited high levels of biofilm formation *in vitro* even after short-duration (4 h) incubation (Fig. 1). The biofilm formation ability of this strain was evaluated in the presence of 12 antibiotics from different families. None induced biofilm formation, and in this regard the strain behaved like those described previously, with an inverse relation between basal biofilm production and antibiotic-driven biofilm inducibility (Kaplan *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2014). Interestingly, no biofilm was detectable after 4 h incubation in the presence of fosfomycin, ofloxacin and vancomycin, rifampicin and ceftarolin at concentrations in the range of the breakpoint concentrations. However, viable unattached cells were still detectable in the suspensions covering the biofilm, even at the highest antibiotic concentrations tested. Since these drugs are mostly active against dividing bacteria, our results suggest that their presence impaired the bacterial process required for initial biofilm formation within the active population, without hampering the non-dividing population. Population heterogeneity has been observed in *S. aureus* culture as a result of phenotype switching occurring during planktonic exponential-phase growth in the absence of selective pressure, which led to the emergence of subpopulations of slow-growing antibiotic-resistant cells (Edwards, 2012;



**Fig. 2.** Confocal observations of antibiotic-treated biofilms of *S. aureus* LYO-S2. Observations were performed after formation of biofilm in the presence of vancomycin ( $0.125 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), gentamicin ( $0.125 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) or daptomycin ( $0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (a) and after treatment of 24 h-old biofilms with vancomycin ( $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), gentamicin ( $1600 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and daptomycin ( $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (b). z, Biofilm thickness.

Bui *et al.*, 2015). Numerous studies have determined the impact of antibiotics on biofilm formation and sessile cell viability (Kaplan *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2014), but the concomitant outcome of non-adhering bacteria, a small portion of the population that might participate in the development of chronic and recurrent infections, has been poorly investigated.

In our study, no cultivable cells were observed after 4 h incubation of the strain LYO-S2 with daptomycin or gentamicin, in both the biofilm and the suspensions, even at antibiotic concentrations as low as the breakpoint concentrations (Fig. 1), but the drugs had no (gentamicin) or little (daptomycin) effect on the viability of 24 h-old biofilms (Table 1, Fig. 2). Daptomycin has already been shown to act faster and more effectively than vancomycin or other antibiotics such as gentamicin against MSSA biofilms (Meije *et al.*, 2014), probably owing to differences in biofilm matrix penetration capacities (Siala *et al.*, 2014). However this study, along with previous *in vitro* and *in vivo* experiments, demonstrated that the effective concentrations required for biofilm eradication are unattainable by conventional antibiotic administration (Cha *et al.*, 2011).

In order to avoid re-infection, antibiotic treatment is necessary after removal of infected prosthetic material. Therapeutic molecules should therefore be effective against both sessile and free-living cells to avoid emergence of septic metastasis. None of the molecules tested in this *in vitro* study was effective at conventional concentrations against all different forms of MSSA cells. Hence, high-dose combined therapies, such as the combination of fosfomycin and daptomycin as described by Miró *et al.* (2012) could be given priority; only clinical studies will assess their *in vivo* benefit.

## ACKNOWLEDGEMENTS

A CIFRE fellowship from bioMérieux and the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) for C. M. is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- 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.
- Bui, L. M. G., Hoffmann, P., Turnidge, J. D., Zilm, P. S. & Kidd, S. P. (2015). Prolonged growth of a clinical *Staphylococcus aureus* strain selects for a stable small-colony-variant cell type. *Infect Immun* 83, 470–481.
- Cha, J. O., Park, Y. K., Lee, Y. S. & Chung, G. T. (2011). *In vitro* biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70, 112–118.
- CLSI (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Darouiche, R. O. (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 350, 1422–1429.
- Del Pozo, J. L. & Patel, R. (2009). Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med* 361, 787–794.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193.
- Edwards, A. M. (2012). Phenotype switching is a natural consequence of *Staphylococcus aureus* replication. *J Bacteriol* 194, 5404–5412.
- Evans, D. J., Brown, M. R., Allison, D. G. & Gilbert, P. (1990). Susceptibility of bacterial biofilms to tobramycin: role of specific growth rate and phase in the division cycle. *J Antimicrob Chemother* 25, 585–591.
- Kaplan, J. B., Izano, E. A., Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L., Bayles, K. W. & Horswill, A. R. (2012). Low levels of  $\beta$ -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBiol* 3, e00198-0012.
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S. & O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306–310.
- Meije, Y., Almirante, B., Del Pozo, J. L., Martín, M. T., Fernández-Hidalgo, N., Shan, A., Basas, J., Pahissa, A. & Gavalda, J. (2014). Daptomycin is effective as antibiotic-lock therapy in a model of *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J Infect* 68, 548–552.
- Miró, J. M., Entenza, J. M., Del Río, A., Velasco, M., Castañeda, X., Garcia de la Mària, C., Giddey, M., Armero, Y., Pericás, J. M. & other authors (2012). High-dose daptomycin plus fosfomycin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4511–4515.
- Ng, M., Epstein, S. B., Callahan, M. T., Piotrowski, B. O., Simon, G. L., Roberts, A. D., Keiser, J. F. & Kaplan, J. B. (2014). Induction of MRSA biofilm by low-dose  $\beta$ -lactam antibiotics: specificity, prevalence and dose-response effects. *Dose Response* 12, 152–161.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schaffhauser, J. & other authors (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* 334, 982–986.
- Odenholt, I. (2001). Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 17, 1–8.
- Siala, W., Mingeot-Leclercq, M. P., Tulkens, P. M., Hallin, M., Denis, O. & Van Bambeke, F. (2014). Comparison of the antibiotic activities of daptomycin, vancomycin, and the investigational fluoroquinolone delafloxacin against biofilms from *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 6385–6397.
- Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65, 1955–1958.
- Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
- Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P. & Geesey, G. G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 2125–2133.
- Titècat, M., Senneville, E., Wallet, F., Dezèque, H., Migaud, H., Courcol, R. J. & Loez, C. (2013). Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthopaedics Traumatol Surg Res* 99, 653–658.
- Zhang, L. & Mah, T. F. (2008). Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* 190, 4447–4452.

### 4.3 Troisième article: Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*.



## Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*

Florent Valour,<sup>a,b</sup> Sophie Trouillet-Assant,<sup>b</sup> Natacha Riffard,<sup>b</sup> Jason Tasse,<sup>b</sup> Sacha Flammier,<sup>b</sup> Jean-Philippe Rasigade,<sup>b,c</sup> Christian Chidiac,<sup>a,b</sup> François Vandenesch,<sup>b,c,d</sup> Tristan Ferry,<sup>a,b</sup> Frédéric Laurent,<sup>b,c,d</sup> on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection Study Group

Infectious Diseases Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France<sup>a</sup>; INSERM U1111, International Centre for Research in Infectiology, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France<sup>b</sup>; Laboratory of Bacteriology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France<sup>c</sup>; French National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France<sup>d</sup>

Although *Staphylococcus aureus* persistence in osteoblasts, partly as small-colony variants (SCVs), can contribute to bone and joint infection (BJI) relapses, the intracellular activity of antimicrobials is not currently considered in the choice of treatment strategies for BJI. Here, antistaphylococcal antimicrobials were evaluated for their intraosteoblastic activity and their impact on the intracellular emergence of SCVs in an *ex vivo* osteoblast infection model. Osteoblastic MG63 cells were infected for 2 h with HG001 *S. aureus*. After killing the remaining extracellular bacteria with lysostaphin, infected cells were incubated for 24 h with antimicrobials at the intraosseous concentrations reached with standard therapeutic doses. Intracellular bacteria and SCVs were then quantified by plating cell lysates. A bactericidal effect was observed with fosfomycin, linezolid, tigecycline, oxacillin, rifampin, ofloxacin, and clindamycin, with reductions in the intracellular inocula of  $-2.5$ ,  $-3.1$ ,  $-3.9$ ,  $-4.2$ ,  $-4.9$ ,  $-4.9$ , and  $-5.2$   $\log_{10}$  CFU/100,000 cells, respectively ( $P < 10^{-4}$ ). Conversely, a bacteriostatic effect was observed with ceftaroline and teicoplanin, whereas vancomycin and daptomycin had no significant impact on intracellular bacterial growth. Ofloxacin, daptomycin, and vancomycin significantly limited intracellular SCV emergence. Overall, ofloxacin was the only molecule to combine an excellent intracellular activity while limiting the emergence of SCVs. These data provide a basis for refining the choice of antibiotics to prioritise in the management of BJI, justifying the combination of a fluoroquinolone for its intracellular activity with an anti-biofilm molecule, such as rifampin.

*Staphylococcus aureus* represents the leading cause of bone and joint infection (BJI) (1, 2). This particular tropism and its ability to cause difficult-to-treat infections lie in the wide panel of staphylococcal virulence factors, which allow host colonization, tissue invasion, and host immune system subversion (3, 4). With regard to BJI, three phenotypic mechanisms provide a bacterial reservoir responsible for staphylococcal BJI chronicity and relapses. First, by promoting immune system and antimicrobial action evasions, biofilm formation has been associated with persistent BJIs, emphasizing the need of infected tissue removal, especially in cases of orthopedic device-associated infections (ODIs) (5–7). Second, implications of the ability of staphylococci to invade and persist within bone cells, and especially osteoblasts, in BJI chronicity has been suggested for years by numerous studies evaluating this mechanism using a few laboratory strains (8–10). We have recently demonstrated this hypothesis among a large collection of clinical BJI isolates of methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus* (11, 12). Finally, bacterial phenotype switching to small-colony variants (SCVs) has been associated with BJI persistence and is enhanced under adverse/stressful growing conditions, such as those for bacteria embedded in biofilms, internalized within host cells, and/or in the presence of antibiotics (13–15).

To date, the choice of antimicrobial therapy for *S. aureus* BJI relies mainly on *in vivo* experimental models of BJI or foreign body infections, and is guided by the *in vitro* antibacterial activity and bone diffusion of antimicrobials (1, 2, 16). Recently, certain pathophysiological mechanisms of BJI have also been taken into consideration. For instance, the use of rifampin is recommended in ODI due to its activity into staphylococcal biofilm (16, 17). Although *S. aureus* can be internalized into human osteoblasts and persist in bone cells partly as SCVs, which can lead to an intracellular bacterial reservoir responsible for BJI chronicity and

relapse, the intracellular activity of antimicrobials is not currently considered in the treatment strategies of BJI. Therefore, we aimed to evaluate the intraosteoblastic activity of the main antimicrobials used for staphylococcal BJI in an *in vitro* model of osteoblast infection and to assess their impact on the emergence of intracellular SCVs.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strain.** The methicillin-susceptible *S. aureus* HG001 strain was used for all of the experiments. The MICs of the antimicrobials tested in the cellular model were determined by the Etest method using Mueller-Hinton agar according to the manufacturer's instructions (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and the recommendations of the French Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (CA-SFM).

**MG63 osteoblastic cell culture.** All cell culture reagents were obtained from Gibco (Paisley, United Kingdom). The human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427) (18), purchased from LGC standard (USA), was routinely cultured in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in a growth medium (CGM) consisting of Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 25 mM HEPES,

Received 2 October 2014 Returned for modification 21 November 2014

Accepted 20 January 2015

Accepted manuscript posted online 20 January 2015

Citation Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, Tasse J, Flammier S, Rasigade J-P, Chidiac C, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F, on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection Study Group. 2015. Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:2029–2036. doi:10.1128/AAC.04359-14.

Address correspondence to Florent Valour, florent.valour@chu-lyon.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.04359-14

TABLE 1 Antimicrobial susceptibility of *S. aureus* HG001 and antimicrobial concentrations<sup>a</sup>

Antimicrobial	MIC (mg/liter)	Usual plasmatic concn (mg/liter)	Usual bone/plasma ratio	Concn (mg/liter) <sup>b</sup>		
				C <sub>min</sub>	C <sub>bone</sub>	C <sub>max</sub>
Beta-lactams						
Oxacillin	0.094	50	0.17	3.33	10	30
Ceftaroline	0.19	20	0.19	1.33	4	12
Clindamycin	0.032	4–14	0.35	1.33	4	12
Fosfomycin	2	4–14	0.35	1.33	4	12
Glyco/lipopeptides						
Vancomycin	1.5	20–40	0.21	2	6	18
Teicoplanin	1.5	10–70	0.21	1	3	9
Daptomycin	0.19	4–11	0.24	1.7	5	15
Linezolid	1	20	0.4	2.67	8	24
Ofloxacin	0.5	5	0.5	0.67	2	6
Rifampin	0.004	10–30	0.27	2	6	18
Tigecycline	0.125	0.2–1.5	0.35	0.1	0.3	0.9

<sup>a</sup> MICs were determined by using the standard diffusion method (Etest). Usual plasmatic and bone/plasma concentration ratios were determined after a literature review, especially from the review of Landersdorfer et al. (19).

<sup>b</sup> C<sub>bone</sub>, bone concentration; C<sub>min</sub>, minimal concentration; C<sub>max</sub>, maximal concentration.

and 2 mM L-glutamine with or without 100 U of penicillin/ml and 100 µg of streptomycin/ml (CGM with antibiotic). The cells were passaged once a week and used up to passage 20 after thawing. Prior to assays, osteoblasts were seeded at 40,000 cells per well into 48-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 500 µl of growth medium with antibiotics and cultured for 24 h until achieving 70 to 80% confluence.

**Bacterial suspension standardization and osteoblast infection.** Prior to the assays, the *S. aureus* HG001 strain was subcultivated on Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (COS; bioMérieux) at 37°C for 24 h. Three colonies were then used to inoculate 5 ml of brain heart infusion (tube, 15 by 130 mm; BHI; AES, Bruz, France) incubated overnight at 37°C. The suspensions were washed and resuspended in CGM at a concentration corresponding to a multiplicity of infection of 100 by using a previously established clone-specific regression formula correlating the bacterial density (CFU/ml) with the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>): CFU/ml =  $(7 \times 10^8 \times OD_{600}) - (3 \times 10^7)$  (data not shown). Normalized bacterial suspensions were then sonicated for 10 min at 100% (Bactsonic; LaboModern, Paris, France) to minimize clumping and added to the bone cell culture wells. After incubation for 30 min at 4°C to allow sedimentation of the bacteria while blocking internalization, all of the cultures were simultaneously transferred to 37°C to synchronize the beginning of the internalization step. After 2 h, the cell cultures were washed twice with 500 µl of DMEM, followed by incubation for 1 h with growth medium supplemented with 10 µg of lysostaphin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)/ml to kill the remaining extracellular staphylococcal cells.

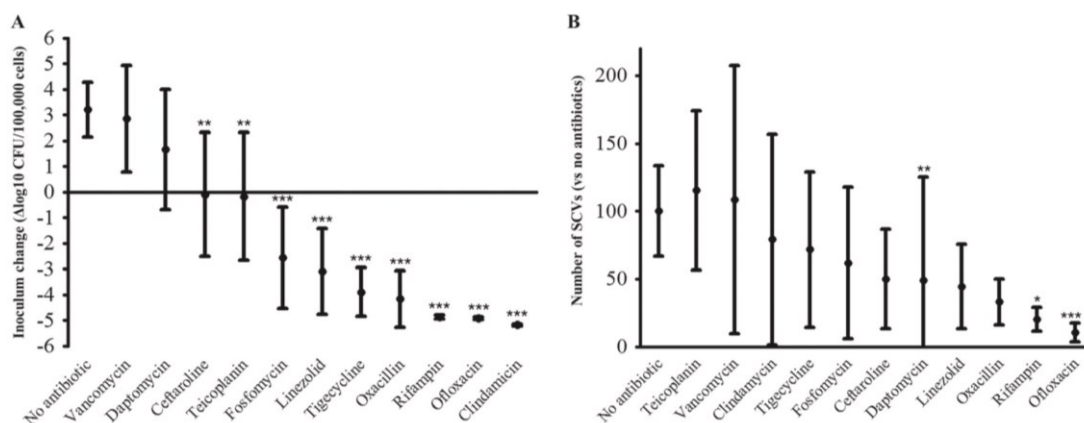
**Antimicrobial intracellular activity and impact on intracellular SCV selection.** After killing the extracellular bacteria with lysostaphin, the infected cells were washed twice with DMEM and then incubated for 24 h with growth medium containing the tested antimicrobials at three concentrations. The “bone concentration” (C<sub>bone</sub>) corresponded to the intrasosseous concentrations reached in humans when using standard therapeutic dosages and was determined after a pharmacologic literature review (19, 20). These molecules were also used at minimal (C<sub>min</sub> = C<sub>bone</sub>/3) and maximal (C<sub>max</sub> = C<sub>bone</sub> × 3) concentrations to assess the existence of potential dose effects (Table 1). For each condition, lysostaphin at 10 µg/ml was also added to the growth medium to kill the bacteria released upon host cell lysis, thus preventing these bacteria from reinfecting new host cells.

After 24 h of incubation, the osteoblasts were washed twice with

DMEM and subsequently lysed by a 10-min incubation with sterile water. Cell lysates were sonicated to minimize clumping, and dilutions of these lysates were spiral-plated in duplicate on COS using a WASP automated plater (AES Chemunex, Bruz, France). After overnight incubation at 37°C, the plates were photographed, and the wild-type and SCV colonies were enumerated. A commonly used operational definition of SCVs based on colony size states that colonies with a size less than one-fifth of that of the wild-type strain can be considered SCVs (14). Previous reports were based on visual inspection of cultures by an operator. To eliminate operator dependency, SCV quantification was performed using an automated process in which a high-resolution picture of each plate was taken and analyzed by means of the image analysis software ImageJ (W. S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD) (21), with a customized macro involving color thresholding, watershed algorithm, and particle analysis, in order to extract the distribution of colony areas. The wild-type colony area was defined as the median area of all colonies (because the median is robust to outliers, the presence of SCVs did not influence significantly this measure), and SCVs were defined, according to the usual operational definition, as colonies with an area less than one-fifth of the median area.

Of note, antimicrobial-induced cytotoxicity was assessed by quantifying lactate dehydrogenase (LDH) release (resulting from damaged cells) in the cell culture supernatant of osteoblasts incubated with each tested antimicrobial at C<sub>max</sub> using a colorimetric method (Dimension Vista automated clinical chemistry analyser; Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY).

**Statistical analysis.** For every concentration, each antimicrobial agent was evaluated in triplicate in three independent experiments. The results are presented as means with the 95% confidence intervals (CI) of the nine measure points available for each condition. To standardize the results, intracellular inocula were normalized for 100,000 osteoblasts and expressed as changes observed in the number of intracellular CFU (Δlog CFU) at 24 h compared to untreated cells using the Mann-Whitney U-test. Intracellular SCVs were expressed using the ratio of the number of SVC colonies among antimicrobial agent-treated cells compared to untreated osteoblasts. The existence of a dose effect was assessed by linear regression between the three used concentrations. A *P* value of <0.05 was considered significant. All analyses were performed using GraphPad Prism (v5.03; GraphPad Software, San Diego, CA).



**FIG 1** Intraosteoblastic inoculum change and intracellular proportion of small-colony variants in the presence of the main antistaphylococcal molecules at the usual bone concentration. The change in the number of intracellular CFU ( $\Delta \log$  CFU; means and 95% CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of  $1.8 \times 10^6$  (95% CI =  $1.4 \times 10^6$  to  $2.1 \times 10^6$ ) for 100,000 osteoblasts, was compared to untreated cells (Mann-Whitney U-test). CI, confidence interval; SCV, small-colony variants; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## RESULTS

**Susceptibility studies.** The MICs, as determined by the Etest method, showed that *S. aureus* HG001 was fully susceptible to all of the antistaphylococcal molecules tested in the present study (Table 1).

**Antimicrobial agent-induced cellular toxicity.** The data obtained by the LDH release assay demonstrated that the antimicrobials used at  $C_{\max}$  (and consequently at  $C_{\min}$  and  $C_{\text{bone}}$ ) had no impact on LDH concentration in the supernatant and thus were not responsible for cell death.

**Intracellular action.** The intracellular effect of the antimicrobials was expressed by the inoculum change between the initial and 24 h inocula ( $\Delta \log$  CFU) and compared to untreated cells. Of note, the mean initial inoculum was  $1.8 \times 10^6$  CFU/100,000 osteoblasts (95% CI [ $1.4 \times 10^6$  to  $2.1 \times 10^6$ ]).

At the bone concentration, vancomycin and daptomycin were not able to significantly prevent the intracellular growth observed in untreated cells ( $+3.2 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $+2.1$  to  $+4.3$ ]), highlighted by an intracellular inoculum increase of  $+2.9$  (95% CI [ $+0.8$  to  $+4.9$ ];  $P = 0.830$ ) and  $+1.7$  (95% CI [ $-0.7$  to  $+4.0$ ])  $\log_{10}$  CFU/100,000 cells ( $P = 0.070$ ), respectively. Compared to untreated cells, an intracellular bacteriostatic effect was observed with ceftaroline and teicoplanin, which was estimated at  $-0.1$  (95% CI [ $-2.5$  to  $+2.3$ ];  $P = 0.002$ ) and  $-0.2$  (95% CI [ $-2.7$  to  $+2.3$ ];  $P = 0.001$ )  $\log_{10}$  CFU/100,000 osteoblasts, respectively. At the bone concentration, a significant bactericidal effect was observed with fosfomycin ( $-2.5 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-0.6$  to  $-4.5$ ];  $P < 10^{-4}$ ), linezolid ( $-3.1 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-2.9$  to  $-4.8$ ];  $P < 10^{-4}$ ), tigecycline ( $-3.9 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-2.9$  to  $-4.8$ ];  $P < 10^{-4}$ ), oxacillin ( $-4.2 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-3.1$  to  $-5.3$ ];  $P < 10^{-4}$ ), rifampin ( $-4.9 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-4.8$  to  $-4.9$ ];  $P < 10^{-4}$ ), ofloxacin ( $-4.9 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-4.9$  to  $-5.0$ ];  $P < 10^{-4}$ ), and clindamycin ( $-5.2 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-5.1$  to  $-5.2$ ];  $P < 10^{-4}$ ) (Fig. 1A and Table 2).

At the minimal concentration, only rifampin ( $-4.7 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-4.9$  to  $-4.6$ ];  $P < 10^{-4}$ ), clindamycin

( $-5.2 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-5.2$  to  $-5.1$ ];  $P < 10^{-4}$ ), ofloxacin ( $-3.2 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-4.9$  to  $-1.4$ ];  $P < 10^{-3}$ ), and fosfomycin ( $-3.7 \log_{10}$  CFU/100,000 cells; 95% CI [ $-5.1$  to  $-2.3$ ];  $P < 10^{-4}$ ) were bactericidal. At the maximal concentration, all antibiotics were bactericidal, with the exception of vancomycin and daptomycin (Fig. 2 and Table 2). The combined analysis of the three concentrations used for each antimicrobial revealed a significant dose effect for oxacillin, ceftaroline, vancomycin, daptomycin, tigecycline, and ofloxacin (Fig. 2 and Table 2).

**Impact of antistaphylococcal antibiotics on intracellular SCV emergence.** There was no SCV in the challenge inocula. After 24 h, the number of SCVs in untreated cells was 13,514/100,000 osteoblasts (95% CI [6,448 to 20,580]), corresponding to 4.1% (95% CI [2.6 to 5.7]) of all colonies. Our data showed that this number did not increase, regardless of the antibiotic and concentration tested.

At the bone concentration, the number of SCVs was significantly decreased in the osteoblasts treated with ofloxacin, rifampin, and daptomycin, with a reduction of  $-79.7\%$  (95% CI [ $-88.4$  to  $-71.0$ ];  $P = 0.001$ ),  $-89.7\%$  (95% CI [ $-96.6$  to  $-82.7$ ];  $P = 0.011$ ), and  $-50.9\%$  (95% CI [ $-25.1$  to  $+126.9$ ];  $P = 0.004$ ), respectively, compared to untreated cells (Fig. 1B and Table 2).

In addition, oxacillin ( $-92.2\%$ ; 95% CI [ $-85.4$ ;  $-99.0$ ];  $P < 10^{-3}$ ), ceftaroline ( $-17.1$ ; 95% CI [ $-102.1$  to  $+136.4$ ];  $P = 0.044$ ), linezolid ( $-64.2$ ; 95% CI [ $-93.1$  to  $-35.4$ ];  $P = 0.023$ ), fosfomycin ( $-94.7$ ; 95% CI [ $-87.1$  to  $+102.4$ ];  $P < 10^{-3}$ ), and tigecycline ( $-8.1$ ; 95% CI [ $-129.0$  to  $+145.2$ ];  $P = 0.015$ ) reduced the proportion of intracellular SCVs but only at the maximum concentration. A slight but significant dose effect was observed only with oxacillin (Fig. 3 and Table 2). Other differences were not statistically significant.

## DISCUSSION

Considering that intraosteoblastic *S. aureus* constitutes a bacterial reservoir leading to chronicity and relapse, targeting intracellular bacteria might be a major therapeutic issue in the antimicrobial therapy for BJI and should be taken into account (11, 12).



Valour et al.

TABLE 2 Summary of the antimicrobial impact on intracellular global inoculum and SCVs<sup>a</sup>

Antimicrobial agent and parameter	Minimal concn		Bone concn		Maximal concn		Dose effect	
	Mean (95% CI)	P	Mean (95% CI)	P	Mean (95% CI)	P	R <sup>2</sup>	P
<b>Oxacillin</b>								
Δlog CFU	-1.7 (-4.0 to +0.7)	<10 <sup>-3</sup>	-4.2 (-5.3 to -3.1)	<10 <sup>-3</sup>	-4.9 (-5.0 to -4.8)	<10 <sup>-3</sup>	0.130	0.007
SCVs (%)	34.5 (16.1 to 52.9)	0.041	33.2 (16.3 to 50.0)	0.053	7.8 (1.0 to 14.6)	<10 <sup>-3</sup>	0.136	0.007
<b>Ceftaroline</b>								
Δlog CFU	+0.5 (-1.9 to +3.0)	0.006	-0.1 (-2.5 to +2.3)	0.002	-2.6 (-4.4 to -0.7)	<10 <sup>-3</sup>	0.084	0.033
SCVs (%)	96.3 (-29.1 to 221.7)	0.082	50.0 (13.1 to 86.8)	0.071	82.9 (-36.4 to 202.1)	0.044	<10 <sup>-3</sup>	0.992
<b>Vancomycin</b>								
Δlog CFU	+0.8 (-1.7 to +3.3)	0.333	+2.9 (+0.8 to +4.9)	0.830	-1.7 (-4.1 to 0.6)	0.002	0.085	0.033
SCVs (%)	44.4 (-8.2 to 97.1)	0.072	108.5 (9.4 to 207.6)	0.800	53.5 (3.6 to 103.4)	0.185	0.001	0.824
<b>Teicoplanin</b>								
Δlog CFU	-2.3 (-4.5 to -0.0)	<10 <sup>-3</sup>	-0.2 (-2.7 to +2.3)	0.001	-3.9 (-5.3 to -2.6)	<10 <sup>-3</sup>	0.058	0.080
SCVs (%)	134.6 (5.2 to 263.9)	0.978	115.3 (56.5 to 174.2)	0.374	117.2 (24.2 to 210.1)	0.844	0.001	0.831
<b>Linezolid</b>								
Δlog CFU	-0.9 (-3.1 to +1.3)	<10 <sup>-3</sup>	-3.1 (-4.8 to -1.4)	<10 <sup>-3</sup>	-3.1 (-4.8 to -1.4)	<10 <sup>-3</sup>	0.016	0.361
SCVs (%)	30.1 (16.3 to 43.9)	0.025	44.6 (13.5 to 75.8)	0.087	35.8 (6.9 to 64.6)	0.023	<10 <sup>-3</sup>	0.924
<b>Daptomycin</b>								
Δlog CFU	+5.2 (+5.0 to +5.4)	0.078	+1.7 (-0.7 to +4.0)	0.070	-1.6 (-3.7 to +0.5)	<10 <sup>-3</sup>	0.346	<10 <sup>-3</sup>
SCVs (%)	65.1 (2.3 to 127.9)	0.052	49.1 (-26.9 to 125.1)	0.004	83.3 (-7.9 to 174.5)	0.057	0.005	0.622
<b>Fosfomycin</b>								
Δlog CFU	-3.7 (-5.1 to -2.3)	<10 <sup>-3</sup>	-2.6 (-4.5 to -0.6)	<10 <sup>-3</sup>	-2.9 (-4.7 to -1.0)	<10 <sup>-3</sup>	0.005	0.621
SCVs (%)	52.5 (-13.1 to 118.1)	0.015	61.7 (5.7 to 117.6)	0.057	5.3 (-2.4 to 12.9)	<10 <sup>-3</sup>	0.051	0.100
<b>Tigecycline</b>								
Δlog CFU	-3.7 (-5.1 to -2.3)	0.005	-3.9 (-4.8 to -2.9)	<10 <sup>-3</sup>	-3.8 (-4.7 to -1.0)	<10 <sup>-3</sup>	0.148	0.041
SCVs (%)	77.1 (22.1 to 132.2)	0.354	71.7 (14.2 to 129.1)	0.128	91.9 (-45.2 to 229.0)	0.015	0.002	0.765
<b>Clindamycin</b>								
Δlog CFU	-5.2 (-5.2 to -5.1)	<10 <sup>-3</sup>	-5.2 (-5.2 to -5.1)	<10 <sup>-3</sup>	-5.2 (-5.3 to -5.1)	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	0.904
SCVs (%)	59.7 (13.2 to 106.2)	0.425	79.1 (1.3 to 157.0)	0.415	88.9 (16.3 to 161.5)	0.786	0.011	0.549
<b>Ofloxacin</b>								
Δlog CFU	-3.2 (-4.9 to -1.4)	<10 <sup>-3</sup>	-4.9 (-5.0 to -4.9)	<10 <sup>-3</sup>	-5.0 (-5.0 to -5.0)	<10 <sup>-3</sup>	0.083	0.035
SCVs (%)	16.4 (3.3 to 29.6)	0.003	10.4 (3.4 to 17.3)	0.001	12.4 (4.1 to 20.6)	0.001	0.003	0.709
<b>Rifampin</b>								
Δlog CFU	-4.7 (-4.9 to -4.6)	<10 <sup>-3</sup>	-4.9 (-4.9 to -4.8)	<10 <sup>-3</sup>	-4.7 (-4.9 to -4.6)	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	0.886
SCVs (%)	27.1 (12.5 to 41.8)	0.021	20.3 (11.6 to 29.0)	0.011	18.4 (7.7 to 29.2)	0.010	0.018	0.339

<sup>a</sup> The reduction of intracellular inoculum (Δlog CFU) represents the decrease in intracellular bacteria after 24 h compared to untreated cells by Mann-Whitney U-test. SCVs represent the number of colonies with an area inferior to 5-fold less of the median area measured for all colonies on each plate and are expressed relative to untreated cells. The existence of a dose effect was assessed by linear regression between the three used concentrations.

Compared to previous evaluations of the intracellular activity of antimicrobials, the present study was specifically adapted to BJI by the following: (i) the use of a human osteoblast infection model, thereby allowing a better estimation of the situation encountered in BJI, as opposed to using monocyte-macrophage cells, as previously described (22, 23), and (ii) the evaluation of the antimicrobial intraosseous concentrations reached in humans when using standard therapeutic doses and not plasmatic (or higher) concentrations, which do not correspond to the therapeutic tissue reality (19). Even if the distribution of antibiotics in the different parts of bones and joints (i.e., cortical and medullar bone tissue, joint fluid, synovial . . .) is likely heterogeneous, our model tried to closely fit with actually known pharmacologic conditions.

At the bone concentration, vancomycin and daptomycin did not result in a significant reduction in the intracellular inoculum, and ceftaroline and teicoplanin appeared only bacteriostatic. Conversely, the other tested antimicrobials achieved a significant intracellular bactericidal effect: rifampin, ofloxacin, and clindamycin were the most active molecules. These results must be analyzed with regard to the relative intracellular distribution of bacteria and antimicrobials and the physicochemical parameters of intracellular compartments. After the internalization step, *S. aureus* is processed in a phagolysosome, which is characterized by a low pH, and certain *S. aureus* strains are able to escape from the phagosome. The proportion of bacteria released into the cytoplasm depends on the time from infection (ranging from 10 to

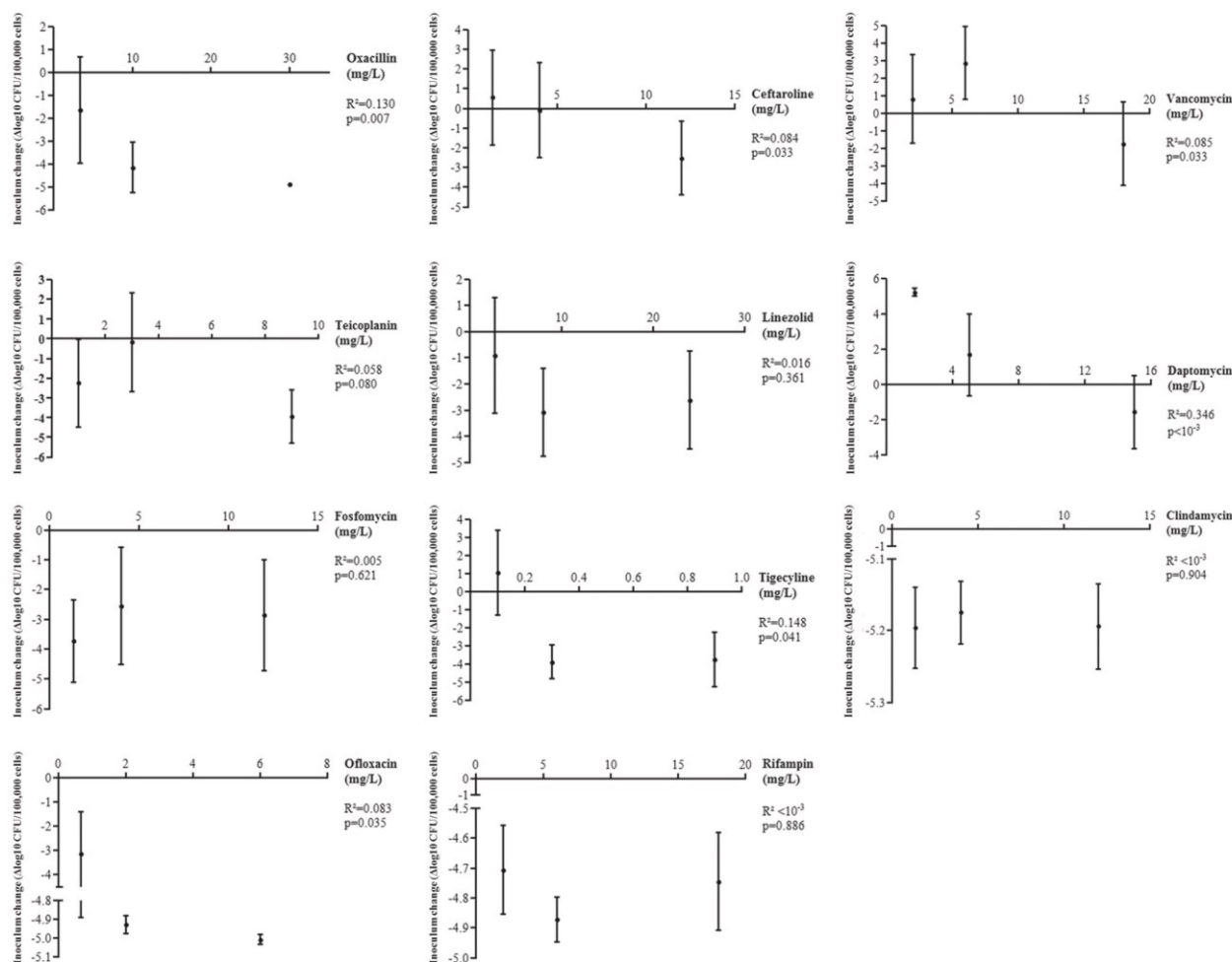


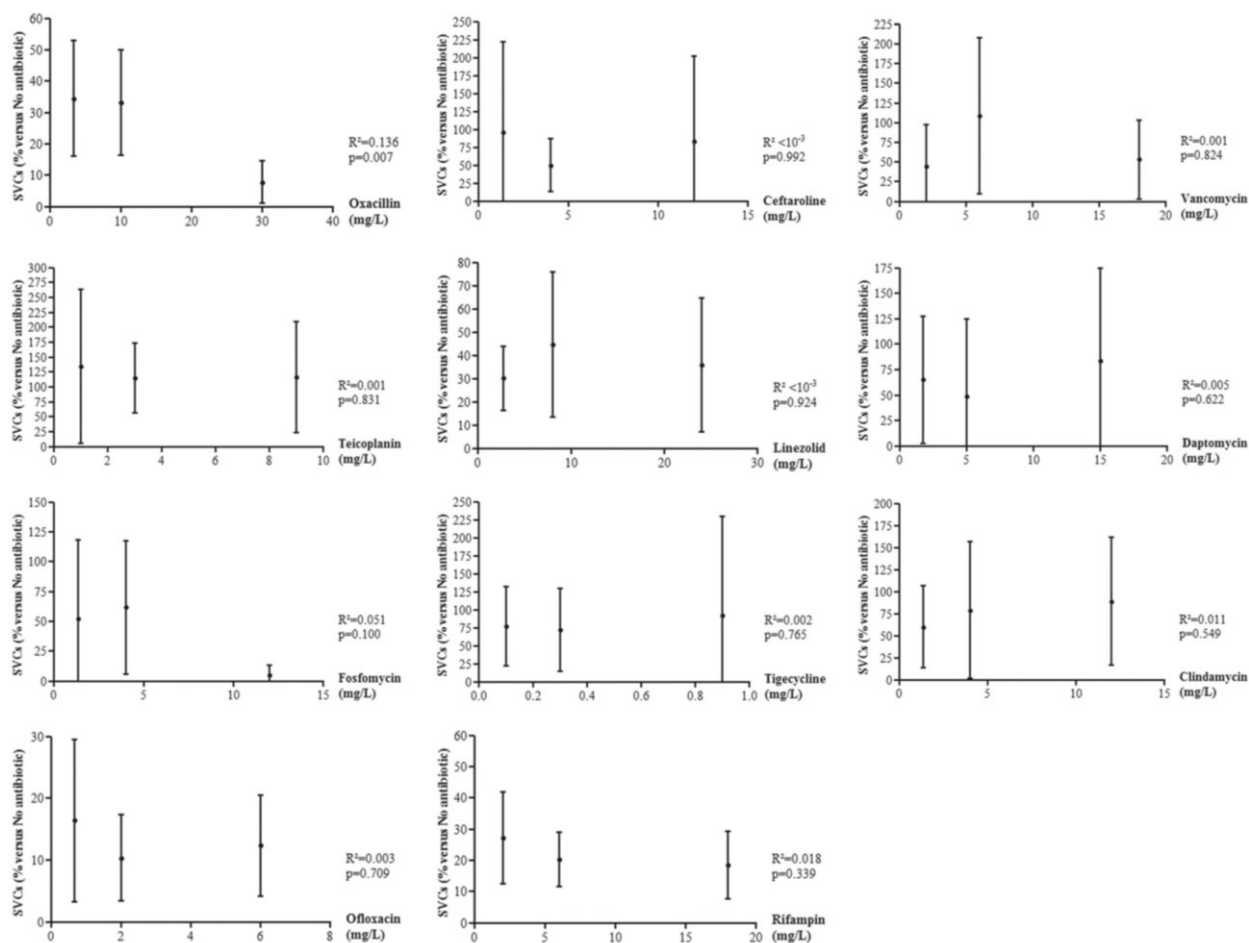
FIG 2 Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on intraosteoblastic inoculum. The results are expressed by the change in the number of intracellular CFU ( $\Delta\log$  CFU; means and 95% CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of  $1.8 \times 10^6$  (95% CI =  $1.4 \times 10^6$  to  $2.1 \times 10^6$ ) for 100,000 osteoblasts. The dose effect was assessed using linear regression between the three used concentrations. CI, confidence interval; \*,  $P < 0.05$ .

30% at 2 h to 60 to 80% after 8 h) but also on various virulence factors, including delta- and beta-toxins and phenol-soluble modulins (24). Within this context, the low activity of vancomycin on intracellular staphylococci can consequently lie in its slow uptake and modest cellular accumulation compared to teicoplanin, a more lipophilic glycopeptide, which shows a more extensive and faster accumulation (25, 26). Conversely, the good intracellular activity of clindamycin, fluoroquinolones, and rifampin can be explained by their well-known rapid accumulation in eukaryotic cells (27–29). However, fluoroquinolones are mainly located in the cytosol, whereas clindamycin and rifampin are distributed both in the cytosol and phagosomes, likely allowing these molecules to target all intracellular *S. aureus* cells (30). Moreover, the local environment, and especially the acidic pH, can be unfavorable to the activity of some antibiotics. For instance, such conditions only slightly affect fluoroquinolones and clindamycin, with the retention of their good intracellular activity (30). Interestingly, some studies have even shown that methicillin-resistant *S. aureus* strains recover their susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics when

they are phagocytised by eukaryotic cells due to the acidic pH in phagolysosomes (31, 32). Indeed, penicillin-binding protein (PBP) 2a, a low  $\beta$ -lactam-affinity PBP encoded by the *mecA* gene and conferring resistance to penicillin, can be acetylated by  $\beta$ -lactams due to a pH-induced conformational change (33). This mechanism can possibly be involved in the increased intracellular activity of  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *S. aureus* due to a similar conformational modification of natural PBPs.

To our knowledge, only two studies previously assessed the intraosteoblastic activity of some antimicrobials. Kreis et al. recently obtained results concordant with ours using tigecycline and rifampin but with tigecycline concentrations 30-fold higher than therapeutic bone concentrations (34). Ellington et al. also suggested an excellent intraosteoblastic activity of rifampin, clindamycin, and macrolides, but these compounds were used at MICs and not at bone concentrations (22). Other studies were performed using monocyte or macrophage cell lines, showing that the intracellular activity of the antistaphylococcal depends on the exposure time and the extracellular concentration of the mole-

Valour et al.



**FIG 3** Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on the intraosteoblastic emergence of small-colony variants. The change in the number of intracellular CFU ( $\Delta\log$  CFU; means and 95% CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of  $1.8 \times 10^6$  (95% CI =  $1.4 \times 10^6$  to  $2.1 \times 10^6$ ) for 100,000 osteoblasts, was compared to untreated cells (Mann-Whitney U-test). The dose effect was assessed using linear regression between the three used concentrations. CI, confidence interval; SCV, small-colony variants; \*,  $P < 0.05$ .

cules tested, which emphasizes the importance of using therapeutic bone concentrations (35). As in the present work, these studies have also highlighted a superiority of fluoroquinolones on internalized bacteria and the inefficiency of vancomycin in macrophages (35–37). Finally, animal models have also been used to evaluate the intracellular activity of antistaphylococcal molecules. In a mouse model of staphylococcal peritonitis, Sandberg et al. classified the intracellular activity of antimicrobials as follows: dicloxacillin > rifampin > gentamicin (38). However, a peritonitis model does not match the tissue reality of BJI, for which antibiotic diffusion problems is a major concern. In another mouse model of foreign-device infection, Murillo et al. confirmed the superiority of fluoroquinolones over  $\beta$ -lactam antibiotics in the eradication of intracellular *S. aureus* (39).

The interpretation of the results obtained for SCVs is more complex, since the observed results after 24 h of treatment is a balance between the emergence of these phenotypic variants, which can be promoted by the stress induced by the tested antibiotics themselves, and the efficacy of these same antibiotics on the

SCVs. A previous study has shown that most antibiotics were able to kill intracellular SCVs, depending on the concentration used (40). Using a therapeutic concentration, we showed that among intracellularly active antimicrobials, only ofloxacin was able to limit the intracellular emergence of SCVs. Finally, an accurate definition of SCV, involving not only colony size but also metabolism markers, for example, is lacking and may have helped to more precisely describe these variants.

Some limitations of our study must be addressed. First, only one *S. aureus* reference strain was tested, which may represent a limitation to the extrapolation of our results to different clinical isolates. Moreover, it would have been interesting to assess the intracellular concentrations of antibiotics, which was not technically feasible in our laboratory. Nevertheless, as mentioned above, only a subcellular pharmacodynamics analysis would have been relevant, taking into account both the intracellular location of bacteria and antimicrobials. Thus, the binding of each antimicrobial to culture medium proteins was not considered and may have impacted the available amount of antibiotic for intracellular dif-

fusion. However, this parameter is rarely taken into account in bone diffusion studies in the literature. Consequently, the choice of concentrations used in our study is most likely the most relevant according to current pharmacological knowledge. Finally, antimicrobials were added after a 2-h period of cell infection. However, Ellington et al. showed that the intracellular antibiotic activity decreased when staphylococci persisted for 12 h intracellularly before treatment, likely due to a change in the bacterial cell wall (22). In addition, the short duration of treatment (24 h) can explain why antibiotics with a slow bactericidal effect, such as vancomycin, showed no significant activity in our model. A similar study using various infection and treatment periods could be interesting to confirm these results under our experimental conditions. Similarly, the use of such models will be very interesting regarding the evaluation of SCV, since their emergence can be impacted by the duration of intracellular persistence (14) and likely by the length of contact with antibiotics.

In conclusion, our results provide the first assessment of the intraosteoblastic activity of a large panel of antimicrobial used in BJI, as evaluated at therapeutic bone concentrations. Ofloxacin exhibited the best therapeutic pattern, with an excellent intracellular activity while limiting the emergence of SCVs. These data provide a basis for refining the choice of antibiotics to prioritise in the management of difficult-to-treat *S. aureus* BJI. For instance, our results justify and promote the combination a fluoroquinolone due to its good intracellular activity with an already well-known anti-biofilm molecule, such as rifampin.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The Lyon Bone and Joint Infection Study Group includes physicians (Florence Ader, François Biron, André Boibieux, Anissa Bouaziz, Evelyne Braun, Christian Chidiac, Fatiha Daoud, Tristan Ferry, Judith Karsenty, Johanna Lippman, Patrick Mialhes, Thomas Perpoint, Dominique Peyramond, Marie-Paule Vallat, and Florent Valour), surgeons (Cédric Barrey, Pierre Breton, Fabien Boucher, Romain Desmarchelier, Michel-Henry Fessy, Olivier Guyen, Christophe Lienhart, Sébastien Lustig, Alain-Ali Mojallal, Philippe Neyret, Franck Trouillet, Gualter Vaz, and Antony Viste), microbiologists (Frédéric Laurent, Jean-Philippe Rasigade, and François Vandenesch), specialists in nuclear medicine (Emmanuel Deshayes, Francesco Giammarile, Marc Janier, and Isabelle Morelec), PK/PD specialists (Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle, and Michel Tod), and a clinical research assistant (Eugénie Mabrut).

This study was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Groupement Inter-Regional à la Recherche Clinique et à l'Innovation (GIRCI-D50829 [J.P.R.]), and bioMérieux (F.V.). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

#### REFERENCES

1. Lew DP, Waldvogel FA. 2004. Osteomyelitis *Lancet* 364:369–379.
2. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. 2004. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 351:1645–1654. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra040181>.
3. Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520–532. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>.
4. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J. 2005. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr Infect Dis Rep* 7:420–428. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-005-0043-8>.
5. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. 2008. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:13–22. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x>.
6. Hall-Stoodley L, Stoodley P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11:1034–1043. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>.
7. Sanchez CJ, Jr, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 13:47. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-47>.
8. Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK. 2005. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis: a case report. *J Bone Joint Surg Am* 87:1343–1347.
9. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. 1999. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 26:317–323. <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.1999.0272>.
10. Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Williams AS, Nousiainen MT. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 19:409–419. <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.1995.0075>.
11. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, Ranfaing J, Badiou C, Benito Y, Bes M, Couzon F, Tigaud S, Lina G, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F. 2013. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS One* 8:e63176. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063176>.
12. Valour F, Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Gagnaire J, Bouaziz A, Karsenty J, Lacour C, Bes M, Lustig S, Bénét T, Chidiac C, Etienne J, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F, Lyon BJI Study Group. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin Microbiol Infect*, in press.
13. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20:95–102. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/20.1.95>.
14. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Loffler B. 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 3:129–141. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201000115>.
15. 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–S33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.006>.
16. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, Hanssen A, Wilson WR. 2013. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 56:e1–e25. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis803>.
17. Saginur R, Stdenis M, Ferris W, Aaron SD, Chan F, Lee C, Ramotar K. 2006. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 50:55–61. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.50.1.55-61.2006>.
18. Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, Milz S. 2004. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* 24:3743–3748.
19. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sorgel F. 2009. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet* 48:89–124. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-200948020-00002>.
20. Montange D, Berthier F, Leclerc G, Serre A, Jeunet L, Berard M, Muret P, Vettoretti L, Leroy J, Hoen B, Chirouze C. 2014. Penetration of daptomycin into bone and synovial fluid in joint replacement. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3991–3996. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02344-14>.
21. Cai Z, Chattopadhyay N, Liu WJ, Chan C, Pignol JP, Reilly M. 2011. Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: comparison with manual counting. *Radiat Biol* 87:1135–1146. <http://dx.doi.org/10.3109/09553002.2011.622033>.
22. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. 2006. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* 24:87–93. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.20003>.
23. Mélard A, Garcia LG, Das D, Rozenberg R, Tulkens PM, Van Bambeke F, Lemaire S. 2013. Activity of ceftaroline against extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) forms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison with vancomycin, linezolid and dap-

- tomylin. *J Antimicrob Chemother* 68:648–658. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks442>.
24. Fraunholz M, Sinha B. 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* 2:43. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00043>.
  25. Beauchamp D, Gourde P, Simard M, Bergeron MG. 1992. Subcellular localization of tobramycin and vancomycin given alone and in combination in proximal tubular cells, determined by immunogold labeling. *Antimicrob Agents Chemother* 36:2204–2210. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.36.10.2204>.
  26. Maderazo EG, Breaux SP, Woronick CL, Quintiliani R, Nightingale CH. 1988. High teicoplanin uptake by human neutrophils. *Chemotherapy* 34:248–255. <http://dx.doi.org/10.1159/000238576>.
  27. Easmon CS, Crane JP. 1984. Cellular uptake of clindamycin and lincomycin. *Br J Exp Pathol* 65:725–730.
  28. García I, Pascual A, Ballesta S, Perea EJ. 2000. Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Int J Antimicrob Agents* 15:201–205. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00161-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00161-8).
  29. Höger PH, Vosbeck K, Seger R, Hitzig WH. 1985. Uptake, intracellular activity, and influence of rifampin on normal function of polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 28:667–674. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.28.5.667>.
  30. Carryn S, Chanteux H, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F, Tulkens PM. 2003. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin North Am* 17:615–634. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520\(03\)00066-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00066-7).
  31. Lemaire S, Olivier A, Van Bambeke F, Tulkens PM, Appelbaum PC, Glupczynski Y. 2008. Restoration of susceptibility of intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams: comparison of strains, cells, and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2797–2805. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00123-08>.
  32. Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM. 2007. Role of acidic pH in the susceptibility of intraphagocytic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to meropenem and cloxacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1627–1632. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01192-06>.
  33. Lemaire S, Fuda C, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mobashery S. 2008. Restoration of susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactam antibiotics by acidic pH: role of penicillin-binding protein PBP 2a. *J Biol Chem* 283:12769–12776. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M800079200>.
  34. Kreis CA, Raschke MJ, Roßlenbroich SB, Tholema-Hans N, Löffler B, Fuchs T. 2013. Therapy of intracellular *Staphylococcus aureus* by tigecycline. *BMC Infect Dis* 13:267. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-267>.
  35. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2006. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 50:841–851. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.50.3.841-851.2006>.
  36. Brinch KS, Tulkens PM, Van Bambeke F, Frimodt-Møller N, Hoiby N, Kristensen HH. 2010. Intracellular activity of the peptide antibiotic NZ2114: studies with *Staphylococcus aureus* and human THP-1 monocytes, and comparison with daptomycin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 65:1720–1724. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq159>.
  37. Lemaire S, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC, Glupczynski Y, Van Bambeke F, Tulkens PM. 2011. Activity of moxifloxacin against intracellular community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison with clindamycin, linezolid and co-trimoxazole and attempt at defining an intracellular susceptibility breakpoint. *J Antimicrob Chemother* 66:596–607. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq478>.
  38. Sandberg A, Hessler JHR, Skov RL, Blom J, Frimodt-Møller N. 2009. Intracellular activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1874–1883. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01605-07>.
  39. Murillo O, Pachón ME, Euba G, Verdaguier R, Carreras M, Cabellos C, Cabo J, Gudiol F, Ariza J. 2009. Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection caused by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 64:1062–1066. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp326>.
  40. García LG, Lemaire S, Kahl BC, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2012. Pharmacodynamic evaluation of the activity of antibiotics against hemin- and menadione-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in models of extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) infections. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3700–3711. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00285-12>.

## 4.1 Quatrième article: Rapid bench identification of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A multicenter comparative evaluation of Alere PBP2a Culture Colony Test (Alere) Versus Slidex MRSA detection (bioMérieux)

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 85 (2016) 419–421



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)

### Rapid bench identification of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A multicenter comparative evaluation of Alere PBP2a Culture Colony Test (Alere) Versus Slidex MRSA detection (bioMérieux)



Jason Tasse <sup>a,\*</sup>, Céline Dupieux <sup>a</sup>, Jocelyne Caillon <sup>b</sup>, Philippe Lanotte <sup>c</sup>, Brigitte Lamy <sup>d</sup>, Nejla Aissa <sup>e</sup>, Pascale Bemer <sup>b</sup>, Laurent Mereghetti <sup>c</sup>, Anne-Laure Michon <sup>d</sup>, Alain Lozniewski <sup>e</sup>, Michèle Bes <sup>a</sup>, Sophie Trouillet-Assant <sup>a</sup>, Frédéric Laurent <sup>a</sup>

<sup>a</sup> French National Reference Centre for Staphylococci, International Centre for Infectology Research – Inserm U1111, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>b</sup> Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France

<sup>c</sup> Service de Bactériologie-Virologie- Hygiène hospitalière, CHRU de Tours, Université François Rabelais de Tours, UMR1282 ISP, F-37032 Tours, France

<sup>d</sup> Hôpital Arnaud de Villeneuve - CHU de Montpellier, France

<sup>e</sup> Hôpital Central - CHU de Nancy, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 12 January 2016

Received in revised form 11 March 2016

Accepted 10 April 2016

Available online 12 April 2016

##### Keywords:

*Staphylococcus aureus*

Methicillin resistance

Rapid tests

Susceptibility testing

PBP2a

#### ABSTRACT

Using 30 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* representative of the most prevalent clones circulating in France, the performance of the Alere™ PBP2a Culture Colony Test (CCT) and the Slidex® MRSA detection kit (SMD) were compared in 5 different labs. CCT demonstrated better performance and was easier to conduct in routine.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a significant pathogen causing both health-care-associated and community-acquired infection. Rapid accurate detection of methicillin resistance in clinical *S. aureus* isolates is pivotal for the early choice or adaptation of appropriate antimicrobial therapy and for the control of nosocomial spread (Calfee et al., 2008). Methicillin resistance is conferred by the *mecA* gene encoding penicillin binding protein 2a (PBP2a), an additional protein with low affinity for beta-lactams except ceftaroline and ceftobiprole. The conventional antimicrobial susceptibility tests, using disk diffusion or automated microbroth dilution system, are classically used to determine methicillin resistance on colonies on primary plates, but require overnight incubation. Alternative molecular tests have been

proposed, providing results in less than two hours; however, cost, equipment requirements and the need for specific technical expertise and training have limited widespread routine use. Detection of PBP2a by tests using monoclonal antibodies directed against the protein now enables direct routine bench detection of MRSA (Sakoulas et al., 2001).

Two assays available in clinical practice were compared in the present study: the Slidex® MRSA detection kit (SMD, bioMérieux, Craponne, France) and the Alere™ PBP2a Culture Colony Test (CCT; Alere Ltd, Stockport, UK). SMD is an immunologic agglutination test consisting of latex particles coated with monoclonal antibodies against PBP2a. According to the manufacturer's recommendations, the test must be performed on colonies after subculture of primary isolation on blood agar. After an extraction step including boiling and centrifugation, 50 µL of supernatant was mixed with 2 drops of latex particles (sensitized latex and negative control latex); results are available within 20 minutes. CCT is an immunochromatographic membrane assay which allows rapid detection (5 minutes) of PBP2a directly from colonies grown on primary isolation media. The kit is validated for colonies grown on Tryptone Soy Agar with 5% sheep blood, Columbia agar with 5% sheep blood and Mueller Hinton Agar. Antibodies against PBP2a

\* Corresponding author. Tel.: +334-72-00-37-70; fax: +334-70-07-18-42.

E-mail address: [jason.tasse@chu-lyon.fr](mailto:jason.tasse@chu-lyon.fr) (J. Tasse).

<sup>1</sup> Mailing address: Laboratoire de Bactériologie, Groupement Hospitalier Nord; Centre National de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France.

**Table 1**Comparison of the analytical performance of CCT (Alere) and SMD (bioMérieux) for the detection of the methicillin resistance in *S. aureus* ( $n = 30$ ) and the qualitative perception of both tests.

		Centers						Mean
		Test	Hospices Civils de Lyon	CHU de Nantes	CHRU de Tours	Hôpital Arnaud Villeneuve	Hôpital Central Nancy	
Analytical study (%)	Sensitivity	CCT	100	100	100	100	100	<b>100</b>
		SMD	75	70	100	100	90	<b>87</b>
	Specificity	CCT	100	100	100	100	100	<b>100</b>
		SMD	100	100	100	100	100	<b>100</b>
Qualitative perception study (scale 0–10)	"Ease of use"	CCT	9.4	9.3	9.8	9.7	9.7	<b>9.6</b>
		SMD	6.2	5.7	6.7	2.7	4.5	<b>5.1</b>
		Mann–Whitney test (P value)						<0.0001
	"Turn around time"	CCT	9.8	9.3	9.7	8.5	9.2	<b>9.3</b>
		SMD	4.2	3.7	4.3	5.0	2.2	<b>2.9</b>
		Mann–Whitney test (P value)						<0.0001
	"Ease of interpretation"	CCT	9.2	9.3	10	9.2	9.7	<b>9.5</b>
		SMD	6.0	4.8	7.0	5.5	6.3	<b>5.9</b>
		Mann–Whitney test (P value)						<0.0001
	"Total technical acceptability"	CCT	9.6	9.5	10	8.0	10	<b>9.4</b>
		SMD	5.0	3.8	5.3	0	2.0	<b>4.0</b>
		Mann–Whitney test (p value)						<0.0001
Mean		CCT	<b>9.5</b>	<b>9.4</b>	<b>9.9</b>	<b>8.9</b>	<b>9.7</b>	<b>9.5</b>
		SMD	<b>5.4</b>	<b>4.5</b>	<b>5.8</b>	<b>3.3</b>	<b>3.8</b>	<b>4.5</b>
		Mann–Whitney test (p value)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

and a control antibody are immobilized onto a nitrocellulose membrane as two distinct lines and combined with a sample pad to form a test strip. The aim of the present study was to compare the performance and practicability of these two tests using a set of MSSA and MRSA isolates.

Five clinical microbiology laboratories participated in the evaluation (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; CHU de Nantes, Nantes, France; CHRU de Tours, Tours, France; Hôpital Arnaud Villeneuve, Montpellier, France; and Hôpital Central, Nancy, France). A set of MSSA ( $n = 10$ ) and MRSA isolates ( $n = 20$ ) representative of the 15 most prevalent clones circulating in France (2 strains randomly chosen per clone) was constituted using clinical isolates from the 2013–2014 collection of the French National Reference Center for staphylococci (Table S1). Methicillin resistance status was confirmed using an in-house *mecA* PCR (Killgore et al., 2000). The genetic backgrounds of the strains were determined using DNA microarray (Staphytype® Alere Technologies GmbH, Jena, Germany). The 30 strains were sent anonymously to the 5 labs. Prior to assay, they were subcultured onto Columbia agar with 5% sheep blood with overnight incubation at 36 °C, and then tested under blind conditions by 6 technicians in each of the 5 labs. To avoid interpretation bias of the CCT and SMD tests, each technician randomly tested 5 of the 30 isolates using CCT and 5 other isolates using SMD according to the manufacturer's instructions. To complement the analytical study, the perceived technical quality of the two tests was also assessed, in terms of ease of use, turn-around time, ease of interpretation and overall acceptability in the routine workflow; each of these items was scored on a 0 (minimum) to 10 (maximum) scale by the technicians who had performed the tests. The average of the four items was calculated in each center then globally for the five centers.

All MSSA strains were correctly identified by all the technicians in each laboratory, using either CCT or SMD: i.e., 100% specificity for both tests (Table 1). All MRSA strains were correctly categorized using the CCT, by all laboratories. Conversely, the rate of correct MRSA identification using SMD ranged from 70% to 100%, depending on the laboratory (Table 1). Use of SMD in routine would have induced up to 30% misidentification of MRSA (95% confidence interval, 7.71–38.57) in three centers. Compiling all data from the 5 labs, overall sensitivity and specificity of CCT and SMD were 100% and 100%, 87% and 100%,

respectively. Interestingly, the misidentified MRSA strains were different for each center, suggesting issues related to the use of the test rather than to specific features of the isolates (no correlation between false negative results and clonal complex or ceftoxitin MIC of the strains).

Regarding qualitative perception of the two tests, CCT scored significantly higher than SMD on all criteria (Table 1). SMD obtained low total scores, ranging from 13.2/40 to 23.3/40, whereas CCT obtained high total scores, ranging from 35.4/40 to 39.5/40. This was likely related to the SMD protocol, requiring centrifugation and a boiling step, longer time-to-result than CCT, and difficulties of interpretation of agglutination.

Recently, data published by the Belgian Reference Center for Staphylococci showed equal good performance for the detection of low-level methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (cryptic MRSA) with both CCT and SMD (Nonhoff et al., 2012). It is noteworthy that, in this study, evaluation was performed by highly specialized technicians in a specific context (National Reference lab, dedicated study) which was not truly representative of the use of the tests in the routine context as in the present study. Additionally, the single published study evaluating the use of CCT reported good performance in a large monocentric prospective study including 661 clinical *S. aureus* isolates (Trienski et al., 2013). Concerning the SMD test, sensitivity varies from 86.4% to 100% and specificity from 60% to 100% (Acosta-Perez et al., 2012; Hamdad et al., 2006; Hamze et al., 2003; Kaur et al., 2012; Torres et al., 2008). The differences reported from one study to another highlight the importance of multicenter studies, taking account of the diversity of practical implementation of this test.

In conclusion, the present study demonstrated that CCT was specific and sensitive for the detection of PBP2a in *S. aureus*, unlike SMD. This rapid bench assay required no specific equipment or training and can be easily executed in any laboratory by any technician. The time-to-result of 5 minutes, in combination with *S. aureus* agglutination assay for quick species identification, is especially useful for specific specimens (bronchoalveolar lavage, blood culture) and/or specific populations such as intensive-care-unit or immunocompromised patients. Implementation of CCT is likely not required in all cases, but should rather be reserved for patients for whom early targeted antimicrobial chemotherapy is pivotal for outcome. By contrast, the sensitivity of

SMD appears to be highly technician-dependent, suggesting issues in implementation and interpretation and deficient robustness which only multicenter studies can reveal.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.008>.

#### Acknowledgments

We wish to thank all technicians participating in the study for excellent technical expertise.

#### References

- Acosta-Perez G, Rodriguez-Abrego G, Longoria-Revilla E, Castro-Mussot ME. Evaluation of four methods for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens at a regional hospital in Mexico. *Salud Publica Mex* 2012;54:1–6.
- Calfee DP, Salgado CD, Classen D, Arias KM, Podgorny K, Anderson DJ, et al. Strategies to prevent transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(Suppl 1):S62–80.
- Hamdad F, Donda F, Laurans G, Canarelli B, Rousseau F, Biendo M, et al. Performance of different methods of oxacillin resistance detection in atypical strains of *Staphylococcus aureus*. *Pathol Biol (Paris)* 2006;54:447–52.
- Hamze M, Dabboussi F, Daher W, Izard D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* at north Lebanon: place of the methicillin resistance and comparison of detection methods. *Pathol Biol (Paris)* 2003;51:21–6.
- Kaur R, Oberoi L, Aggarwal A. Comparative evaluation of Latex agglutination method with other phenotypic methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Microbiol* 2012;30:252–3.
- Killgore GE, Holloway B, Tenover FC. A 5' nuclease PCR (TaqMan) high-throughput assay for detection of the *mecA* gene in staphylococci. *J Clin Microbiol* 2000;38:2516–9.
- Nonhoff C, Roisin S, Hallin M, Denis O. Evaluation of Clearview Exact PBP2a, a new immunochromatographic assay, for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LL-MRSA). *J Clin Microbiol* 2012;50:3359–60.
- Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* 2001;39:3946–51.
- Torres E, Perez S, Villanueva R, Bou G. Evaluation of the vitek 2 AST-P559 card for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2008;46:4114–5.
- Trienski TL, Barrett HL, Pasquale TR, DiPersio JR, File Jr TM. Evaluation and use of a rapid *Staphylococcus aureus* assay by an antimicrobial stewardship program. *Am J Health Syst Pharm* 2013;70:1908–12.



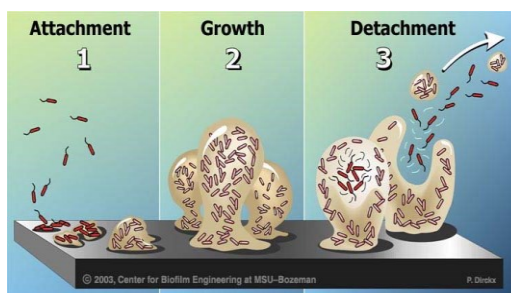
## 4.2 Protocole de l'étude clinique prospective

**DEMONSTRATION DE LA VALEUR CLINIQUE DU TEST  
ANTIBIOFILMOGRAMME® DANS LES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES  
(IOA) A STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

### 1. Justification de l'étude

#### Etat de l'art sur les Biofilms

Les bactéries se caractérisent par deux modes de vie radicalement différents : le mode planctonique et le mode sessile. Le premier correspond à une population bactérienne libre et isolée en suspension dans un environnement liquide. Un passage en mode sessile s'opère dès que la communauté bactérienne commence à se fixer sur un support solide et sécrète des substances visqueuses pour former un biofilm (408). C'est en 1978 que John William Costerton a proposé le terme de biofilm en suggérant que ce serait le mode de vie naturel de la plupart des micro-organismes (409).



*Figure : Séquence de développement du biofilm en trois phases : étape d'adhésion au support, étape de croissance (développement de microcolonies et synthèse de la matrice) et étape de détachement des cellules et retour à l'état planctonique (Center for Biofilm Engineering, Bozeman, Montana, USA, 2003).*

Le passage en mode biofilm a fréquemment lieu chez la plupart des espèces selon une dynamique propre à chaque souche, définissant un caractère souvent relié à sa virulence et pouvant être modulé voire induit par le traitement antibiotique lui-même ou par d'autres situations de stress (410,411). Les biofilms sont connus pour être très résistants aux traitements antibiotiques et sont suspectés d'être en grande partie responsables des échecs thérapeutiques, des infections sur prothèse et sur matériel médical (cathéters veineux-centraux, chambres implantables, etc...)(412).

Les biofilms pathogènes sont impliqués dans une large gamme de maladies infectieuses : 65 % des infections recensées chez l'Homme dans les pays développés sont causées ou entretenues par des biofilms, et plus de 80% des infections bactériennes chroniques le sont (413). Le National Institute of Health (NIH) rapporte également que 80% des maladies

infectieuses sont causées par des organismes dans un état biofilm et que les biofilms sont la principale cause de certaines infections chroniques pulmonaires qui sont plus difficiles à traiter que les infections classiques (410).

A ce jour, le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la valeur de la plus petite concentration en antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance d'une *bactérie* (CMI). La CMI explore donc l'effet bactériostatique ou bactéricide des bactéries planctoniques. L'antibiogramme qui est le système de diagnostic largement utilisé pour déterminer le traitement antibiotique probabiliste est efficace mais doit faire face à certaines limites :

- Le comportement biofilm des germes est non visible ;
- L'hétérogénéité d'interprétations sensibilité / intermédiaire / résistance (S/I/R) entre pays rend les résultats difficilement exploitables dans certains cas ;
- la révision régulière des concentrations critiques par l'EUCAST ou équivalent.

En conséquence, il apparaît nécessaire que les tests antibiogrammes évoluent pour prendre en compte ce caractère biofilm.

#### **Etat de l'art des antibiogrammes actuels**

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans le but d'adapter au mieux l'antibiothérapie dans un contexte infectieux. Il s'agit d'un traitement probabiliste. Les techniques de réalisation des antibiogrammes n'ont cessé d'évoluer depuis une vingtaine d'années avec les progrès de l'automatisation. Ceci a permis de diminuer les temps d'attente dans une optique d'optimisation de la qualité des soins, mais également de tenter de standardiser au mieux les antibiogrammes.

Les techniques conventionnelles n'ont pas disparu pour autant, comme la méthode de Kirby-Bauer (analyse multi variée des diamètres des zones d'inhibition). Cette méthode est attractive car elle est facilement réalisable par le laboratoire puisqu'elle ne demande pas d'équipement sophistiqué et exploite souvent les données provenant directement des analyses de routine. Cependant, son désavantage majeur est son caractère éminemment manuel.

Les tests antibiogrammes doivent constamment s'adapter aux évolutions des concentrations critiques établies par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Ces concentrations tendent à diminuer de façon à générer une réponse claire « R » ou « S » sans catégorie « intermédiaire », très problématique à intégrer dans la prescription de l'antibiothérapie.

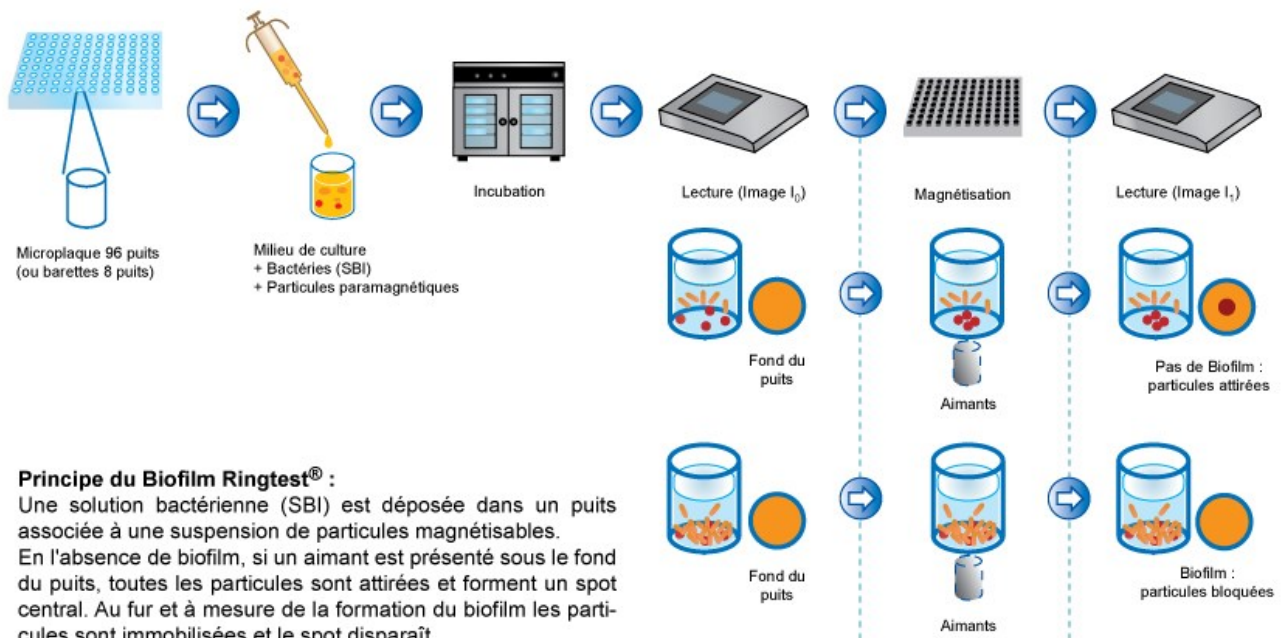
De toutes les méthodes Antibiogrammes validées et utilisées en laboratoires aucune ne prend en compte le comportement *biofilm* des organismes étudiés.

#### **Etat de l'art sur le BioFilm Ring Test® et le système VITEK®**

Le BioFilm Ring Test® (BFRT) développé par BioFilm Control, fonctionne en format microplaque 96 puits (standard ANSI/SBS – American National Standard Institute / Society

for Biomolecular Screening). Ce test permet d'évaluer l'activité des antibiotiques sur l'installation des microorganismes en biofilm. Son principe est de visualiser le déplacement macroscopique de microbilles magnétisables le long d'une surface sous l'action d'un aimant. Ce déplacement est modulé par la présence d'obstacles microscopiques (bactéries), par la viscosité à proximité de la surface (induite par les macromolécules incluses dans le biofilm), par des interactions moléculaires et la viscoélasticité de la surface (l'adsorption de macromolécules sécrétées par les bactéries).

Le BFRT a été validé scientifiquement par 13 publications scientifiques et est utilisé par plus de 30 équipes INSERM, CNRS, Universitaires, INRA... françaises et internationales (414). Ce test a été décrit de façon indépendante comme étant le plus sensible pour détecter le comportement biofilm (415).



Chavant et al. (2007) J Microbiol Methods 68:605-612

Figure : Présentation graphique du BioFilm Ring Test®

Le BFRT permet la possibilité d'une première lecture antibiogramme en dilution conventionnelle suivi d'une 2<sup>e</sup> lecture complémentaire sur le comportement biofilm, apportant donc un complément d'information précieux et innovant sans imposer au milieu médical (414) une rupture pure et simple. En plus de l'information biofilm, la technologie BFRT donne le plus souvent des résultats en moins de 6 heures et laisse donc déjà entrevoir la possibilité de réduire les délais de rendu de résultats pour la validation du choix d'antibiotiques, qui aujourd'hui dépassent souvent les 8 heures, voire 24 heures si les résultats interviennent en dehors des heures de travail ouvrés.

A ce jour, c'est la seule technique « biofilm » industrialisable, automatisable, permettant d'apporter une information nouvelle sur le comportement biofilm (adhésion rapide, lente, intermittente...) avec la possibilité d'un gain de temps. C'est la seule technologie « biofilm » pouvant entrer dans les laboratoires d'analyses médicales (hospitaliers ou de ville).

Partenaire du projet FUI BIOFILM, la société bioMérieux commercialise la technologie VITEK®2, largement éprouvée, qui fournit les résultats antibiogrammes standards en 8-10h en moyenne. Cette technologie utilise un format spécial, des cartes contenant un circuit micro-fluidique alimentant 64 cellules contenant les antibiotiques testés. La technologie Vitek®2 réduit les tâches de préparation et de standardisation de l'inoculum pour le microbiologiste, en gérant les phases d'incubation et de lecture, ainsi qu'en garantissant l'entière traçabilité au moyen de codes-barres prédéfinis.

Sur le plan pratique, la technologie BFRT peut s'intégrer parfaitement à la technologie VITEK®, permettant d'obtenir des résultats de caractérisation des germes, d'antibiogramme et de comportement biofilm en moins de 6 heures, ce qui correspond à un avantage clé si l'on considère que les résultats de l'antibiogramme sur VITEK® 2 peuvent être disponibles à partir de 5 heures (temps moyen : 8-10 heures).

### **Description générale de la recherche**

Ce projet se place dans un contexte de multiplication des cas de résistances aux antibiotiques (416) et de rareté des nouveaux antibiotiques mis sur le marché. Il est donc crucial d'optimiser les recommandations en antibiothérapie apportées aux praticiens.

Il est bien établi à ce jour que les bactéries présentent deux comportements : planctonique et biofilm (417,418). Le premier correspond à une population bactérienne libre et isolée dans un environnement liquide. Le deuxième s'opère dès que les bactéries commencent à se fixer sur un support solide et sécrètent des substances visqueuses pour former un biofilm. Les bactéries en mode biofilm sont plus résistantes aux agressions extérieures notamment aux biocides et aux antibiotiques. Dans le domaine de la santé, les biofilms se développent sur de très nombreuses surfaces tels les cathéters, les valves, les prothèses... mais aussi les dents, la peau, les muqueuses...

Le praticien dispose seulement d'informations sur le comportement planctonique testé avec les antibiogrammes actuellement disponibles.

Concernant les biofilms, la littérature indique qu'une fois installé, ils peuvent être éradiqués par des doses antibiotiques de l'ordre  $\times 100$  à  $\times 1000$  (417,418), mais ce n'est pas exploitable en antibiothérapie. Par contre, autour des doses thérapeutiques, des effets d'induction de comportement biofilm avec des conséquences sur la durée de rémission et/ou sur la récurrence puis l'entrée en chronicité, et *in fine* sur le développement de résistances, sont bien documentées (414,419–423).

***Pour toutes ces raisons, le praticien, qu'il soit microbiologiste ou clinicien, souhaiterait disposer d'informations sur ce comportement biofilm.***

Pour répondre à ce besoin, la société BioFilm Control apporte une solution technologique nouvelle, le BioFilm Ring Test® (424) et son application en diagnostic *in vitro* appelée antibiofilmogramme®.

- L'antibiofilmogramme® permet d'évaluer l'efficacité des antibiotiques à inhiber l'installation des microorganismes en biofilm. C'est un test phénotypique, le résultat sera correct même si une mutation nouvelle est à l'origine d'un nouveau type de résistance, ce qui est un avantage clé par rapport aux tests génotypiques.
- L'antibiofilmogramme® peut donner un résultat en moins de 6 heures. Ce gain de temps est un critère important dans un contexte où les analyses sont de plus en plus centralisées et réalisées en masse.

### Hypothèses principales

L'installation et le développement de biofilm bactérien *in vitro* en présence d'antibiotique sont corrélés à une moindre efficacité de l'antibiotique chez le patient. Parmi les antibiotiques pour lesquels une souche pathogène est sensible en phénotype planctonique selon les tests usuels, certains induisent une installation en biofilm. Les antibiotiques capables d'empêcher l'installation en biofilm présenteraient donc un avantage en antibiothérapie (meilleur temps de rémission, moins de risque de récurrence...), permettant d'améliorer les recommandations apportées au clinicien.

## 2. Objectifs principaux et secondaires

### Objectif principal

- Etablir une concordance en cas de succès thérapeutique ou d'échec thérapeutique entre les antibiotiques prescrits au patient et les antibiotiques recommandés sur la base d'un test dénommé Antibiofilmogramme®. En cas de récurrence après ou en cours de traitement nécessitant une nouvelle intervention chirurgicale, le prélèvement réalisé sur site infectieux sera utilisé pour déterminer si la souche responsable de la récurrence est bien identique à la souche d'origine (indiquant une rechute de l'infection), ou si elle correspond à une nouvelle infection (indiquant une "super-infection").

### Objectifs secondaires

- Apporter une information complémentaire à celle apportée par l'antibiogramme, portant sur la capacité des souches cliniques de *S. aureus* issues d'IOA à former du biofilm en présence d'antibiotiques.
- Etablir une tendance de résistance / sensibilité aux antibiotiques pour la formation de biofilms sur les souches cliniques de *S. aureus*

## 3. Dose, durée

Non applicable

## 4. Plan expérimentale, méthodologie

Il s'agit d'une étude prospective observationnelle multicentrique incluant l'ensemble des patients des services d'orthopédie des CHUs de Lyon, Clermont-Ferrand, Grenoble,

Nîmes et Strasbourg présentant une infection monomicrobienne à *S. aureus* sur prothèse de hanche ou de genou, ou sur matériel d'ostéosynthèse.

**L'inclusion d'un patient dans l'étude n'impactera pas la prise en charge usuelle effectuée par les services (pas de consultation ou prélèvement additionnel, durée de suivi identique) puisqu'il ne s'agira que d'un recueil des souches isolées à partir des prélèvements réalisés dans le cadre des soins courants.**

Démarche :

- Vérification de l'adéquation des caractéristiques du patient avec les critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude.
- Recueil des données cliniques, biologiques et bactériologiques nécessaires à partir du dossier clinique.
- Repiquage, conservation et expédition de la souche clinique responsable de l'infection. Lors de chaque visite (initiale, ou suite à un échec thérapeutique), un prélèvement sera effectué selon les procédures habituelles à chaque centre pour identification et antibiogramme. Les souches de *S. aureus* utilisées pour effectuer cet antibiogramme sont ensuite envoyées à BioFilm Control et à bioMérieux (partenaire du projet FUI Biofilm) en temps réel ( $\pm 2$  jours) par transporteur (il s'agit des boîtes de Pétri en triple-emballage selon les procédures en vigueur et à température ambiante).

BioFilm Control

Rue E. Duclaux

Biopole Clermont-Limagne

63360 SAINT-BEAUZIRE

bioMérieux

(à l'attention de Christine Franceschi)

3 route de Port Michaud

38390 LA BALME LES GROTTES

BioFilm Control effectuera les antibiofilmogrammes, de même que bioMérieux, et mettra les échantillons en biothèque en vue d'études ancillaires.

Un suivi des souches expédiées / réceptionnées / cryogénisées sera réalisé. Ces souches seront propriété de BioFilm Control (pilote du projet FUI BIOFILM et financeur de l'étude), et seront accessibles librement aux investigateurs.

- Recueil des informations relatives au suivi du patient, à partir du dossier clinique, dans le cadre des soins courants, selon le protocole habituel du praticien prenant en charge le patient.

## 5. Sélection

### Critères d'inclusion

Tout patient âgé d'au moins 18 ans ayant reçu le formulaire de non-opposition, et présentant une infection ostéo-articulaire sur matériel à *Staphylococcus aureus* répondant aux critères suivants :

- Signes cliniques, biologiques, radiologiques compatibles avec le diagnostic d'IOA
- Au moins 1 prélèvement bactériologique pré ou per-opératoire de référence positif à *Staphylococcus aureus*
- Infection monomicrobienne

Critères d'exclusion

- Infection pluri-microbienne
- IOA de contiguïté sur escarre, lésion vasculaire, mal perforant plantaire
- Patient participant ou ayant participé à une autre étude interventionnelle dans les 3 mois précédents ou patient en période d'exclusion déterminée par une étude précédente.
- Patient sous tutelle, curatelle ou sous sauvegarde de justice
- Patiente enceinte, parturiente, ou allaitante
- Impossibilité de donner au patient des informations éclairées
- Opposition à participer à l'étude
- Situation d'urgence empêchant le bon déroulement de l'étude

**6. Tolérance**

Non applicable

**7. Recueil d'information**

Les informations démographiques de base, les antécédents du patient, les caractéristiques de l'IOA, sa prise en charge médicale et chirurgicale seront recueillies à partir du dossier médical informatisé. L'antibiogramme de la souche sera recueilli à partir du logiciel de gestion des résultats biologiques.

L'ensemble des données seront collectées dans le dossier de recueil de données présenté en annexe.

**8. Procédure des arrêts prématurés**

Non applicable

**9. Statistique**

L'analyse sera conduite en lien avec le service biostatistique des HCL. Une différence sera considérée comme statistiquement significative lorsque le degré de signification du test sera inférieur ou égal à 0,05.

Il s'agit d'une étude de cohorte exposés – non-exposés pour étudier le rôle de la concordance entre l'antibiogramme et l'antibiofilmogramme® sur la présence/absence de souches de *S. aureus* en fin d'antibiothérapie (et par conséquent en fonction des antibiotiques prescrits).

Les patients seront divisés en trois groupes :

- Concordant : résultat de l'antibiogramme **Sensible** et antibiofilmogramme® **Sensible** pour au moins 1 antibiotique prescrit pendant les 7 jours suivant la chirurgie.
- Discordant : résultat de l'antibiogramme **Sensible** et antibiofilmogramme® **Résistant** pour l'ensemble des antibiotiques prescrits pendant les 7 jours suivant la chirurgie.
- Semi-concordant : tous les autres cas.

#### Nombre de sujets nécessaire

Le taux de concordance par antibiotique est très variable selon les antibiotiques testés: 5% à 95% (données du laboratoire non publiées), mais majoritairement supérieur à 40%. Nous attendons un effet de la concordance sur l'absence de *Staphylococcus aureus* à la fin de l'antibiothérapie relativement important mais pas chiffré pour le moment.

Cette étude est exploratoire ; cependant l'inclusion de 40 patients nous permettrait de mettre en évidence un risque relatif (probabilité d'absence de *Staphylococcus aureus* à la fin de l'antibiothérapie en cas de concordance / probabilité d'absence de *Staphylococcus aureus* à la fin de l'antibiothérapie en cas de discordance) égal à 2 pour un taux de concordance entre 43% (teicoplanine) et 71% (vancomycine) et un risque relatif égal à 3 pour un taux de concordance à 88% (érythromycine/acide fusidique), avec une puissance de 80% et un risque alpha bilatéral à 5%, en tenant compte de l'inclusion consécutive des patients, et en considérant un taux de patients avec données non exploitables de l'ordre de 10 à 15%.

#### Description de la population incluse et des principaux paramètres étudiés

Une première analyse des données permettra la description de la population totale et par groupe. La normalité de la distribution des variables quantitatives sera explorée à l'aide du test de normalité de Shapiro-Wilks, ainsi que des coefficients de Kurtosis et de Skewness.

Les résultats statistiques seront présentés sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types pour les variables quantitatives dont la distribution est gaussienne, moyennes et intervalles de confiance à 95% anti-transformés pour les variables dont la distribution est gaussienne après une transformation, et médianes et intervalles interquartiles pour les autres variables. Pour les variables qualitatives, les effectifs et les pourcentages associés seront présentés.

#### Comparaison initiale des groupes : analyse univariée

Les caractéristiques des patients à l'inclusion (: âge, sexe, IMC, caractéristique de l'IOA, prise en charge chirurgicale et médicale) seront comparées entre les groupes (concordance versus semi-concordance ou discordance). Les variables qualitatives seront comparées par un test du Chi-2. A défaut, si les conditions de réalisation de ce test ne sont pas respectées, le test exact de Fisher sera utilisé.

Les variables quantitatives seront comparées entre les deux groupes par une analyse de variance ; à défaut, si les conditions de réalisation de ces tests ne sont pas respectées, par un test de Kruskal-Wallis.

#### Analyse du critère de jugement principal



Le taux d'absence de *Staphylococcus aureus* à l'arrêt de l'antibiothérapie sera comparé entre les deux groupes (concordance versus semi-concordance ou discordance) par un test du Chi2 ou un test exact de Fisher. Le risque relatif sera estimé avec son intervalle de confiance à 95%.

Une analyse de sensibilité sera réalisée en considérant les semi concordances comme des concordances.

#### Analyse des critères de jugement secondaires

En cas d'échec de l'antibiothérapie, la communauté bactérienne présente sera décrite sur son potentiel à créer des biofilms par les méthodes descriptives classiques. Le taux de guérison de l'IOA après l'arrêt de l'antibiothérapie sera comparé entre les deux groupes (concordance versus semi-concordance ou discordance) par un test du Chi2 ou un test exact de Fisher. Le risque relatif sera estimé avec son intervalle de confiance à 95%.

Une analyse de sensibilité sera réalisée en considérant les semi concordances comme des concordances.

De nombreux facteurs pronostiques potentiels liés aux caractéristiques du patient et de l'IOA peuvent biaiser les résultats de cette analyse. Le faible effectif ne nous autorise pas à les prendre en compte par l'ajustement dans cette étude. Une comparaison des taux de guérison selon ces caractéristiques pourra être réalisée à titre exploratoire.

## 10. Référence bibliographique

- Anderl, J.N., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 1818–1824.
- Berild, D., Mohseni, A., Diep, L.M., Jensenius, M. & Ringertz, S.H. (2006) Adjustment of antibiotic treatment according to the results of blood cultures leads to decreased antibiotic use and costs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 326–330.
- Boles, B.R., Thoendel, M. & Singh, P.K. (2004) Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 16630–16635.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M. & Bernardi, T. (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 605–612.
- Costerton, J.W. (1999) Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 217–221; discussion 237–239.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. & Cheng, K.J. (1978) How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86–95.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2, 95–108.
- Haute Autorité de Santé. (2008) Clinical Practice Guidelines. Antibiotic therapy and prevention of bacterial resistance in healthcare organisations.
- Kaplan, J.B. (2011) Antibiotic-induced biofilm formation. *The International Journal of Artificial Organs*, 34, 737–751.
- Kerremans, J.J., van der Bij, A.K., Goessens, W., Verbrugh, H.A. & Vos, M.C. (2009) Immediate Incubation of Blood Cultures Outside Routine Laboratory Hours of Operation Accelerates Antibiotic Switching. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 3520–3523.
- Lebeaux, D. & Ghigo, J.-M. (2012) Infections associées aux biofilms: Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *MS. Médecine sciences*, 28, 727–739.
- Mah, T.F. & O’Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 34–39.
- Maugat, S., Thiolet, J.M., L’héritau, F., Gautier, C., Tronel, H., Metzger, M.H., Jarno, P., Lacavé, L. & Coignard, B. (2007) Prévalence des traitements antibiotiques dans les établissements de santé, France, 2006. *Bull Epidemiol Hebd*, 51, 432–437.
- Nagant, C., Tré-Hardy, M., El-Ouaaliti, M., Savage, P., Devleeschouwer, M. & Dehaye, J.-P. (2010) Interaction between tobramycin and CSA-13 on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a model of young and mature biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 251–263.
- National Institutes of Health (NIH). URL <http://www.nih.gov/> [accessed 24 September 2014]
- Rupp, M.E. & Hamer, K.E. (1998) Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 155–161.
- Thiolet, J.-M., Lacavé, L., Jarno, P., Metzger, M.-H., Tronel, H., Gautier, C., L’héritau, F. & Coignard, B. (2007) Prévalence des infections nosocomiales France 2006. *Hygiènes*, 15, 349–354.
- Turnidge, J. & Paterson, D.L. (2007) Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 391–408.

Version 02

CAHIER D'OBSERVATION

**« Démonstration de la valeur clinique du test  
Antibiofilmogramme<sup>®</sup> dans les Infections Ostéo-  
Articulaires (IOA) à *Staphylococcus aureus* »**

Numéro du patient : □□□□□□□□□□

N° CPP de la souche : □□□□□□□□□□

Version 02

## SOMMAIRE

Notice d'information .....	page2
Définitions.....	page2
Observations.....	pages 3 à 14
Signature CRF.....	page 14
Annexe 1 : calendrier de l'étude.....	page 15
Annexe 2 : auto-questionnaire d'observance (test de Morisky).....	page 16
Annexe 3 : Notice d'information au patient et formulaire de non opposition....	page 17

## NOTICE D'INFORMATION

- Ecrire de manière lisible au stylo bille à encre bleue ou noire
- Si une donnée est incorrecte, la barrer d'un trait horizontal en laissant lisible l'information erronée et écrire la donnée exacte à côté
- Les initiales du correcteur et la date de correction doivent figurer à côté de chaque correction
- La mention « vu avec » doit être apposée à la correction s'il a fallu demander l'information à une personne (médecin, infirmière, personnel de laboratoire)

## DEFINITIONS

- Prélèvement de référence : Prélèvement pré-opératoires (Hémocultures, ponction articulaire, ponction abcès, ponction disco-vertébrale), prélèvements per opératoires (Tissus mous, liquide articulaire, synoviale, tissus osseux)
- Observance : L'observance ou compliance est le respect par le patient des prescriptions de son médecin

Version 02

**1- Critères d'inclusion et d'exclusion**

**Critères d'inclusion**

	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
Le patient a au moins 18 ans		
Présence de matériel prothétique ou d'ostéosynthèse		
Présence de signes cliniques, biologiques, radiologiques compatibles avec une infection ostéo-articulaire		
Au moins 1 prélèvement bactériologique pré ou per opératoire de référence* positif à <i>Staphylococcus aureus</i>		
L'infection est monomicrobienne		

Si l'un des critères est FAUX, le sujet est non éligible

**Critères d'exclusion**

	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
Infection ostéo-articulaire sur escarre, lésion vasculaire, mal perforant plantaire		
L'infection est plurimicrobienne		
Patient participant à une autre étude interventionnelle ou patient en période d'exclusion déterminée par une étude précédente		
Patient sous tutelle, curatelle ou sous sauvegarde de justice		
Patiente enceinte, parturiente, allaitante		
Impossibilité de donner au patient des informations éclairées		
Opposition formulée		
Situation d'urgence empêchant le bon déroulement de l'étude		

Si l'un des critères est VRAI, le sujet est non éligible

Version 02

**2- Caractéristiques du patient**

Numéro Patient : ██████████

Sexe :  Femme     Homme

Année de naissance : █████

Poids : █████,██ kg

Taille █████ cm

IMC : ███,█

**Co-morbidité(s) :**

Pathologies			Points attribués
Tumeur solide métastatique	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	6
Maladie immuno-suppressive	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	6
Maladie hépatique modérée à sévère	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	3
Hémiplégie	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	2
Lymphome	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	2
Leucémie	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	2
N'importe quelle tumeur	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	2
Diabète avec atteinte d'un organe cible	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	2
Maladie rénale modérée à sévère	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	2
Insuffisance cardiaque congestive	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Maladie vasculaire périphérique	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
AVC	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Démence	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Maladie chronique pulmonaire	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Connectivite	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Maladie ulcéreuse	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Maladie hépatique légère	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Diabète	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Infarctus du myocarde aigu	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
Age			
50-60 ans	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	1
61-70 ans	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	2
71-80 ans	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	3
81-90 ans	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	4
plus de 90 ans	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	5

SOMME : ███

Version 02

### 3- Caractéristiques générales de l'IOA

**Type d'infection ostéo-articulaire**

- Infection sur prothèse articulaire
  - Genou
  - Hanche
  - Autre (préciser) : \_\_\_\_\_
  
- Infection sur matériel d'ostéosynthèse
  - Plaque
  - Fixateur externe
  - Vis
  - Autre (préciser) : \_\_\_\_\_

Date des premiers symptômes : / /

Date du diagnostic microbiologique : / /

Date de mise en place initiale du matériel : / /

Dernière chirurgie au site infecté avant le diagnostic d'IOA : / /

**Complications**

- Pour les ostéites / arthrites       Abscès       Fistule

### 4- Caractéristiques bactériologiques de l'IOA

Nature du prélèvement positifs	Réalisé	Positif	Nombre	Nombre
Hémocultures	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Ponction articulaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Ponction abcès	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Ponction disco-vertébrale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Prélèvements per opératoires	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Tissus mous	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Liquide articulaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Synoviale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____
Tissus osseux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____	_____

Version 02

Antibiogramme réalisé  Oui  Non

Type d'antibiogramme :  Vitek  Par diffusion

Prélèvement de la souche isolée : \_\_\_\_\_

N° GLIMS Vitek de la souche : □□□□□□□□□□□□□□□□

N° CPP de la souche : □□□□□□□□□□□□□□□□

Laboratoire ayant réalisé l'analyse: \_\_\_\_\_

Antibiogramme par diffusion		Vitek	
Antibiotiques	Interprétation (S/I/R)	Antibiotiques	Interprétation (S/I/R)
Penicilline G		Benzylpénicilline	
Oxacilline		Oxacilline	
Kanamycine		Kanamycine	
Amikacine			
Tobramycine		Tobramycine	
Gentamicine		Gentamicine	
Erythromycine		Erythromycine	
Clindamycine		résistance inducible à la Clindamycine	
Pristinamycine		Pristinamycine	
Triméthoprime + Sulfamides		Triméthoprime + Sulfamides	
Ofloxacine		Ofloxacine	
Rifampicine		Rifampicine	
Fosfomycine		Fosfomycine	
Vancomycine		Vancomycine	
Teicoplanine		Teicoplanine	
Linézolide		Linézolide	
		Lincomycine	
		Tétracycline	
		Nitrofurantoïne	
		Acide fusidique	

PCR *mecA* / *nuc* réalisé  Oui  Non

Résultats *nuc*  positif  négatif

*mecA*  positif  négatif



Version 02

**5- Prise en charge**

Nécessité d'hospitalisation  Oui  Non

Date d'entrée (JJ/MM/AAAA) : / /

Date de sortie (JJ/MM/AAAA) : / /

**- PRISE EN CHARGE CHIRURGICALE**

Prise en charge chirurgicale initiale  Oui  Non

Chirurgie	Date	Objectif(s) de la chirurgie*
<input type="checkbox"/> 1	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> M
<input type="checkbox"/> 2	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> M
<input type="checkbox"/> 3	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> M
<input type="checkbox"/> 4	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> M
<input type="checkbox"/> 5	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> M
<input type="checkbox"/> 6	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> M
<input type="checkbox"/> 7	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> M

\* Préciser : diagnostic (D), lavage-parage (L), drainage abcès (A), ablation matériel (M)

Ablation partielle du matériel  Oui  Non

Ablation totale du matériel  Oui  Non

Changement 1-temps  Oui  Non

Changement 2-temps  Oui  Non

Version 02

**- PRISE EN CHARGE MEDICALE**

1<sup>ère</sup> ligne      Date de début : / /   
molécule(s)                      Voie                      Dose (mg/j)  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
Date de fin : / /

Motif de l'arrêt :

Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
Intolérance		
Allègement / relais Per os		
Autre ,préciser : _____		

-----  
-----

2<sup>ème</sup> ligne      Date de début : / /   
molécule(s)                      Voie                      Dose (mg/j)  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
Date de fin : / /

Motif de l'arrêt :

Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
Intolérance		
Allègement / relais Per os		
Autre ,préciser : _____		

-----  
-----

3<sup>ème</sup> ligne      Date de début : / /   
molécule(s)                      Voie                      Dose (mg/j)  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_                       PO  IV                      \_\_\_\_\_  
Date de fin : / /

Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
----------	------------	------------

Version 02

Motif de l'arrêt :	Intolérance		
	Allègement / relais Per os		
	Autre ,préciser : _____		

-----

-----

4<sup>ème</sup> ligne      Date de début : / /

molécule(s)	Voie	Dose (mg/j)
_____	<input type="checkbox"/> PO <input type="checkbox"/> IV	_____
_____	<input type="checkbox"/> PO <input type="checkbox"/> IV	_____
_____	<input type="checkbox"/> PO <input type="checkbox"/> IV	_____

Date de fin : / /

Motif de l'arrêt :	Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
	Intolérance		
	Allègement / relais Per os		
	Autre ,préciser : _____		

-----

-----

5<sup>ème</sup> ligne      Date de début : / /

molécule(s)	Voie	Dose (mg/j)
_____	<input type="checkbox"/> PO <input type="checkbox"/> IV	_____
_____	<input type="checkbox"/> PO <input type="checkbox"/> IV	_____
_____	<input type="checkbox"/> PO <input type="checkbox"/> IV	_____

Date de fin : / /

Motif de l'arrêt :	Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
	Intolérance		
	Allègement / relais Per os		
	Autre ,préciser : _____		

-----

-----

6<sup>ème</sup> ligne      Date de début : / /

Version 02

molécule(s) Voie Dose (mg/j)

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

Date de fin : / /

Motif de l'arrêt :	Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
	Intolérance		
	Allègement / relais Per os		
	Autre ,préciser : _____		

7<sup>ème</sup> ligne

Date de début : / /

molécule(s) Voie Dose (mg/j)

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

Date de fin : / /

Motif de l'arrêt :	Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
	Intolérance		
	Allègement / relais Per os		
	Autre ,préciser : _____		

8<sup>ème</sup> ligne

Date de début : / /

molécule(s) Voie Dose (mg/j)

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  PO  IV \_\_\_\_\_

Date de fin : / /

Motif de l'arrêt :	Guérison	<b>OUI</b>	<b>NON</b>
	Intolérance		
	Allègement / relais Per os		
	Autre ,préciser : _____		

Version 02

-----  
-----

9<sup>ème</sup> ligne      Date de début : □□/□□/□□□□

molécule(s)                                  Voie                                  Dose (mg/j)

\_\_\_\_\_     PO  IV                                  \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_     PO  IV                                  \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_     PO  IV                                  \_\_\_\_\_

Date de fin : □□/□□/□□□□

Motif de l'arrêt :

	Guérison	OUI	NON
Intolérance			
Allègement / relais Per os			
Autre ,préciser : _____			

-----  
-----

10<sup>ème</sup> ligne      Date de début : □□/□□/□□□□

molécule(s)                                  Voie                                  Dose (mg/j)

\_\_\_\_\_     PO  IV                                  \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_     PO  IV                                  \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_     PO  IV                                  \_\_\_\_\_

Date de fin : □□/□□/□□□□

Motif de l'arrêt :

	Guérison	OUI	NON
Intolérance			
Allègement / relais Per os			
Autre ,préciser : _____			

-----  
-----

Version 02

**6- Suivi et Evolution**

**FORMULAIRE DE VISITE**

**Date de la visite :** □□/□□/□□□□

Motif de la visite :

- 1<sup>ère</sup> visite
- Visite J15/J21 post-chirurgie
- Visite J+6 semaines post-chirurgie
- Visite J+3 mois post-chirurgie  auto-questionnaire d'observance  
compété
- Visite J+6 mois post-chirurgie
- Visite J+12 mois post-chirurgie  auto-questionnaire d'observance  
compété
- Autre (préciser) \_\_\_\_\_

**Le patient est-il toujours sous traitement lors de cette visite?**

**Si OUI,**

- **Evolution sous traitement**

- Evolution favorable
- Evolution défavorable    Liée à *S. aureus*     Oui     Non

NSP

Date de l'échec : □□/□□/□□□□

Type d'échec

- Persistance de la symptomatologie locale ou générale
- Aggravation de la symptomatologie locale ou générale
- Apparition de signes de gravité (mutation en USC/réanimation)

Conséquence(s)

- Modification de l'antibiothérapie
- Echec du traitement médical seul, nécessité de chirurgie
- Echec du traitement médico-chirurgical, nécessité de reprise

chirurgicale

- Amputation



Version 02

**7- Sortie d'essai**

Le patient est sorti de l'essai :  Oui  Non

Si OUI,

- Le patient a souhaité retirer sa non-opposition  Oui  Non
- Arrêt du traitement sur décision personnelle  Oui  Non
- Arrêt du traitement sur décision médicale:  Oui  Non
- Sortie programmée ; le patient est guéri  Oui  Non
- Autre, préciser \_\_\_\_\_  Oui  Non

Signature du Directeur de l'étude :



« Démonstration de la valeur clinique du test Antibiofilmogramme® dans les Infections Ostéo-Articulaires (IOA) à Staphylococcus aureus »

**ANNEXE 1: CALENDRIER DE L'ETUDE**

	<b>J15/J21</b>	<b>S6</b>	<b>M3</b>	<b>M6</b>	<b>M12</b>
Poids, taille, IMC	X				
Co-morbidités	X				
Autoquestionnaire d'observance			X		X
Traitement modifié / arrêté	X	X	X	X	X
Evolution	X	X	X	X	X

Version 02

## " Démonstration de la valeur clinique du test Antibiofilmogramme® dans les Infections Ostéo-Articulaires (IOA) à Staphylococcus aureus "

### **ANNEXE 3 : Notice d'information et formulaire de non opposition**

Gestionnaire de la recherche: CHU Croix Rousse – 103, grande Rue de la Croix Rousse – 69317 Lyon Cedex 04  
 Personne qui dirige et surveille la recherche : Dr Frédéric Laurent – 04 72 07 18 39

Jason Tasse – 04 72 00 37 70

1 exemplaire à transmettre au patient ; 1 exemplaire à conserver par la personne qui dirige la recherche ; 1 exemplaire à conserver dans le dossier patient

Madame, Monsieur,

Vous présentez une pathologie infectieuse touchant votre prothèse ou votre matériel d'ostéosynthèse.

Des prélèvements destinés à la recherche de bactéries responsables de votre infection ont été réalisés dans le but d'identifier la bactérie responsable de l'infection, et d'adapter le traitement qui vous sera proposé.

Dans le cadre de notre étude, nous testons l'efficacité d'antibiotiques sur une espèce particulière, *Staphylococcus aureus* (appelé aussi staphylocoque doré), à inhiber la formation de biofilms microbiens (regroupement des bactéries entre elles formant une couche adhérente sur le matériel prothétique ou d'ostéosynthèse). Ces biofilms microbiens sont responsables des infections primaires et des récives sur matériel implanté. Ces expériences ont pour but d'améliorer le diagnostic et le traitement de ce type de pathologie.

La bactérie *Staphylococcus aureus* a été retrouvée sur vos prélèvements et peut servir, sauf opposition de votre part, à réaliser des analyses pour la recherche médicale. Cette souche sera utilisée de manière anonymisée, dans le respect de la confidentialité. Aucun examen de vos caractéristiques génétiques ne sera réalisé sans votre consentement.

"Les données médicales associées au prélèvement seront réunies sur un fichier informatisé anonymisé, permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Vous disposez à leur égard d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition conformément à la loi".

Conformément à la loi (art. 16-1 et 16-6 du Code Civil), ces échantillons ne pourront être cédés à titre commercial ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés.

#### Cadre réservé au service

Nom du patient : \_\_\_\_\_ Prénom : \_\_\_\_\_

Adresse :

Date information du patient :

Opposition exprimée : OUI NON

Nom du praticien responsable de la consultation et Service: \_\_\_\_\_

Signature :

## 4.3 Mécanismes d'action des antibiotiques et mécanisme de résistance staphylococcique

### 4.3.1 Les bêta-lactamines

Les bêta-lactamines sont une grande famille d'antibiotiques contenant un noyau bêta-lactame dans leur structure moléculaire. On retrouve dans cette famille les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes.

#### 4.3.1.1 Mécanisme d'action des bêta-lactamines

Les bêta-lactamines agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane en se liant aux Protéines de Liaison à la Pénicilline (PLP) présentes dans la membrane. Chez *S. aureus*, il existe 5 PLP différentes assurant l'équilibre du peptidoglycane. Une fois l'antibiotique fixé, la structure du peptidoglycane est modifiée et la paroi fragilisée. Lors de la division cellulaire, une lyse bactérienne par fuite osmotique due à l'incapacité du peptidoglycane altéré à maintenir la pression osmotique intra-cytoplasmique est observée. Les bêta-lactamines sont donc des antibiotiques bactéricides.

#### 4.3.1.2 Résistance aux bêta-lactamines

Deux mécanismes principaux de résistance sont décrits chez *S. aureus* :

**La production de pénicillinase** : plus de 90% des souches de *S. aureus* sont résistantes à la Pénicilline G par production de pénicillinase, une enzyme hydrolysant toutes les pénicillines sauf les pénicillines M (oxacilline et cloxacilline)(425). Les pénicillinases staphylococciques sont inactivées par les inhibiteurs de bêta-lactamases tels que l'acide clavulanique, le tazobactam ou le sulbactam qui, associés aux bêta-lactamines, restaurent leur efficacité.

**La modification des PLP** : la première souche de SARM a été décrite en 1961 (426), un an à peine après le début de l'utilisation de l'antibiotique. Les SARM possèdent le gène *mecA* ou *mecC*, qui code une PLP additionnelle, appelée PLP2a ou PLP2c, qui ne possède aucune affinité pour les bêta-lactamines, sauf pour la ceftaroline(427). Ce gène, retrouvé au niveau d'un élément génétique mobile appelé cassette SCCmec (Staphylococcal Chromosomal Cassette mec) s'est très rapidement répandu chez les souches du genre *Staphylococcus*. Cette prévalence élevée est notamment due à la présence de deux recombinases (*ccrA* et *ccrB*) encadrant la cassette et facilitant les transferts horizontaux.

### 4.3.2 Les glycopeptides

On regroupe dans cette famille deux antibiotiques de structure similaire : la vancomycine et la teicoplanine, qui est un lipoglycopeptide. Ce sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres (mannose et glucosamine dans la teicoplanine; glucose et vancosamine dans la vancomycine).

#### 4.3.2.1 Mécanisme d'action des glycopeptides

Au même titre que les bêta-lactamines, ce sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leur action est toutefois différente : ils se fixent au niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques lorsqu'ils émergent de la membrane cytoplasmique, et inhibent ainsi les étapes de transglycosylation et de transpeptidation, nécessaire à la synthèse du peptidoglycane.

#### 4.3.2.2 Résistance aux glycopeptides

Certaines souches de *S. aureus* ont réussi à acquérir l'opéron *vanA* des entérocoques. On parle alors de Vancomycin Resistant *S. aureus* (VRSA)(428). Heureusement, ce phénomène est rare, peu de souches ayant été décrite dans le monde.

Certaines souches ont une sensibilité diminuée aux glycopeptides. On parle alors de Vancomycin Intermediate *S. aureus* (VISA) ou Glycopeptide Intermediate *S. aureus* (GISA). Le mécanisme est complexe, encore méconnu, et s'accompagne d'un épaissement de la paroi.

### 4.3.3 Les phosphonopeptides

La fosfomycine est un antibiotique bactéricide produit par différentes espèces du genre *Streptomyces*. Cet acide L-cis-1,2-époxypropylphosphonique possède deux caractéristiques structurales rares pour un antibiotique : un noyau époxyde et une liaison carbone-phosphore.

#### 4.3.3.1 Mécanisme d'action des phosphonopeptides

La fosfomycine agit au début de la synthèse du peptidoglycane par inhibition de la pyruvyl-transférase. Cette inhibition est due à l'analogie de structure de la fosfomycine avec le substrat naturel de l'enzyme. Cependant, pour être active, la fosfomycine doit traverser la membrane externe via deux systèmes de transport actif : GlpT et UhpT

#### 4.3.3.2 Résistance aux phosphonopeptides

La présence de mutations dans les gènes des systèmes de transport GlpT et UhpT ou dans leur région régulatrice, induit une résistance. Cependant, cette résistance perturbe le fitness de la bactérie ayant

alors un taux de croissance et une virulence réduite. La probabilité de mutation est importante (1 chance sur  $10^6$ ), ne permettant pas l'utilisation de cet antibiotique en monothérapie.

Plus rare, la résistance peut être plasmidique et passe par l'expression d'une enzyme (glutathion-S-transférase codé par les gènes *fosA* ou *fosB*) inactivant la fosfomycine.

#### **4.3.4 La daptomycine**

La daptomycine est un glycolipopeptide cyclique actif sur les bactéries à Gram positif. Il s'agit d'un composé naturel retrouvé dans le sol, de type bactéricide, commercialisé en Europe depuis 2006.

##### **4.3.4.1 Mécanisme d'action de la daptomycine**

La daptomycine, en présence de calcium, s'insère dans la membrane bactérienne des cellules en phase de croissance et en phase stationnaire, entraînant une dépolarisation et aboutissant à une inhibition rapide de la synthèse protéique, ADN et ARN. Son efficacité sur les bactéries en phase de latence ou en dormance fait de cet antibiotique un candidat intéressant contre les biofilms.

##### **4.3.4.2 Résistance à la daptomycine**

La présence de certaines mutations chromosomiques peut aboutir à la surexpression des opérons *mprF* et *dIT* entraînant des modifications structurelles de la membrane accompagnées d'une diminution de la charge négative à sa surface. La fixation calcium-dépendante est alors altérée. Des mutations dans le gène *rpoB* peuvent également induire une résistance avec un épaissement du peptidoglycane. C'est pourquoi les souches résistantes ont généralement une sensibilité diminuée aux glycopeptides.

#### **4.3.5 Les aminosides**

Les aminosides sont des molécules constituées par plusieurs cycles glycosidiques liés à un aminocyclitol pouvant être la streptidine ou le 2-desoxystreptamine. Il s'agit d'une classe à spectre large, hydrosoluble et cationique, ayant une activité bactéricide rapide. On retrouve dans cette famille les aminosides substitués en 4 et 5 (néomycine et ribostamycine), et les aminosides substitués en 4 et 6 (kanamycine, tobramycine, amikacine, isepamicine, gentamicine, et netilmicine).

##### **4.3.5.1 Mécanisme d'action des aminosides**

Le mécanisme d'action des aminosides est lié à la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie. Il s'agit de composés chargés positivement qui vont naturellement se concentrer dans l'environnement immédiat des bactéries. Chez les staphylocoques, le passage du peptidoglycane est passif et rapide. Le franchissement de la membrane cytoplasmique s'effectue en deux phases énergie-dépendantes

(EDP 1 et EDP2). L'EDP1 correspond à une lente accumulation de l'antibiotique dépendant de la concentration extérieure, et impliquant les systèmes de transport actif de la respiration bactérienne. Plus l'antibiotique pénètre et se fixe sur le ribosome, plus le phénomène s'accélère, passant en phase EDP2 (rapide). Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes.

Une fois à l'intérieur des cellules, les aminosides se fixent sur l'ARN ribosomal 16S, constituant de la sous-unité 30S, altérant les étapes de synthèse protéiques. Les protéines anormales synthétisées vont alors être intégrées à la membrane cytoplasmique qui va perdre son intégrité, déclenchant l'EDP2. L'arrêt de la synthèse protéique et la perte de l'intégrité membranaire sont bactéricides.

#### 4.3.5.2 Résistance aux aminosides

La résistance peut être due à des mutations au niveau du ribosome entraînant une diminution de la fixation des aminosides.

Mais le principal mécanisme de résistance repose sur la production d'enzymes inactivant les aminosides. Les principales enzymes sont l'ANT(6)-I (aminosides nucléotidyltransférase), ANT(9)-I, l'APH(3')-III (aminosides phosphotransférase), l'ANT-(4')-(4') et l'AAC(6')-APH(2'') (aminosides acétyltransférase) et sont codés sur des gènes plasmidiques ou transposables. Certaines souches peuvent posséder plusieurs enzymes. En fonction des enzymes présentes, on distingue plusieurs phénotypes (tableau 8). La majorité des SARM sont résistants à la gentamicine (80%), alors que moins de 5% des SASM le sont. Si la souche est résistante à la gentamicine, elle est résistante à l'ensemble des aminosides.

Phénotypes	Enzymes	Kanamycine	Tobramycine	Gentamicine
Sauvage	-	S	S	S
K	APH(3')-III	R	S	S
KT	ANT-(4')-(4')	R	R	S
KTG	AAC(6')-APH(2'')	R	R	R

Tableau 8 : Phénotypes de résistance des staphylocoques aux aminosides

#### 4.3.6 Les cyclines

Les cyclines ou tétracyclines doivent leur nom à leur structure tétracyclique commune (noyau naphtacène-carboxamide), sur laquelle viennent se greffer des substituants. Les tétracyclines présentent un caractère amphipathique avec un tétracycle hydrophobe et certains substituants hydrophiles. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre actif sur les bactéries intracellulaires.

#### 4.3.6.1 Mécanisme d'action des cyclines

La pénétration des cyclines se fait de façon passive à travers la paroi, et de façon active à travers la membrane cytoplasmique via des systèmes de transport. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, elles se fixent au niveau de la sous-unité 30S du ribosome, empêchant la fixation des ARN de transfert, et inhibant la synthèse protéique.

#### 4.3.6.2 Résistance aux cyclines

Deux mécanismes de résistance ont été décrits. Le premier est lié à des pompes à efflux codé par les gènes *tetK* et *tetL*, conférant une résistance à la tétracycline mais pas à la minocycline. Le deuxième, codé par les gènes *tetM*, *tetO* et *tetW* localisé sur des éléments génétiques mobiles, est basé sur l'acquisition de protéines de protection ribosomale, qui une fois fixées sur le ribosome entraînent un relargage de l'antibiotique fixé. La résistance est alors croisée pour l'ensemble des tétracyclines.

#### 4.3.7 Les macrolides, lincosamides, streptogramines, kétolides (MLSK)

Les MLSK sont des antibiotiques distincts chimiquement, rassemblés dans un même groupe en raison de leur mode d'action similaire.

Les **macrolides** sont constitués par un macrocycle porteur d'une fonction lactone, sur laquelle viennent se greffer deux ou plusieurs sucres dont l'un est aminé. En raison de la présence d'une et parfois de deux amines, les macrolides sont des molécules basiques. Ils sont généralement classés en fonction de la taille de leur macrocycle :

- 14 atomes : érythromycine, oléandomycine, troléandomycine, roxithromycine, dirithromycine (précurseur du composé actif, l'érythromycyclamine), clarithromycine (ou 6-méthoxy-érythromycine)
- 15 atomes : azithromycine
- 16 atomes : spiramycine, carbomycine, miocamycine.

Les **lincosamides** comportent à l'heure actuelle deux molécules : la lincomycine et son dérivé 7-chloro-7-déoxy-, la clindamycine. Ils sont constitués d'un acide hygrique alkylé en position 4 et rattaché via une liaison amide à un groupement 6-amino-thio-octopyrannoside.

Les **Synergistines** (ou streptogramines) sont des métabolites secondaires à activité antimicrobienne. Le groupe des synergistines comprend les pristinamycines, les virginiamycines, les mykamycines et les oestreomycines. Ces composés sont classés en deux groupes en fonction de leur structure :

- le groupe A (ou M) : ce sont des lactones macrocycliques (macrolactones), de masse moléculaire environ 500 (pristinamycines II et virginiamycines M).

- le groupe B (ou S) : ce sont des hexadepsipeptides cycliques, de masse moléculaire environ 800 (pristinamycines I et virginiamycines S).

On les nomme ainsi en raison du fait qu'une synergistine du groupe A associée à une synergistine du groupe B agit de manière synergique.

Enfin, les **kétolides** sont des dérivés de l'érythromycine A, possédant une fonction cétone en position 3 du noyau lactone, permettant d'atteindre de nouveaux sites de fixation.

#### 4.3.7.1 Mécanisme d'action des MLSK

Les MLSK inhibent la synthèse protéique en se fixant au ribosome bactérien et interfèrent avec le métabolisme de l'ARN par deux mécanismes distincts : elles s'opposent à l'incorporation de l'ARNt au niveau des ribosomes et elles empêchent la traduction de l'ARNm. La fixation a lieu au niveau de la sous-unité 50S du ribosome, au niveau de l'ARN 23S.

#### 4.3.7.2 Résistance aux MLSK

Plusieurs mécanismes ont été décrits :

La **méthylation** de l'ARN 23S au niveau d'une seule adénine à la position 2058 par une méthylase codée par des gènes *erm* empêche la fixation des macrolides, lincosamides et streptogramine B. La résistance est croisée entre ces trois groupes d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>. L'expression des gènes *erm* peut être inductible ou constitutive.

Une **mutation** ponctuelle au niveau des adénines 2058 ou 2059 dans le gène de l'ARN ribosomal 23S peut induire une résistance. Cependant, la présence de 5 à 6 copies du gène chez *S. aureus* et la nécessité d'accumuler les mutations dans plusieurs copies pour obtenir une résistance font que ce mécanisme est rare.

La présence d'un plasmide portant le gène d'**efflux** *msr(A)* codant pour une pompe ATP-dépendante induit une résistance aux macrolides à 14 et 15 atomes et aux streptogramines B. Le phénotype est dit MS<sub>B</sub> et est inductible. D'autres gènes d'efflux ont également été décrits comme le gène *vgA* entraînant une résistance aux streptogramines A et parfois aux lincosamides. Le phénotype est dit LS<sub>A</sub>.

Enfin, certaines souches possèdent un plasmide portant le gène *lnu(A)* codant une enzyme inactivant les lincosamides (phénotype L), ou les gènes *vat* et *vgB* codant des enzymes inactivant les streptogramines A ou B (phénotype S).



### 4.3.8 Les phénicolés

Deux molécules seulement sont utilisées en clinique : le chloramphénicol, réservé à l'usage topique en raison de sa toxicité, et le thiamphénicol. Ils se composent d'un noyau aromatique avec un groupe nitro en para, une chaîne aminopropanediol et une chaîne acyle latérale. Ce sont de petites molécules lipophiles et non polaires qui diffusent très bien à travers les membranes cellulaires.

#### 4.3.8.1 Mécanisme d'action des phénicolés

Cette famille d'antibiotiques agit par inhibition de la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité ribosomale 50S, au niveau de l'ARN 23S. Il y a donc un effet compétitif avec les macrolides.

#### 4.3.8.2 Résistance aux phénicolés

La résistance est principalement due à une enzyme, la chloramphénicol acétyltransférase codé par le gène *cat*, et qui est responsable du transfert d'un groupe acétyl sur l'antibiotique empêchant sa fixation sur le ribosome.

Un autre mécanisme décrit est lié à la présence d'une pompe à efflux active (NorA) codé par le gène *norA*.

### 4.3.9 L'acide fusidique

La structure générale de l'acide fusidique est très voisine de celle des hormones stéroïdes. L'activité antibactérienne semble liée à la conformation de la chaîne latérale au niveau de la double liaison C17-C20 et au groupement carboxyle au niveau du carbone C20.

#### 4.3.9.1 Mécanisme d'action de l'acide fusidique

C'est un inhibiteur de la synthèse protéique interférant avec le facteur d'élongation G (EF-G) de la traduction, ce qui empêche la fixation des amino-acyl-ARNt. L'acide fusidique s'avère bactériostatique à faibles doses et bactéricide à des doses plus élevées. La sélection de souches résistantes en cours de traitement est presque toujours observée, empêchant l'usage de ce médicament en monothérapie.

#### 4.3.9.2 Résistance à l'acide fusidique

La résistance est acquise par modification de la cible par mutation chromosomique dans le gène *fusA*, codant le facteur EF-G. La fréquence de mutation est de  $10^{-6}$ , cependant les mutants ont un taux de croissance et une virulence réduite.

### 4.3.10 Les oxazolidinones

La classe des oxazolidinones est la première classe nouvelle d'antibiotiques qui soit apparue au cours de ces 30 dernières années. Le linezolide et le tédizolide sont actuellement les seules molécules utilisées en clinique. Il s'agit de molécules cycliques avec un noyau 2-oxazénéca-olidinyle substitué en position 5 par une chaîne acétamide et un noyau phényle substitué en position 3 du noyau 2-oxazolidinone.

#### 4.3.10.1 Mécanisme d'action des oxazolidinones

Les composés de type oxazolidinones agissent en inhibant la synthèse protéique par inhibition de la formation du complexe d'initiation 70S de la traduction (formé de la sous-unité 50S, de la sous-unité 30S, de l'ARNm, et enfin de l'ARN de transfert fMet). Le linezolide entre en compétition avec le chloramphénicol et la lincomycine, mais pas avec les macrolides. Il est bactériostatique et est temps dépendant.

#### 4.3.10.2 Résistance aux oxazolidinones

Des cas de résistance ont été rapportés dus à des mutations dans le gène de l'ARN ribosomal 23S. Cependant, comme pour les MLSK, la présence de 5 à 6 copies du gène chez *S. aureus* et la nécessité d'accumuler les mutations dans plusieurs copies font que cette résistance est rare ( $10^{-9}$ ).

La présence d'un plasmide contenant le gène *cfr* codant pour une ARN méthylase peut induire une résistance par méthylation de l'adénine en position 2503 du gène de l'ARN ribosomal 23S. La résistance est alors croisée avec les phénicolés, les lincosamides et les streptogramines A.

### 4.3.11 Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse chimique, découverts lors de la synthèse de la chloroquine (un antipaludique). On distingue les quinolones de première génération des fluoroquinolones, possédant un fluor qui confère à la molécule une meilleure pénétration et une activité élargie notamment sur les staphylocoques. Ce sont de petites molécules hydrophiles. On retrouve dans cette famille l'acide nalidixique, l'ofloxacine, la pefloxacine, la norfloxacine, la ciprofloxacine, la levofloxacine, la sparfloxacine, la moxifloxacine, la gatifloxacine, la garenoxacine.

#### 4.3.11.1 Mécanisme d'action des quinolones

La pénétration des quinolones jusqu'au cytoplasme est aisée et rapide, se faisant par diffusion passive. Une fois à l'intérieur, les quinolones ciblent l'ADN gyrase et les topoisomérases II (composées de 2 sous unités GyrA et GyrB) et IV (sous unités parC et ParE) essentiel au compactage

de l'ADN et à la transcription, empêchant la réplication de l'ADN bactérien (effet bactériostatique). Il en résulte la formation d'ADN double brin anormal à l'origine de l'effet bactéricide par l'activation du système SOS.

#### 4.3.11.2 Résistance aux quinolones

Les staphylocoques sont naturellement résistants aux quinolones de première génération. Concernant les fluoroquinolones, deux mécanismes de résistance ont été décrits :

- Des mutations dans des régions des gènes des topoisomérase (région appelée Quinolone Resistance Determining Region, QRDR) peuvent induire une résistance de bas niveau (pour les gènes *parC*, *parE*) ou de haut niveau (pour le gène *gyrA*) en modifiant l'affinité des quinolones sur leurs cibles.
- Des mutations peuvent entraîner une surexpression de pompe à efflux induisant une résistance de bas niveau.

#### 4.3.12 Les rifamycines

Les rifamycines sont des composés appartenant aux ansamycines de type naphthalène. On retrouve dans cette famille la rifampicine, la rifabutine ou encore la rifapentine.

##### 4.3.12.1 Mécanisme d'action des rifamycines

Les rifamycines agissent par inhibition de l'ARN polymérase bactérienne. Elles se fixent au niveau de la sous-unité bêta et empêchent l'initiation de la synthèse d'ARN. Elles sont actives sur les bactéries au repos.

##### 4.3.12.2 Résistance aux rifamycines

Des mutations dans le gène *rpoB*, entre les codons 463 et 550, peuvent induire une résistance de bas ou de haut niveau aux rifamycines. La fréquence de mutation est élevée ( $10^{-6}$ ), empêchant l'utilisation de cette famille d'antibiotiques en monothérapie.

#### 4.3.13 Les nitrofuranes

Les nitrofuranes sont des produits de synthèse possédant un groupe nitro fixé en position 5 à un cycle furanique. Ils ne présentent une concentration thérapeutique qu'au niveau de l'urine et des reins, restreignant leur usage aux infections urinaires ou intestinales. Le représentant principal de cette famille est la nitrofurantoïne.

#### **4.3.13.1 Mécanisme d'action des nitrofuranes**

Comme pour les imidazolés, l'activité des nitrofuranes dépend de la réduction du groupe nitro par les nitroréductase bactérienne. Le dérivé réduit provoque alors des altérations au niveau de l'ADN induisant la mort bactérienne.

#### **4.3.13.2 Résistance aux nitrofuranes**

Des mutations dans les gènes *nsfA* et *nsfB* peuvent induire une diminution de l'activité des nitroréductase conduisant à la résistance bactérienne.

#### **4.3.14 Les sulfamides et diaminopyrimidines**

Les sulfamides sont des antibiotiques de synthèse, bactériostatiques généralement associés au triméthoprim, qui est le représentant le plus courant des diaminopyrimidines, également bactériostatique. Cette association réduisant le risque d'émergence de souches résistantes porte le nom de cotrimoxazole et est bactéricide.

##### **4.3.14.1 Mécanisme d'action des sulfamides et diaminopyrimidines**

Les sulfamides tout comme le triméthoprim interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques. Les sulfamides sont en effet des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque tandis que le triméthoprim est un analogue structural de l'acide dihydrofolique.

##### **4.3.14.2 Résistance aux sulfamides et diaminopyrimidines**

De nombreux mécanismes de résistance ont été décrits. Le triméthoprim n'a pas d'action sur les souches auxotrophes à la thymidine. La résistance peut survenir par acquisition d'un plasmide codant pour une dihydroptéroate synthase de faible affinité aux sulfamides, ou par une surproduction de la cible des sulfamides, l'acide para-aminobenzoïque.

## 5 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Sharff KA, Richards EP, Townes JM.** Clinical management of septic arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2013;15(6):332.
2. **Berbari EF, Kanj SS, Kowalski TJ, Darouiche RO, Widmer AF, Schmitt SK, Hendershot EF, Holtom PD, Huddleston PM, Petermann GW, Osmon DR.** Executive Summary: 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Native Vertebral Osteomyelitis in Adults. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2015;61(6):859–863.
3. **Schlossberg D.** *Clinical Infectious Disease.* Cambridge University Press; 2015.
4. **Tafer N, Belaieff W, Cuérel C, Zingg M, Hoffmezer P, Uçkay I.** Optimal diagnosis, prevention, and management of periprosthetic joint | ORR. *J. Orthop. Res. Rev.* 7:11–19.
5. **Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer A-I, Gaborit C, Rosset P, Rusch E, Bernard L.** Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J. Hosp. Infect.* 2012;82(1):40–48.
6. **Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M.** Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2007;89(4):780–785.
7. **Wilson N, Broatch J, Jehn M, Davis C.** National projections of time, cost and failure in implantable device identification: Consideration of unique device identification use. *Healthc. Amst. Neth.* 2015;3(4):196–201.
8. **Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G.** Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet Lond. Engl.* 2010;375(9717):846–855.
9. **Garcia-Arias M, Balsa A, Mola E.** Septic arthritis. - PubMed - NCBI. 2011;25(3):407–21.
10. **Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN.** Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N. Engl. J. Med.* 1970;282(4):198–206.
11. **Rao N, Ziran BH, Lipsky BA.** Treating osteomyelitis: antibiotics and surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011;127 Suppl 1:177S–187S.
12. **Lew DP, Waldvogel FA.** Osteomyelitis. *Lancet Lond. Engl.* 2004;364(9431):369–379.
13. **Cierny G, Mader JT, Penninck JJ.** A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin. Orthop.* 2003;(414):7–24.
14. **Zimmerli W.** Clinical practice. Vertebral osteomyelitis. *N. Engl. J. Med.* 2010;362(11):1022–1029.

15. **Mylona E, Samarkos M, Kakalou E, Fanourgiakis P, Skoutelis A.** Pyogenic vertebral osteomyelitis: a systematic review of clinical characteristics. *Semin. Arthritis Rheum.* 2009;39(1):10–17.
16. **Kaplan SS, Heine RP, Simmons RL.** Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. *Infect. Immun.* 1999;67(4):1640–1645.
17. **Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK-M, Rangunath C, Kaplan JB, Mack D.** Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 2007;28(9):1711–1720.
18. **Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE.** Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J. Infect. Dis.* 1982;146(4):487–497.
19. **Murdoch DR, Roberts SA, Fowler Jr VG, Shah MA, Taylor SL, Morris AJ, Corey GR.** Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2001;32(4):647–649.
20. **Tande AJ, Palraj BR, Osmon DR, Berbari EF, Baddour LM, Lohse CM, Steckelberg JM, Wilson WR, Sohail MR.** Clinical Presentation, Risk Factors, and Outcomes of Hematogenous Prosthetic Joint Infection in Patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Am. J. Med.* 2016;129(2):221.e11–221.e20.
21. **Lalani T, Chu VH, Grussemyer CA, Reed SD, Bolognesi MP, Friedman JY, Griffiths RI, Crosslin DR, Kanafani ZA, Kaye KS, Corey GR, Jr VGF.** Clinical outcomes and costs among patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and orthopedic device infections. *Scand. J. Infect. Dis.* 2008;40(11–12):973–977.
22. **Sendi P, Banderet F, Graber P, Zimmerli W.** Periprosthetic joint infection following *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Infect.* 2011;63(1):17–22.
23. **Jiranek WA, Waligora AC, Hess SR, Golladay GL.** Surgical Treatment of Prosthetic Joint Infections of the Hip and Knee: Changing Paradigms? *J. Arthroplasty* 2015;30(6):912–918.
24. **Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE.** Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(16):1645–1654.
25. **Barberán J.** Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2006;12 Suppl 3:93–101.
26. **Zimmerli W, Ochsner PE.** Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection* 2003;31(2):99–108.
27. **Ahlberg A, Carlsson AS, Lindberg L.** Hematogenous infection in total joint replacement. *Clin. Orthop.* 1978;(137):69–75.

28. **Lipsky BA, Weigelt JA, Gupta V, Killian A, Peng MM.** Skin, soft tissue, bone, and joint infections in hospitalized patients: epidemiology and microbiological, clinical, and economic outcomes. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2007;28(11):1290–1298.
29. **Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A.** Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int. J. Artif. Organs* 2012;35(10):923–934.
30. **Kremers HM, Nwojo ME, Ransom JE, Wood-Wentz CM, Melton LJ, Huddleston PM.** Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2015;97(10):837–845.
31. **Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10(3):505–520.
32. **Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL.** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 2005;5(12):751–762.
33. **Nouwen J, Boelens H, van Belkum A, Verbrugh H.** Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Infect. Immun.* 2004;72(11):6685–6688.
34. **Rao N, Cannella B, Crossett LS, Yates AJ, McGough R.** A preoperative decolonization protocol for *staphylococcus aureus* prevents orthopaedic infections. *Clin. Orthop.* 2008;466(6):1343–1348.
35. **Hacek DM, Robb WJ, Paule SM, Kudrna JC, Stamos VP, Peterson LR.** *Staphylococcus aureus* nasal decolonization in joint replacement surgery reduces infection. *Clin. Orthop.* 2008;466(6):1349–1355.
36. **Patel R, Osmon DR, Hanssen AD.** The diagnosis of prosthetic joint infection: current techniques and emerging technologies. *Clin. Orthop.* 2005;(437):55–58.
37. **Ariza J, Cobo J, Baraia-Etxaburu J, de Benito N, Bori G, Cabo J, Corona P, Esteban J, Horcajada JP, Lora-Tamayo J, Murillo O, Palomino J, Parra J, Pigrau C, del Pozo JL, Riera M, Rodríguez D, Sánchez-Somolinos M, Soriano A, del Toro MD, de la Torre B.** Executive summary of management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica.* doi:10.1016/j.eimc.2016.08.012.
38. **Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, Hanssen A, Wilson WR, Infectious Diseases Society of America.** Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2013;56(1):e1–e25.
39. **Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR.** Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36(10):2932–2939.

40. **Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R.** Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N. Engl. J. Med.* 2007;357(7):654–663.
41. **Trampuz A, Steckelberg JM, Osmon DR, Cockerill FR, Hanssen AD, Patel R.** Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint inf... : Reviews in Medical Microbiology. *LWW* 14(1):1–14.
42. **Piriou P, Garreau De Loubresse C, Wattincourt L, Judet T.** Ponction simple contre ponction biopsie au trocart pour le bilan diagnostique bactériologique des infections ostéo-articulaires : Etude prospective sur 54 cas. *Rev. Chir. Orthopédique Réparatrice Appar. Mot.* 1998;84(8):685–688.
43. **Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L.** Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2008;47(11):1403–1409.
44. **Bori G, Soriano A, García S, Mallofré C, Riba J, Mensa J.** Usefulness of histological analysis for predicting the presence of microorganisms at the time of reimplantation after hip resection arthroplasty for the treatment of infection. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2007;89(6):1232–1237.
45. **Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA.** An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J. Clin. Pathol.* 1999;52(2):118–123.
46. **Fenollar F, Lévy P-Y, Raoult D.** Usefulness of broad-range PCR for the diagnosis of osteoarticular infections. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2008;20(4):463–470.
47. **Palestro CJ, Love C, Miller TT.** Infection and musculoskeletal conditions: Imaging of musculoskeletal infections. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2006;20(6):1197–1218.
48. **Stumpe KDM, Nötzli HP, Zanetti M, Kamel EM, Hany TF, Görres GW, von Schulthess GK, Hodler J.** FDG PET for differentiation of infection and aseptic loosening in total hip replacements: comparison with conventional radiography and three-phase bone scintigraphy. *Radiology* 2004;231(2):333–341.
49. **McCarthy K, Velchik MG, Alavi A, Mandell GA, Esterhai JL, Goll S.** Indium-111-labeled white blood cells in the detection of osteomyelitis complicated by a pre-existing condition. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 1988;29(6):1015–1021.
50. **Manaster BJ.** From the RSNA refresher courses. Total hip arthroplasty: radiographic evaluation. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* 1996;16(3):645–660.
51. **Tigges S, Stiles RG, Roberson JR.** Appearance of septic hip prostheses on plain radiographs. *AJR Am. J. Roentgenol.* 1994;163(2):377–380.
52. **la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT), Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP), Société Française d’Anesthésie et de Réanimation (SFAR), Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFOT), Société Française d’Hygiène Hospitalière (SFHH), Société Française de Médecine Nucléaire (SFMN), Société Française de**



- Médecine Physique et de Réadaptation (SOFMER), Société Française de Microbiologie (SFM), Société Française de Radiologie (SFR-Rad), Société Française de Rhumatologie (SFR-Rhu).** [Clinical practice recommendations. Osteoarticular infections on materials (prosthesis, implant, osteosynthesis]. *Médecine Mal. Infect.* 2009;39(11):815–863.
53. **Eckardt JJ, Wirganowicz PZ, Mar T.** An aggressive surgical approach to the management of chronic osteomyelitis. *Clin. Orthop.* 1994;(298):229–239.
54. **Reese JH.** Surgical approaches to the management of osteomyelitis. *LE Jauregui (Ed.) Diagnosis and management of bone infections.* Marcel Dekker Inc, New York. 1995:425–449.
55. **Coakley G, Mathews C, Field M, Jones A, Kingsley G, Walker D, Phillips M, Bradish C, McLachlan A, Mohammed R, Weston V, British Society for Rheumatology Standards, Guidelines and Audit Working Group.** BSR & BHPR, BOA, RCGP and BSAC guidelines for management of the hot swollen joint in adults. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2006;45(8):1039–1041.
56. **Shirliff ME, Mader JT.** Acute septic arthritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15(4):527–544.
57. **Kowalski TJ, Berbari EF, Huddleston PM, Steckelberg JM, Mandrekar JN, Osmon DR.** The management and outcome of spinal implant infections: contemporary retrospective cohort study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2007;44(7):913–920.
58. **Crockarell JR, Hanssen AD, Osmon DR, Morrey BF.** Treatment of infection with débridement and retention of the components following hip arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1998;80(9):1306–1313.
59. **Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, Steckelberg JM, Harmsen SW, Mandrekar JN, Osmon DR.** Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2006;42(4):471–478.
60. **Silva M, Tharani R, Schmalzried TP.** Results of direct exchange or debridement of the infected total knee arthroplasty. *Clin. Orthop.* 2002;(404):125–131.
61. **Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, Hanssen AD, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Osmon DR.** Staphylococcus aureus prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 1997;24(5):914–919.
62. **Lentino JR.** Prosthetic Joint Infections: Bane of Orthopedists, Challenge for Infectious Disease Specialists. *Clin. Infect. Dis.* 2003;36(9):1157–1161.
63. **Ure KJ, Amstutz HC, Nasser S, Schmalzried TP.** Direct-exchange arthroplasty for the treatment of infection after total hip replacement. An average ten-year follow-up. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1998;80(7):961–968.
64. **Callaghan JJ, Katz RP, Johnston RC.** One-stage revision surgery of the infected hip. A minimum 10-year followup study. *Clin. Orthop.* 1999;(369):139–143.
65. **Windsor RE, Insall JN, Urs WK, Miller DV, Brause BD.** Two-stage reimplantation for the salvage of total knee arthroplasty complicated by infection. Further follow-up and refinement of indications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1990;72(2):272–278.

66. **Fischbacher A, Furustrand-Tafin U, Baalbaki R, Borens O.** Prosthetic Joint Infections: A Retrospective Study on the Timing of Reimplantation in a Two-Stage Exchange. *Bone Jt. J* 2015;97-B(SUPP 16):51–51.
67. **Westrich GH, Salvati EA, Brause B.** Postoperative Infection. 1999:371–390.
68. **Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W.** Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2006;43(8):961–967.
69. **von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, Rolauffs B, Lindner N, Winkelmann W, Peters G.** Recovery of small colony variants of Staphylococcus aureus following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 1997;25(5):1250–1251.
70. **Sorlí L, Puig L, Torres-Claramunt R, González A, Alier A, Knobel H, Salvadó M, Horcajada JP.** The relationship between microbiology results in the second of a two-stage exchange procedure using cement spacers and the outcome after revision total joint replacement for infection: the use of sonication to aid bacteriological analysis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2012;94(2):249–253.
71. **Knutson K, Lindstrand A, Lidgren L.** Arthrodesis for failed knee arthroplasty. A report of 20 cases. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1985;67(1):47–52.
72. **Wilde AH, Stearns KL.** Intramedullary fixation for arthrodesis of the knee after infected total knee arthroplasty. *Clin. Orthop.* 1989;(248):87–92.
73. **Isiklar ZU, Landon GC, Tullos HS.** Amputation after failed total knee arthroplasty. *Clin. Orthop.* 1994;(299):173–178.
74. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318–1322.
75. **Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK.** Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2005;87(6):1343–1347.
76. **Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, Porzsolt F.** Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet Infect. Dis.* 2001;1(3):175–188.
77. **Conterno LO, Turchi MD.** Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013;(9):CD004439.
78. **Tice A.** The use of outpatient parenteral antimicrobial therapy in the management of osteomyelitis: data from the Outpatient Parenteral Antimicrobial Therapy Outcomes Registries. *Chemotherapy* 2001;47 Suppl 1:5–16.
79. **Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE.** Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA* 1998;279(19):1537–1541.

80. **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.** Outcome and Predictors of Treatment Failure in Total Hip/Knee Prosthetic Joint Infections Due to *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2011;53(4):334–340.
81. **Widmer AF, Gaechter A, Ochsner PE, Zimmerli W.** Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 1992;14(6):1251–1253.
82. **Frippiat F, Meunier F, Derue G.** Place of newer quinolones and rifampicin in the treatment of Gram-positive bone and joint infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004;54(6):1158–1158.
83. **Curis E, Pestre V, Jullien V, Eyrolle L, Archambeau D, Morand P, Gatin L, Karoubi M, Pinar N, Dumaine V, Van J-CN, Babinet A, Anract P, Salmon D.** Pharmacokinetic variability of clindamycin and influence of rifampicin on clindamycin concentration in patients with bone and joint infections. *Infection* 2015;43(4):473–481.
84. **Rodríguez-Pardo D, Pigrau C, Lora-Tamayo J, Soriano A, del Toro MD, Cobo J, Palomino J, Euba G, Riera M, Sánchez-Somolinos M, Benito N, Fernández-Sampedro M, Sorli L, Guio L, Iribarren JA, Baraia-Etxaburu JM, Ramos A, Bahamonde A, Flores-Sánchez X, Corona PS, Ariza J, the REIPI Group for the Study of Prosthetic Infection.** Gram-negative prosthetic joint infection: outcome of a debridement, antibiotics and implant retention approach. A large multicentre study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(11):O911–O919.
85. **Shah NB, Tande AJ, Patel R, Berbari EF.** Anaerobic prosthetic joint infection. *Anaerobe* 2015;36:1–8.
86. **Bernard L, Dinh A, Ghout I, Simo D, Zeller V, Issartel B, Le Moing V, Belmatoug N, Lesprit P, Bru J-P, Therby A, Bouhour D, Dénes E, Debard A, Chirouze C, Fèvre K, Dupon M, Aegerter P, Mulleman D, Duration of Treatment for Spondylodiscitis (DTS) study group.** Antibiotic treatment for 6 weeks versus 12 weeks in patients with pyogenic vertebral osteomyelitis: an open-label, non-inferiority, randomised, controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 2015;385(9971):875–882.
87. **Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sörgel F.** Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 2009;48(2):89–124.
88. **Graziani AL, Lawson LA, Gibson GA, Steinberg MA, MacGregor RR.** Vancomycin concentrations in infected and noninfected human bone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988;32(9):1320–1322.
89. **de Lalla F, Novelli A, Pellizzer G, Milocchi F, Viola R, Rigon A, Stecca C, Dal Pizzol V, Fallani S, Periti P.** Regional and systemic prophylaxis with teicoplanin in monolateral and bilateral total knee replacement procedures: study of pharmacokinetics and tissue penetration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(12):2693–2698.
90. **Tice AD, Hoaglund PA, Shoultz DA.** Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003;51(5):1261–1268.

91. **Stryjewski ME, Szczech LA, Benjamin DK, Inrig JK, Kanafani ZA, Engemann JJ, Chu VH, Joyce MJ, Reller LB, Corey GR, Fowler VG.** Use of Vancomycin or First-Generation Cephalosporins for the Treatment of Hemodialysis-Dependent Patients with Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 2007;44(2):190–196.
92. **Kim S-H, Kim K-H, Kim H-B, Kim N-J, Kim E-C, Oh M, Choe K-W.** Outcome of Vancomycin Treatment in Patients with Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(1):192–197.
93. **Malizos K, Sarma J, Seaton RA, Militz M, Menichetti F, Riccio G, Gaudias J, Trostmann U, Pathan R, Hamed K.** Daptomycin for the treatment of osteomyelitis and orthopaedic device infections: real-world clinical experience from a European registry. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2016;35(1):111–118.
94. **Roux S, Valour F, Karsenty J, Gagnieu M-C, Perpoint T, Lustig S, Ader F, Martha B, Laurent F, Chidiac C, Ferry T.** Daptomycin > 6 mg/kg/day as salvage therapy in patients with complex bone and joint infection: cohort study in a regional reference center. *BMC Infect. Dis.* 2016;16:83.
95. **Valour F, Bouaziz A, Karsenty J, Ader F, Lustig S, Laurent F, Chidiac C, Ferry T.** Determinants of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* native bone and joint infection treatment failure: a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:443.
96. **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.** Outcome and Predictors of Treatment Failure in Total Hip/Knee Prosthetic Joint Infections Due to *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2011;53(4):334–340.
97. **Salgado CD, Dash S, Cantey JR, Marculescu CE.** Higher risk of failure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections. *Clin. Orthop.* 2007;461:48–53.
98. **Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.** How bacteria stick. *Sci. Am.* 1978;238(1):86–95.
99. **Westall F, de Wit MJ, Dann J, van der Gaast S, de Ronde CEJ, Gerneke D.** Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Res.* 2001;106(1–2):93–116.
100. **Rasmussen B.** Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature* 2000;405(6787):676–679.
101. **Porter JR.** Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol. Rev.* 1976;40(2):260–269.
102. **Murray CJ, Lopez AD.** Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet Lond. Engl.* 1997;349(9064):1498–1504.
103. **Bornstein S.** Action of Penicillin on Enterococci and Other Streptococci. *J. Bacteriol.* 1940;39(4):383–387.

104. **J W Costerton, R T Irvin, Cheng and KJ.** The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 1981;35(1):299–324.
105. **Potera C.** Forging a link between biofilms and disease. *Science* 1999;283(5409):1837, 1839.
106. **Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD, Montanaro L.** Biofilm-Based Implant Infections in Orthopaedics. In: Donelli G, ed. *Biofilm-based Healthcare-associated Infections*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2015:29–46.
107. **Donlan RM.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8(9):881–890.
108. **Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2(2):95–108.
109. **Costerton JW.** Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* 2001;9(2):50–52.
110. **Trautner BW, Darouiche RO.** Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am. J. Infect. Control* 2004;32(3):177–183.
111. **Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N.** Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J. Dent. Res.* 2009;88(11):982–990.
112. **O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;54:49–79.
113. **Lebeaux D, Ghigo J-M.** [Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?]. *Médecine Sci. MS* 2012;28(8–9):727–739.
114. **Rijnaarts HH, Nord W, Bouwer A, Lyklema J, Zehnder AJ.** Reversibility and Mechanism of Bacterial Adhesion. *Colloids Surf B Biointerface* 1995;4:5–22.
115. **Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A.** Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* 2001;69(5):3423–3426.
116. **Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS.** Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 2002;295(5559):1487–1487.
117. **J M Patti, B L Allen, M J McGavin, Hook and M.** MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994;48(1):585–617.
118. **Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M.** Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014;12(1):49–62.
119. **Mcdevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T, Höök M.** Characterization of the Interaction Between the *Staphylococcus aureus* Clumping Factor (ClfA) and Fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 1997;247(1):416–424.

120. **Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux P e., Lew D p., Poster T j.** Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* 1995;17(6):1143–1152.
121. **Hudson MC, Ramp WK, Frankenburg KP.** *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999;173(2):279–284.
122. **Josefsson E, McCrea KW, Ní Eidhin D, O’Connell D, Cox J, Höök M, Foster TJ.** Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Read. Engl.* 1998;144 ( Pt 12):3387–3395.
123. **Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM.** 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. *J. Bacteriol.* 2005;187(7):2426–2438.
124. **Moormeier DE, Bose JL, Horswill AR, Bayles KW.** Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *mBio* 2014;5(5):e01341-14.
125. **Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C, Kühl M, Jensen PØ, Højby N.** The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 2013;21(9):466–474.
126. **Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R.** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 1996;178(1):175–183.
127. **Ziebuhr W, Heilmann C, Götz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, Hacker J.** Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 1997;65(3):890–896.
128. **Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa Í, Penadés JR.** Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 2001;183(9):2888–2896.
129. **Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK-M, Heilmann C, Herrmann M, Mack D.** Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* 2005;55(6):1883–1895.
130. **O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O’Gara JP.** A Novel *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotype Mediated by the Fibronectin-Binding Proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* 2008;190(11):3835–3850.
131. **Feuillie C, Formosa-Dague C, Hays LM, Vervaeck O, Derclaye S, Brennan MP, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrêne YF.** Molecular interactions and inhibition of the staphylococcal biofilm-forming protein SdrC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017:201616805.

132. **Zapotoczna M, McCarthy H, Rudkin JK, O’Gara JP, O’Neill E.** An Essential Role for Coagulase in Staphylococcus aureus Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device-Related Infections. *J. Infect. Dis.* 2015;212(12):1883–1893.
133. **Vanassche T, Peetermans M, Van Aelst LNL, Peetermans WE, Verhaegen J, Missiakas DM, Schneewind O, Hoylaerts MF, Verhamme P.** The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related Staphylococcus aureus infections. *J. Infect. Dis.* 2013;208(1):92–100.
134. **Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR.** Pathogenesis of Staphylococcus aureus abscesses. *Am. J. Pathol.* 2015;185(6):1518–1527.
135. **Marinelli P, Pallares I, Navarro S, Ventura S.** Dissecting the contribution of Staphylococcus aureus  $\alpha$ -phenol-soluble modulins to biofilm amyloid structure. *Sci. Rep.* 2016;6:34552.
136. **Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR.** Functional Amyloids Composed of Phenol Soluble Modulins Stabilize Staphylococcus aureus Biofilms. *PLOS Pathog.* 2012;8(6):e1002744.
137. **Taglialegna A, Navarro S, Ventura S, Garnett JA, Matthews S, Penades JR, Lasa I, Valle J.** Staphylococcal Bap Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. *PLOS Pathog.* 2016;12(6):e1005711.
138. **Zapotoczna M, O’Neill E, O’Gara JP.** Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of Staphylococcus aureus Biofilm Formation. *PLoS Pathog.* 2016;12(7):e1005671.
139. **McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S.** Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10(1):39–50.
140. **Peschel A, Otto M.** Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013;11(10):667–673.
141. **Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M.** Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* 2007;13(12):1510–1514.
142. **Beenken KE, Spencer H, Griffin LM, Smeltzer MS.** Impact of extracellular nuclease production on the biofilm phenotype of Staphylococcus aureus under in vitro and in vivo conditions. *Infect. Immun.* 2012;80(5):1634–1638.
143. **Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, Bayles KW.** Modulation of eDNA Release and Degradation Affects Staphylococcus aureus Biofilm Maturation. *PLOS ONE* 2009;4(6):e5822.
144. **Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, Mack D, Perry RD.** Insights into Yersinia pestis biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ. Microbiol.* 2008;10(6):1419–1432.

145. **Wang X, Preston JF, Romeo T.** The pgaABCD Locus of *Escherichia coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 2004;186(9):2724–2734.
146. **Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D.** Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur. J. Cell Biol.* 2010;89(1):103–111.
147. **Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F.** The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 1999;67(10):5427–5433.
148. **Fluckiger U, Ulrich M, Steinhuber A, Döring G, Mack D, Landmann R, Goerke C, Wolz C.** Biofilm formation, icaADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect. Immun.* 2005;73(3):1811–1819.
149. **Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB.** The Teicoplanin-Associated Locus Regulator (TcaR) and the Intercellular Adhesin Locus Regulator (IcaR) Are Transcriptional Inhibitors of the ica Locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2004;186(8):2449–2456.
150. **Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS.** Mutation of sarA in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 2003;71(7):4206–4211.
151. **Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo J-M, Amorena B, Penadés JR, Lasa I.** SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 2003;48(4):1075–1087.
152. **O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O’Gara JP.** Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(5):1379–1388.
153. **Caiazza NC, O’Toole GA.** Alpha-Toxin Is Required for Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2003;185(10):3214–3217.
154. **Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, Bayles KW, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA.** Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010;107(32):14407–14412.
155. **Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M.** *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial “secretable expanded repertoire adhesive molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* 2005;94(2):278–285.
156. **Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock J-I.** The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiol. Read. Engl.* 2003;149(Pt 10):2701–2707.
157. **Thompson KM, Abraham N, Jefferson KK.** *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010;305(2):143–147.



158. **Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA.** Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infect. Immun.* 2008;76(4):1756–1765.
159. **Hammer ND, Skaar EP.** Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu. Rev. Microbiol.* 2011;65:129–147.
160. **Clarke SR, Wiltshire MD, Foster SJ.** IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Mol. Microbiol.* 2004;51(5):1509–1519.
161. **Pishchany G, Dickey SE, Skaar EP.** Subcellular localization of the *Staphylococcus aureus* heme iron transport components IsdA and IsdB. *Infect. Immun.* 2009;77(7):2624–2634.
162. **Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I.** Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2009;191(3):832–843.
163. **Roche FM, Meehan M, Foster TJ.** The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiol. Read. Engl.* 2003;149(Pt 10):2759–2767.
164. **Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O’Gara JP, Potts JR, Foster TJ.** Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2010;192(21):5663–5673.
165. **Formosa-Dague C, Speziale P, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrière YF.** Zinc-dependent mechanical properties of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming surface protein SasG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(2):410–415.
166. **Akiyama H, Ueda M, Kanzaki H, Tada J, Arata J.** Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin. *J. Dermatol. Sci.* 1997;16(1):2–10.
167. **Chen P, Abercrombie JJ, Jeffrey NR, Leung KP.** An improved medium for growing *Staphylococcus aureus* biofilm. *J. Microbiol. Methods* 2012;90(2):115–118.
168. **Kwecinski J, Kahlmeter G, Jin T.** Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections. *Curr. Microbiol.* 2015;70(5):698–703.
169. **Cardile AP, Sanchez CJ, Samberg ME, Romano DR, Hardy SK, Wenke JC, Murray CK, Akers KS.** Human plasma enhances the expression of *Staphylococcal* microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance In Vitro. *BMC Res. Notes* 2014;7:457.
170. **Jørgensen NP, Zobek N, Dreier C, Haaber J, Ingmer H, Larsen OH, Meyer RL.** Streptokinase Treatment Reverses Biofilm-Associated Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* 2016;4(3). doi:10.3390/microorganisms4030036.

171. **Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB.** Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74(2):470–476.
172. **Thomas VC, Hancock LE.** Suicide and fratricide in bacterial biofilms. *Int. J. Artif. Organs* 2009;32(9):537–544.
173. **Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D.** Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Read. Engl.* 2007;153(Pt 7):2083–2092.
174. **Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O’Gara JP.** Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect. Immun.* 2011;79(3):1153–1165.
175. **Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW.** The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104(19):8113–8118.
176. **Ranjit DK, Endres JL, Bayles KW.** *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties. *J. Bacteriol.* 2011;193(10):2468–2476.
177. **Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, Di Stefano A, Hall Stoodley L, Stoodley P.** Temporal expression of *agrB*, *cidA*, and *alsS* in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. *Pathog. Dis.* 2014;70(3):414–422.
178. **Seidl K, Goerke C, Wolz C, Mack D, Berger-Bächli B, Bischoff M.** *Staphylococcus aureus* CcpA Affects Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 2008;76(5):2044–2050.
179. **Bao Y, Zhang X, Jiang Q, Xue T, Sun B.** Pfs promotes autolysis-dependent release of eDNA and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 2014;204(2):215–226.
180. **Beltrame CO, Côrtes MF, Bonelli RR, Côrrea AB de A, Botelho AMN, Américo MA, Fracalanza SEL, Figueiredo AMS.** Inactivation of the Autolysis-Related Genes *lrgB* and *yycI* in *Staphylococcus aureus* Increases Cell Lysis-Dependent eDNA Release and Enhances Biofilm Development In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 2015;10(9):e0138924.
181. **Lin L-C, Shu J-C, Chang S-C, Ge M-C, Liu T-P, Chen C-W, Lu J-J.** Nucleotide Sequence Variations in Autolysis Genes of ST 59 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Microb. Drug Resist.*
182. **Fischer A, Kambara K, Meyer H, Stenz L, Bonetti E-J, Girard M, Lalk M, Francois P, Schrenzel J.** GdpS contributes to *Staphylococcus aureus* biofilm formation by regulation of eDNA release. *Int. J. Med. Microbiol.* 2014;304(3–4):284–299.
183. **Dengler V, Foulston L, DeFrancesco AS, Losick R.** An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2015;197(24):3779–3787.

184. **Tetz GV, Artemenko NK, Tetz VV.** Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(3):1204–1209.
185. **Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, Izano EA.** Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J. Antibiot. (Tokyo)* 2012;65(2):73–77.
186. **Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR.** Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Mol. Microbiol.* 2016;99(1):123–134.
187. **Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, Engebretsen IL, Bayles KW, Horswill AR, Kielian T.** *Staphylococcus aureus* Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. *J. Immunol.* 2011;186(11):6585–6596.
188. **Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH.** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985;22(6):996–1006.
189. **Wijman JGE, Leeuw PPLA de, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T.** Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(5):1481–1488.
190. **Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA.** Growing and Analyzing Static Biofilms. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2005;0 1:Unit-1B.1.
191. **Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA.** Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68(6):2950–2958.
192. **Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2000;40(2):175–179.
193. **Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, Biavasco F.** Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(7):E259–E261.
194. **Foulston L, Elsholz AKW, DeFrancesco AS, Losick R.** The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH. *mBio* 2014;5(5). doi:10.1128/mBio.01667-14.
195. **Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A.** The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(6):1771–1776.
196. **Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H.** Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat. Protoc.* 2010;5(7):1236–1254.

197. **Edmonds JM, Collett PJ, Valdes ER, Skowronski EW, Pellar GJ, Emanuel PA.** Surface Sampling of Spores in Dry-Deposition Aerosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(1):39–44.
198. **Müller P, Guggenheim B, Attin T, Marlinghaus E, Schmidlin PR.** Potential of shock waves to remove calculus and biofilm. *Clin. Oral Investig.* 2011;15(6):959–965.
199. **Rukayadi Y, Hwang J-K.** Effect of coating the wells of a polystyrene microtiter plate with xanthorrhizol on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *J. Basic Microbiol.* 2006;46(5):410–415.
200. **Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T.** A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* 2007;68(3):605–612.
201. **Di Domenico EG, Toma L, Provot C, Ascenzioni F, Sperduti I, Prignano G, Gallo MT, Pimpinelli F, Bordignon V, Bernardi T, Ensoli F.** Development of an in vitro Assay, Based on the BioFilm Ring Test®, for Rapid Profiling of Biofilm-Growing Bacteria. *Front. Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.01429.
202. **Huang Z, Meric G, Liu Z, Ma R, Tang Z, Lejeune P.** luxS-Based Quorum-Sensing Signaling Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2008;17(1):12–19.
203. **Romilly C, Lays C, Tomasini A, Caldelari I, Benito Y, Hammann P, Geissmann T, Boisset S, Romby P, Vandenesch F.** A Non-Coding RNA Promotes Bacterial Persistence and Decreases Virulence by Regulating a Regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog.* 2014;10(3):e1003979.
204. **Badel S, Callet F, Laroche C, Gardarin C, Petit E, Alaoui HE, Bernardi T, Michaud P.** A new tool to detect high viscous exopolymers from microalgae. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011;38(2):319–326.
205. **Elchinger P-H, Delattre C, Faure S, Roy O, Badel S, Bernardi T, Taillefumier C, Michaud P.** Effect of proteases against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014;59(5):507–513.
206. **Iyamba JML, Seil M, Devleeschouwer M, Kikuni NBT, Dehaye JP.** Study of the formation of a biofilm by clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Biofouling* 2011;27(8):811–821.
207. **Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade J-P, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, Tigaud S, Vandenesch F, Etienne J, Ferry T, Laurent F.** *Staphylococcus epidermidis* in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation. *PLOS ONE* 2013;8(6):e67240.
208. **Liesse Iyamba JM, Seil M, Nagant C, Dulanto S, Deplano A, El Khattabi C, Takaisi Kikuni NB, Dehaye JP.** Inhibition by EGTA of the formation of a biofilm by clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* 2014;54(7):700–710.

209. **Nagant C, Seil M, Nachtergaeel A, Dulanto S, Dehaye JP.** Contribution of the production of quorumones to some phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *J. Med. Microbiol.* 2013;62(7):951–958.
210. **Sulaeman S, Le Bihan G, Rossero A, Federighi M, Dé E, Tresse O.** Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test®. *J. Appl. Microbiol.* 2010;108(4):1303–1312.
211. **Chew SC, Kundukad B, Seviour T, Maarel JRC van der, Yang L, Rice SA, Doyle P, Kjelleberg S.** Dynamic Remodeling of Microbial Biofilms by Functionally Distinct Exopolysaccharides. *mBio* 2014;5(4):e01536-14.
212. **Besemer K, Singer G, Limberger R, Chlup A-K, Hochedlinger G, Hödl I, Baranyi C, Battin TJ.** Biophysical Controls on Community Succession in Stream Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(15):4966–4974.
213. **Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P.** Influence of Hydrodynamics and Cell Signaling on the Structure and Behavior of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68(9):4457–4464.
214. **Lyautey E, Jackson CR, Cayrou J, Rols J-L, Garabétian F.** Bacterial Community Succession in Natural River Biofilm Assemblages. *Microb. Ecol.* 2005;50(4):589–601.
215. **Wagner M, Loy A.** Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002;13(3):218–227.
216. **McCoy WF, Bryers JD, Robbins J, Costerton JW.** Observations of fouling biofilm formation. *Can. J. Microbiol.* 1981;27(9):910–917.
217. **Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW.** Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;27(4):619–624.
218. **Yassin SA, German MJ, Rolland SL, Rickard AH, Jakubovics NS.** Inhibition of multispecies biofilms by a fluoride-releasing dental prosthesis copolymer. *J. Dent.* 2016;48:62–70.
219. **Gomez-Florit M, Pacha-Olivenza MA, Fernández-Calderón MC, Córdoba A, González-Martín ML, Monjo M, Ramis JM.** Quercitrin-nanocoated titanium surfaces favour gingival cells against oral bacteria. *Sci. Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep22444.
220. **Walraven CJ, Lee SA.** Antifungal Lock Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(1):1–8.
221. **Teodósio JS, Silva FC, Moreira JMR, Simões M, Melo LF, Alves MA, Mergulhão FJ.** Flow cells as quasi-ideal systems for biofouling simulation of industrial piping systems. *Biofouling* 2013;29(8):953–966.
222. **Goeres DM, Hamilton MA, Beck NA, Buckingham-Meyer K, Hilyard JD, Loetterle LR, Lorenz LA, Walker DK, Stewart PS.** A method for growing a biofilm under low shear at the air–liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat. Protoc.* 2009;4(5):783–788.

223. **Ammons MCB, Ward LS, James GA.** Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *Int. Wound J.* 2011;8(3):268–273.
224. **Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS.** Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008;19(8):1035–1046.
225. **Kornegay BH, Andrews JF.** Kinetics of Fixed-Film Biological Reactors. *J. Water Pollut. Control Fed.* 1968;40(11):R460–R468.
226. **Möhle RB, Langemann T, Haesner M, Augustin W, Scholl S, Neu TR, Hempel DC, Horn H.** Structure and shear strength of microbial biofilms as determined with confocal laser scanning microscopy and fluid dynamic gauging using a novel rotating disc biofilm reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2007;98(4):747–755.
227. **Willcock L, Gilbert P, Holah J, Wirtanen G, Allison DG.** A new technique for the performance evaluation of clean-in-place disinfection of biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2000;25(5):235–241.
228. **Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM.** Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* 2005;151(3):757–762.
229. **BioSurface Technologies Corporation.** Biofilm Reactors. Available at: <http://biofilms.biz/products/biofilm-reactors/>. Accessed December 20, 2016.
230. **Møller S, Sternberg C, Andersen JB, Christensen BB, Ramos JL, Givskov M, Molin S.** In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64(2):721–732.
231. **Haagensen JAJ, Klausen M, Ernst RK, Miller SI, Folkesson A, Tolker-Nielsen T, Molin S.** Differentiation and Distribution of Colistin- and Sodium Dodecyl Sulfate-Tolerant Cells in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Bacteriol.* 2007;189(1):28–37.
232. **Benoit MR, Conant CG, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Matin A.** New Device for High-Throughput Viability Screening of Flow Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76(13):4136–4142.
233. **Akiyama H, Hamada T, Huh W-K, Yamasaki O, Oono T, Fujimoto W, Iwatsuki K.** Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. *Br. J. Dermatol.* 2003;148(3):526–532.
234. **Bulut F, Meric F, Yorgancilar E, Nergiz Y, Akkus M, Nergiz S, Nasir Y.** Effects of N-acetylcysteine and acetylsalicylic acid on the tonsil bacterial biofilm tissues by light and electron microscopy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2014;18(23):3720–3725.
235. **Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM.** Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1):23–29.

236. **de Carvalho CCCR, da Fonseca MMR.** Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. *BioTechniques* 2007;42(5):616, 618–620.
237. **Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R.** The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J. Microbiol. Methods* 2010;82(1):64–70.
238. **Oniciuc E-A, Cerca N, Nicolau AI.** Compositional Analysis of Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Sources. *Front. Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00390.
239. **Chen M-Y, Lee D-J, Tay J-H, Show K-Y.** Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;75(2):467–474.
240. **Marquès C, Tasse J, Pracros A, Collin V, Franceschi C, Laurent F, Chatellier S, Forestier C.** Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *J. Med. Microbiol.* 2015;64(9):1021–1026.
241. **Tolker-Nielsen T, Sternberg C.** Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2014;1149:615–629.
242. **Bridier A, Briandet R, Bouchez T, Jabot F.** A model-based approach to detect interspecific interactions during biofilm development. *Biofouling* 2014;30(7):761–771.
243. **Davison WM, Pitts B, Stewart PS.** Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(7):2920–2927.
244. **Nishimura S, Tsurumoto T, Yonekura A, Adachi K, Shindo H.** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *J. Orthop. Sci.* 2006;11(1):46.
245. **Wu Y, Liang J, Rensing K, Chou T-M, Libera M.** Extracellular Matrix Reorganization during Cryo Preparation for Scanning Electron Microscope Imaging of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Microsc. Microanal.* 2014;20(5):1348–1355.
246. **Williams DL, Bloebaum RD.** Observing the Biofilm Matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 Grown Using the CDC Biofilm Reactor. *Microsc. Microanal.* 2010;16(2):143–152.
247. **Chaw KC, Manimaran M, Tay FEH.** Role of Silver Ions in Destabilization of Intermolecular Adhesion Forces Measured by Atomic Force Microscopy in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(12):4853–4859.
248. **Balaban N, Gov Y, Bitler A, Boelaert JR.** Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney Int.* 2003;63(1):340–345.
249. **Ahimou F, Semmens MJ, Novak PJ, Haugstad G.** Biofilm Cohesiveness Measurement Using a Novel Atomic Force Microscopy Methodology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(9):2897–2904.

250. **Begun J, Gaiani JM, Rohde H, Mack D, Calderwood SB, Ausubel FM, Sifri CD.** Staphylococcal Biofilm Exopolysaccharide Protects against *Caenorhabditis elegans* Immune Defenses. *PLOS Pathog.* 2007;3(4):e57.
251. **Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T.** Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(6):2655–2661.
252. **Ulphani JS, Rupp ME.** Model of *Staphylococcus aureus* central venous catheter-associated infection in rats. *Lab. Anim. Sci.* 1999;49(3):283–287.
253. **Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Acqua GD, Orlando F, Mocchegiani F, Silvestri C, Licci A, Saba V, Scalise G, Balaban N.** RNAIII-Inhibiting Peptide Significantly Reduces Bacterial Load and Enhances the Effect of Antibiotics in the Treatment of Central Venous Catheter—Associated *Staphylococcus aureus* Infections. *J. Infect. Dis.* 2006;193(2):180–186.
254. **Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vuong C, Otto M, Gao Q.** Conversion of *Staphylococcus epidermidis* Strains from Commensal to Invasive by Expression of the *ica* Locus Encoding Production of Biofilm Exopolysaccharide. *Infect. Immun.* 2005;73(5):3188–3191.
255. **Fernández-Hidalgo N, Gavalda J, Almirante B, Martín M-T, Onrubia PL, Gomis X, Pahissa A.** Evaluation of linezolid, vancomycin, gentamicin and ciprofloxacin in a rabbit model of antibiotic-lock technique for *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(3):525–530.
256. **Kadurugamuwa JL, Sin L, Albert E, Yu J, Francis K, DeBoer M, Rubin M, Bellinger-Kawahara C, Parr Jr TR, Contag PR.** Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. *Infect. Immun.* 2003;71(2):882–890.
257. **Voermans M, Van Soest JM, Van Duijkeren E, Ensink JM.** Clinical efficacy of intravenous administration of marbofloxacin in a *Staphylococcus aureus* infection in tissue cages in ponies. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2006;29(6):555–560.
258. **Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D.** Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect. Immun.* 1999;67(5):2627–2632.
259. **Francois P, Quoc PHT, Bisognano C, Kelley WL, Lew DP, Schrenzel J, Cramton SE, Götz F, Vaudaux P.** Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003;35(2):135–140.
260. **Gallimore B, Gagnon RF, Subang R, Richards GK.** Natural history of chronic *Staphylococcus epidermidis* foreign body infection in a mouse model. *J. Infect. Dis.* 1991;164(6):1220–1223.
261. **Satoh M, Munakata K, Kitoh K, Takeuchi H, Yoshida O.** A newly designed model for infection-induced bladder stone formation in the rat. *J. Urol.* 1984;132(6):1247–1249.



262. **Kurosaka Y, Ishida Y, Yamamura E, Takase H, Otani T, Kumon H.** A non-surgical rat model of foreign body-associated urinary tract infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 2001;45(1):9–15.
263. **Hachem R, Reitzel R, Borne A, Jiang Y, Tinkey P, Uthamanthil R, Chandra J, Ghannoum M, Raad I.** Novel antiseptic urinary catheters for prevention of urinary tract infections: correlation of in vivo and in vitro test results. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(12):5145–5149.
264. **Yu K, Lo JCY, Yan M, Yang X, Brooks DE, Hancock REW, Lange D, Kizhakkedathu JN.** Anti-adhesive antimicrobial peptide coating prevents catheter associated infection in a mouse urinary infection model. *Biomaterials* 2017;116:69–81.
265. **Scheman L, Janota M, Lewin P.** THE PRODUCTION OF EXPERIMENTAL OSTEOMYELITIS: PRELIMINARY REPORT. *J. Am. Med. Assoc.* 1941;117(18):1525–1529.
266. **Norden CW, Kennedy E.** Experimental Osteomyelitis. I. A Description of the Model. *J. Infect. Dis.* 1970;122(5):410–418.
267. **Zak O, Zak F, Rich R, Tosch W, Kradolfer F, Scheld WM.** Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: therapy with rifampin and cloxacillin alone or in combination. *Current chemotherapy and immunotherapy. American Society for Microbiology.* 1982:973–974.
268. **Fitzgerald RH.** Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Jt. Surg Am* 1983;65(3):371–380.
269. **Rodeheaver GT, Rukstalis D, Bono M, Bellamy W.** A new model of bone infection used to evaluate the efficacy of antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate cement. *Clin. Orthop.* 1983;(178):303–311.
270. **Gerhart TN, Roux RD, Hanff PA, Horowitz GL, Renshaw AA, Hayes WC.** Antibiotic-loaded biodegradable bone cement for prophylaxis and treatment of experimental osteomyelitis in rats. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 1993;11(2):250–255.
271. **Eerenberg JP, Patka P, Haarman HJTM, Dwars BJ.** A New Model for Posttraumatic Osteomyelitis in Rabbits. *J. Invest. Surg.* 1994;7(5):453–465.
272. **Passl R, Müller C, Zielinski CC, Eibl MM.** A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs. *J. Trauma* 1984;24(4):323–326.
273. **Worlock P, Slack R, Harvey L, Mawhinney R.** An experimental model of post-traumatic osteomyelitis in rabbits. *Br. J. Exp. Pathol.* 1988;69(2):235–244.
274. **Song Z, Borgwardt L, Høiby N, Wu H, Sørensen TS, Borgwardt A.** Prosthesis Infections after Orthopedic Joint Replacement: The Possible Role of Bacterial Biofilms. *Orthop. Rev.* 2013;5(2). doi:10.4081/or.2013.e14.

275. **Rezaei F, Hassani K, Solhjoei N, Karimi A.** Carbon/PEEK composite materials as an alternative for stainless steel/titanium hip prosthesis: a finite element study. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* 2015;38(4):569–580.
276. **Wafa H, Grimer RJ, Reddy K, Jeys L, Abudu A, Carter SR, Tillman RM.** Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients: case-control study. *Bone Jt. J.* 2015;97–B(2):252–257.
277. **Babu KP, Keerthi VN, Madathody D, Prasanna AL, Gopinath V, Kumar MS, Kumar AN.** Evaluating the Surface Characteristics of Stainless Steel, TMA, Timolium, and Titanium-niobium Wires: An in vivo Scanning Electron Microscope Study. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2016;17(5):372–376.
278. **Hu X, Neoh KG, Zhang J, Kang E-T.** Bacterial and osteoblast behavior on titanium, cobalt-chromium alloy and stainless steel treated with alkali and heat: a comparative study for potential orthopedic applications. *J. Colloid Interface Sci.* 2014;417:410–419.
279. **Kinnari TJ, Esteban J, Zamora N, Fernandez R, López-Santos C, Yubero F, Mariscal D, Puertolas JA, Gomez-Barrena E.** Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010;16(7):1036–1041.
280. **Hudetz D, Ursic Hudetz S, Harris LG, Luginbühl R, Friederich NF, Landmann R.** Weak effect of metal type and ica genes on staphylococcal infection of titanium and stainless steel implants. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008;14(12):1135–1145.
281. **Patel JD, Colton E, Ebert M, Anderson JM.** Gene expression during *S. epidermidis* biofilm formation on biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2012;100(11):2863–2869.
282. **Morrissy RT, Haynes DW.** Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology. *J. Pediatr. Orthop.* 1989;9(4):447–456.
283. **Mader JT, Calhoun J.** Bone, Joint, and Necrotizing Soft Tissue Infections. In: Baron S, ed. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8029/>. Accessed March 10, 2017.
284. **Trueta J.** The three types of acute haematogenous osteomyelitis. A clinical and Vascular Study. *J Bone Jt. Surg* 1959;41B(4):671–680.
285. **Junka A, Szymczyk P, Ziółkowski G, Karuga-Kuzniewska E, Smutnicka D, Bil-Lula I, Bartoszewicz M, Mahabady S, Sedghizadeh PP.** Bad to the Bone: On In Vitro and Ex Vivo Microbial Biofilm Ability to Directly Destroy Colonized Bone Surfaces without Participation of Host Immunity or Osteoclastogenesis. *PLOS ONE* 2017;12(1):e0169565.
286. **Junka AF, Szymczyk P, Smutnicka D, Kos M, Smolina I, Bartoszewicz M, Chlebus E, Turniak M, Sedghizadeh PP.** Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity in vitro. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2015;73(3):451–464.

287. **Sanchez CJ, Ward CL, Romano DR, Hurtgen BJ, Hardy SK, Woodbury RL, Trevino AV, Rathbone CR, Wenke JC.** Staphylococcus aureus biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2013;14:187.
288. **Williams DF.** On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29(20):2941–2953.
289. **Saldarriaga Fernández IC, Da Silva Domingues JF, van Kooten TG, Metzger S, Grainger DW, Busscher HJ, van der Mei HC.** Macrophage response to staphylococcal biofilms on crosslinked poly(ethylene) glycol polymer coatings and common biomaterials in vitro. *Eur. Cell. Mater.* 2011;21:73–79; discussion 79.
290. **Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H.** Staphylococcus epidermidis uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect. Immun.* 2011;79(6):2267–2276.
291. **Scherr TD, Hanke ML, Huang O, James DBA, Horswill AR, Bayles KW, Fey PD, Torres VJ, Kielian T.** Staphylococcus aureus Biofilms Induce Macrophage Dysfunction Through Leukocidin AB and Alpha-Toxin. *mBio* 2015;6(4). doi:10.1128/mBio.01021-15.
292. **Neut D, van Horn JR, van Kooten TG, van der Mei HC, Busscher HJ.** Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin. Orthop.* 2003;(413):261–268.
293. **Esteban J, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R.** Evaluation of Quantitative Analysis of Cultures from Sonicated Retrieved Orthopedic Implants in Diagnosis of Orthopedic Infection. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(2):488–492.
294. **Janz V, Wassilew GI, Hasart O, Tohtz S, Perka C.** Improvement in the detection rate of PJI in total hip arthroplasty through multiple sonicate fluid cultures. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 2013;31(12):2021–2024.
295. **Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, Patel R.** Sonication of Explanted Prosthetic Components in Bags for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection Is Associated with Risk of Contamination. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(2):628–631.
296. **Portillo ME, Salvadó M, Sorli L, Alier A, Martínez S, Trampuz A, Gómez J, Puig L, Horcajada JP.** Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure. *J. Infect.* 2012;65(6):541–548.
297. **Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, Wackym PA, Stoodley P, Post JC, Ehrlich GD, Kerschner JE.** Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 2006;296(2):202–211.
298. **Jenny G.** Local antibiotic therapy using gentamicin-PMMA chains in post-traumatic bone infections. Short and long-term results. *Reconstr. Surg. Traumatol.* 1988;20:36–46.
299. **Ashbaugh AG, Jiang X, Zheng J, Tsai AS, Kim W-S, Thompson JM, Miller RJ, Shahbazian JH, Wang Y, Dillen CA, Ordonez AA, Chang YS, Jain SK, Jones LC, Sterling RS, Mao H-Q, Miller LS.**

- Polymeric nanofiber coating with tunable combinatorial antibiotic delivery prevents biofilm-associated infection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016;113(45):E6919–E6928.
300. **de Breij A, Riool M, Kwakman PHS, de Boer L, Cordfunke RA, Drijfhout JW, Cohen O, Emanuel N, Zaat SAJ, Nibbering PH, Moriarty TF.** Prevention of *Staphylococcus aureus* biomaterial-associated infections using a polymer-lipid coating containing the antimicrobial peptide OP-145. *J. Controlled Release* 2016;222:1–8.
301. **Berenthal NM, Stavrakis AI, Billi F, Cho JS, Kremen TJ, Simon SI, Cheung AL, Finerman GA, Lieberman JR, Adams JS, Miller LS.** A Mouse Model of Post-Arthroplasty *Staphylococcus aureus* Joint Infection to Evaluate In Vivo the Efficacy of Antimicrobial Implant Coatings. *PLOS ONE* 2010;5(9):e12580.
302. **Alt V, Bitschnau A, Österling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, Meissner SA, Wenisch S, Domann E, Schnettler R.** The effects of combined gentamicin–hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 2006;27(26):4627–4634.
303. **Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M.** Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 2003;32(5):521–531.
304. **Scoccianti G, Frenos F, Beltrami G, Campanacci DA, Capanna R.** Levels of silver ions in body fluids and clinical results in silver-coated megaprotheses after tumour, trauma or failed arthroplasty. *Injury* 2016;47, Supplement 4:S11–S16.
305. **Logoluso N, Drago L, Gallazzi E, George DA, Morelli I, Romanò CL.** Calcium-Based, Antibiotic-Loaded Bone Substitute as an Implant Coating: A Pilot Clinical Study. *J. Bone Jt. Infect.* 2016;1:59–64.
306. **Juda M, Paprota K, Jatoza D, Malm A, Rybojad P, Goździuk K.** EDTA as a potential agent preventing formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on polichloride vinyl biomaterials. *Ann Agric Env. Med* 2008;15(2):237–241.
307. **Raad I, Hanna H, Jiang Y, Dvorak T, Reitzel R, Chaiban G, Sherertz R, Hachem R.** Comparative Activities of Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline against Catheter-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus Bacteremic* Isolates Embedded in Biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51(5):1656–1660.
308. **Lönn-Stensrud J, Landin MA, Benneche T, Petersen FC, Scheie AA.** Furanones, potential agents for preventing *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections? *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63(2):309–316.
309. **Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A.** Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complement. Altern. Med.* 2011;11:29.
310. **Lu J, Turnbull L, Burke CM, Liu M, Carter DA, Schlothauer RC, Whitchurch CB, Harry EJ.** Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *PeerJ* 2014;2:e326.

311. **Kelly D, McAuliffe O, Ross R p., Coffey A.** Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012;54(4):286–291.
312. **Donlan RM.** Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.* 2009;17(2):66–72.
313. **Balaban N, Stoodley P, Fux CA, Wilson S, Costerton JW, Dell’Acqua G.** Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin. Orthop.* 2005;437:48–54.
314. **Chung KK, Schumacher JF, Sampson EM, Burne RA, Antonelli PJ, Brennan AB.** Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Biointerphases* 2007;2(2):89–94.
315. **Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A, Livermore D.** *From antibiogram to prescription.* Ed. Biomérieux; 2004.
316. **Denis F, Ploy M-C, Bingen E, Quentin R.** *Bactériologie médicale: techniques usuelles.* Elsevier Health Sciences; 2011.
317. **Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C.** *Manuel de bactériologie clinique.* Elsevier; 1994.
318. **Fleming A.** On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1929;10(3):226–236.
319. **Bliss EA, Long PH.** OBSERVATIONS ON THE MODE OF ACTION OF SULFANILAMIDE. *J. Am. Med. Assoc.* 1937;109(19):1524–1528.
320. **CLSI.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.
321. **Jones RN, Holliday NM, Critchley IA.** Accuracy of the Thermo Fisher Scientific (Sensititre™) dry-form broth microdilution MIC product when testing ceftaroline. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015;81(4):280–282.
322. **Mruk AL, Record KE.** Antimicrobial Options in the Treatment of Adult Staphylococcal Bone and Joint Infections in an Era of Drug Shortages. *Orthopedics* 2012;35(5):401–407.
323. **Parker S, Lipman J, Koulenti D, Dimopoulos G, Roberts JA.** What is the relevance of fosfomycin pharmacokinetics in the treatment of serious infections in critically ill patients? A systematic review. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013;42(4):289–293.
324. **Lacy MK, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R.** The Pharmacodynamics of Aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 1998;27(1):23–27.
325. **Nightingale, Mur.** *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice.* CRC Press; 2001.

326. **Turnidge J.** Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1999;12, Supplement 2:S23–S34.
327. **Levison ME, Levison JH.** Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2009;23(4):791–vii.
328. **Mazzei T, Cassetta MI, Fallani S, Arrigucci S, Novelli A.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of antimicrobial agents for the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006;28, Supplement 1:35–41.
329. **Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR.** Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire* 2002;66(2):86–92.
330. **Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C.** Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 2014;78(3):510–543.
331. **Stewart PS.** Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40(11):2517–2522.
332. **Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN.** Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(8):3505–3507.
333. **Boudjemaa R, Briandet R, Revest M, Jacqueline C, Caillon J, Fontaine-Aupart M-P, Steenkeste K.** New Insight into Daptomycin Bioavailability and Localization in *Staphylococcus aureus* Biofilms by Dynamic Fluorescence Imaging. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016;60(8):4983–4990.
334. **Zheng Z, Stewart PS.** Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(3):900–903.
335. **Dunne WM, Mason EO, Kaplan SL.** Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(12):2522–2526.
336. **Singh R, Ray P, Das A, Sharma M.** Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(9):1955–1958.
337. **Daddi Oubekka S, Briandet R, Fontaine-Aupart M-P, Steenkeste K.** Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(6):3349–3358.
338. **Singh R, Sahore S, Kaur P, Rani A, Ray P.** Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathog. Dis.* 2016;74(6). doi:10.1093/femspd/ftw056.
339. **Davenport EK, Call DR, Beyenal H.** Differential protection from tobramycin by extracellular polymeric substances from *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(8):4755–4761.

340. **Kostenko V, Ceri H, Martinuzzi RJ.** Increased tolerance of *Staphylococcus aureus* to vancomycin in viscous media. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007;51(2):277–288.
341. **Solis N, Parker BL, Kwong SM, Robinson G, Firth N, Cordwell SJ.** *Staphylococcus aureus* surface proteins involved in adaptation to oxacillin identified using a novel cell shaving approach. *J. Proteome Res.* 2014;13(6):2954–2972.
342. **Chakraborty SP, Sahu SK, Pramanik P, Roy S.** In vitro antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharm.* 2012;436(1–2):659–676.
343. **Wardlow R, Bing C, VanOsdol J, Maples D, Ladouceur-Wodzak M, Harbeson M, Nofiele J, Staruch R, Ramachandran A, Malayer J, Chopra R, Ranjan A.** Targeted antibiotic delivery using low temperature-sensitive liposomes and magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound hyperthermia. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* 2016;32(3):254–264.
344. **Takahashi C, Akachi Y, Ogawa N, Moriguchi K, Asaka T, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H.** Morphological study of efficacy of clarithromycin-loaded nanocarriers for treatment of biofilm infection disease. *Med. Mol. Morphol.* 2016:1–8.
345. **Stewart PS, Franklin MJ.** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008;6(3):199–210.
346. **Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, Buckingham-Meyer K, Stewart PS.** Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. *J. Bacteriol.* 2007;189(11):4223–4233.
347. **Urish KL, DeMuth PW, Kwan BW, Craft DW, Ma D, Haider H, Tuan RS, Wood TK, Davis CM.** Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus* Biofilm Persists on Arthroplasty Materials. *Clin. Orthop.* 2016;474(7):1649–1656.
348. **Baudoux P, Bles N, Lemaire S, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, Van Bambeke F.** Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007;59(2):246–253.
349. **Tack KJ, Sabath LD.** Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy* 1985;31(3):204–210.
350. **Kavanaugh JS, Horswill AR.** Impact of Environmental Cues on Staphylococcal Quorum Sensing and Biofilm Development. *J. Biol. Chem.* 2016;291(24):12556–12564.
351. **Bigger J.** TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* 1944;244(6320):497–500.
352. **Lewis K.** Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007;5(1):48–56.

353. **Conlon BP.** Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells. *BioEssays* 2014;36(10):991–996.
354. **Mina EG, Marques CNH.** Interaction of Staphylococcus aureus persister cells with the host when in a persister state and following awakening. *Sci. Rep.* 2016;6:31342.
355. **Conlon BP, Rowe SE, Gandt AB, Nuxoll AS, Donegan NP, Zalis EA, Clair G, Adkins JN, Cheung AL, Lewis K.** Persister formation in Staphylococcus aureus is associated with ATP depletion. *Nat. Microbiol.* 2016;1:16051.
356. **Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Rouch DA, Deighton MA.** Densely adherent growth mode, rather than extracellular polymer substance matrix build-up ability, contributes to high resistance of Staphylococcus epidermidis biofilms to antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(7):1405–1411.
357. **Shapiro JA, Nguyen VL, Chamberlain NR.** Evidence for persisters in Staphylococcus epidermidis RP62a planktonic cultures and biofilms. *J. Med. Microbiol.* 2011;60(Pt 7):950–960.
358. **Yang S, Hay ID, Cameron DR, Speir M, Cui B, Su F, Peleg AY, Lithgow T, Deighton MA, Qu Y.** Antibiotic regimen based on population analysis of residing persister cells eradicates Staphylococcus epidermidis biofilms. *Sci. Rep.* 2015;5:18578.
359. **Carvalhais V, Cerveira F, Vilanova M, Cerca N, Vitorino R.** An immunoproteomic approach for characterization of dormancy within Staphylococcus epidermidis biofilms. *Mol. Immunol.* 2015;65(2):429–435.
360. **Brötz-Oesterhelt H, Beyer D, Kroll H-P, Endermann R, Ladel C, Schroeder W, Hinzen B, Raddatz S, Paulsen H, Henninger K, Bandow JE, Sahl H-G, Labischinski H.** Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat. Med.* 2005;11(10):1082–1087.
361. **Conlon BP, Nakayasu ES, Fleck LE, LaFleur MD, Isabella VM, Coleman K, Leonard SN, Smith RD, Adkins JN, Lewis K.** Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 2013;503(7476):365–370.
362. **Kim W, Conery AL, Rajamuthiah R, Fuchs BB, Ausubel FM, Mylonakis E.** Identification of an Antimicrobial Agent Effective against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Persisters Using a Fluorescence-Based Screening Strategy. *PLOS ONE* 2015;10(6):e0127640.
363. **Prax M, Mechler L, Weidenmaier C, Bertram R.** Glucose Augments Killing Efficiency of Daptomycin Challenged Staphylococcus aureus Persisters. *PLOS ONE* 2016;11(3):e0150907.
364. **Chowdhury N, Wood TL, Martínez-Vázquez M, García-Contreras R, Wood TK.** DNA-crosslinker cisplatin eradicates bacterial persister cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2016;113(9):1984–1992.
365. **França A, Carvalhais V, Vilanova M, Pier GB, Cerca N.** Characterization of an in vitro fed-batch model to obtain cells released from S. epidermidis biofilms. *AMB Express* 2016;6(1):23.



366. **Stewart PS.** Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol. Spectr.* 2015;3(3). doi:10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014.
367. **Coates ARM, Hu Y.** New strategies for antibacterial drug design: targeting non-multiplying latent bacteria. *Drugs RD* 2006;7(3):133–151.
368. **Kaplan JB.** Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 2011;34(9):737–751.
369. **Schadow KH, Simpson WA, Christensen GD.** Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *J. Infect. Dis.* 1988;157(1):71–77.
370. **Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, Bayles KW, Horswill AR.** Low Levels of  $\beta$ -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2012;3(4):e00198-12.
371. **Mirani ZA, Aziz M, Khan MN, Lal I, Hassan N ul, Khan SI.** Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. *Microb. Pathog.* 2013;61–62:66–72.
372. **Mirani ZA, Jamil N.** Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* 2011;51(2):191–195.
373. **Kaplan JB, Jabbouri S, Sadovskaya I.** Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Res. Microbiol.* 2011;162(5):535–541.
374. **Mlynek KD, Callahan MT, Shimkevitch AV, Farmer JT, Endres JL, Marchand M, Bayles KW, Horswill AR, Kaplan JB.** Effects of Low-Dose Amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016;60(5):2639–2651.
375. **Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R.** In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus lugdunensis* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51(3):888–895.
376. **Ng M, Epstein SB, Callahan MT, Piotrowski BO, Simon GL, Roberts AD, Keiser JF, Kaplan JB.** Induction of MRSA Biofilm by Low-Dose  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Specificity, Prevalence and Dose-Response Effects. *Dose-Response* 2014;12(1):dose-response.13-021.Kaplan.
377. **Weiser J, Henke HA, Hector N, Both A, Christner M, Büttner H, Kaplan JB, Rohde H.** Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and immune evasion. *Int. J. Med. Microbiol.* 2016;306(6):471–478.
378. **Haddadin R n. s., Saleh S, Al-Adham I s. i., Buultjens T e. j., Collier P j.** The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 2010;108(4):1281–1291.
379. **Subrt N, Mesak LR, Davies J.** Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(5):979–984.

380. **Dunne WM.** Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990;34(3):390–393.
381. **Lázaro-Díez M, Remuzgo-Martínez S, Rodríguez-Mirones C, Acosta F, Icardo JM, Martínez-Martínez L, Ramos-Vivas J.** Effects of Subinhibitory Concentrations of Ceftaroline on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilms. *PLOS ONE* 2016;11(1):e0147569.
382. **Abdelhady W, Bayer AS, Seidl K, Moormeier DE, Bayles KW, Cheung A, Yeaman MR, Xiong YQ.** Impact of Vancomycin on sarA-Mediated Biofilm Formation: Role in Persistent Endovascular Infections Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2014;jiu007.
383. **Abdelhady W, Bayer AS, Seidl K, Nast CC, Kiedrowski MR, Horswill AR, Yeaman MR, Xiong YQ.** Reduced Vancomycin Susceptibility in an In Vitro Catheter-Related Biofilm Model Correlates with Poor Therapeutic Outcomes in Experimental Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(3):1447–1454.
384. **Hsu C-Y, Lin M-H, Chen C-C, Chien S-C, Cheng Y-H, Su I-N, Shu J-C.** Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011;63(2):236–247.
385. **Cargill JS, Upton M.** Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Pathol.* 2009;62(12):1112–1116.
386. **Wang Q, Sun F-J, Liu Y, Xiong L-R, Xie L-L, Xia P-Y.** Enhancement of Biofilm Formation by Subinhibitory Concentrations of Macrolides in icaADBC-Positive and -Negative Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(6):2707–2711.
387. **Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W.** Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(12):3357–3363.
388. **Schilcher K, Andreoni F, Haunreiter VD, Seidl K, Hasse B, Zinkernagel AS.** Modulation of *Staphylococcus aureus* Biofilm Matrix by Subinhibitory Concentrations of Clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016;60(10):5957–5967.
389. **Kumar A, Ting Y-P.** Streptomycin favors biofilm formation by altering cell surface properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100(20):8843–8853.
390. **Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Wells CL.** Gentamicin promotes *Staphylococcus aureus* biofilms on silk suture. *J. Surg. Res.* 2011;170(2):302–308.
391. **Manner S, Goeres DM, Skogman M, Vuorela P, Fallarero A.** Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-Microtiter Well Plates and Drip Flow Reactors: critical factors influencing outcomes. *Sci. Rep.* 2017;7:43854.
392. **Gupta A.** Biofilm Quantification and Comparative Analysis of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) & MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration) Value for Different Antibiotics against *E. coli*. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2015;4(2):198–224.

393. **Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M.** Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* 2006;17(S2):68–81.
394. **Gristina AG, Oga M, Webb LX, Hobgood CD.** Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 1985;228(4702):990–993.
395. **Sedghizadeh PP, Kumar SKS, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW.** Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *J. Am. Dent. Assoc.* 1939 2009;140(10):1259–1265.
396. **Crémieux A-C, Carbon C.** Experimental Models of Bone and Prosthetic Joint Infections. *Clin. Infect. Dis.* 1997;25(6):1295–1302.
397. **Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB.** The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 1997;24(4):584–602.
398. **Lautenschlager S, Herzog C, Zimmerli W.** Course and outcome of bacteremia due to *Staphylococcus aureus*: evaluation of different clinical case definitions. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 1993;16(4):567–573.
399. **Fowler VG, Olsen MK, Corey GR, Woods CW, Cabell CH, Reller LB, Cheng AC, Dudley T, Oddone EZ.** Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch. Intern. Med.* 2003;163(17):2066–2072.
400. **Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, Franks KS, Horton ML.** Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Susceptibility Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(7):2612–2617.
401. **Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS.** A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods* 2003;54(2):269–276.
402. **Jacqueline C, Amador G, Caillon J, Le Mabecque V, Batard E, Miègeville A-F, Biek D, Ge Y, Potel G, Hamel A.** Efficacy of the new cephalosporin ceftaroline in the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acute osteomyelitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(8):1749–1752.
403. **Gatin L, Saleh-Mghir A, Tasse J, Ghout I, Laurent F, Crémieux A-C.** Ceftaroline-Fosamil Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Rabbit Prosthetic Joint Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(11):6496–6500.
404. **Ng J, Gosbell IB.** Successful oral pristinamycin therapy for osteoarticular infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other *Staphylococcus* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;55(6):1008–1012.
405. **Stafslie SJ, Bahr JA, Feser JM, Weisz JC, Chisholm BJ, Ready TE, Boudjouk P.** Combinatorial Materials Research Applied to the Development of New Surface Coatings I: A Multiwell Plate Screening Method for the High-Throughput Assessment of Bacterial Biofilm Retention on Surfaces. *J. Comb. Chem.* 2006;8(2):156–162.

406. **Peach KC, Bray WM, Shikuma NJ, Gassner NC, Lokey RS, Yildiz FH, Linington RG.** An image-based 384-well high-throughput screening method for the discovery of biofilm inhibitors in *Vibrio cholerae*. *Mol. BioSyst.* 2011;7(4):1176–1184.
407. **Paytubi S, de La Cruz M, Tormo JR, Martín J, González I, González-Menendez V, Genilloud O, Reyes F, Vicente F, Madrid C, Balsalobre C.** A High-Throughput Screening Platform of Microbial Natural Products for the Discovery of Molecules with Antibiofilm Properties against *Salmonella*. *Front. Microbiol.* 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.00326.
408. **Costerton JW.** Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1999;11(3–4):217–221–239.
409. **Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.** How bacteria stick. *Sci. Am.* 1978;238(1):86–95.
410. **Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS.** Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(7):1818–1824.
411. **Boles BR, Thoendel M, Singh PK.** Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(47):16630–16635.
412. **Mah TF, O’Toole GA.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34–39.
413. **Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2(2):95–108.
414. **Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T.** A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* 2007;68(3):605–612.
415. **Nagant C, Tré-Hardy M, El-Ouaaliti M, Savage P, Devleeschouwer M, Dehaye J-P.** Interaction between tobramycin and CSA-13 on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a model of young and mature biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;88(1):251–263.
416. **Haute Autorité de Santé.** Clinical Practice Guidelines. Antibiotic therapy and prevention of bacterial resistance in healthcare organisations. 2008.
417. **Kaplan JB.** Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 2011;34(9):737–751.
418. **Lebeaux D, Ghigo J-M.** Infections associées aux biofilms: Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *MS Médecine Sci.* 2012;28(8–9):727–739.
419. **Rupp ME, Hamer KE.** Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998;41(2):155–161.
420. **Berild D, Mohseni A, Diep LM, Jensenius M, Ringertz SH.** Adjustment of antibiotic treatment according to the results of blood cultures leads to decreased antibiotic use and costs. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;57(2):326–330.

421. **Maugat S, Thiolet JM, L'hériteau F, Gautier C, Tronel H, Metzger MH, Jarno P, Lacavé L, Coignard B.** Prévalence des traitements antibiotiques dans les établissements de santé, France, 2006. *Bull Epidemiol Hebd* 2007;51(52):432–437.
422. **Turnidge J, Paterson DL.** Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20(3):391–408.
423. **Kerremans JJ, van der Bij AK, Goessens W, Verbrugh HA, Vos MC.** Immediate Incubation of Blood Cultures Outside Routine Laboratory Hours of Operation Accelerates Antibiotic Switching. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(11):3520–3523.
424. **Thiolet J-M, Lacavé L, Jarno P, Metzger M-H, Tronel H, Gautier C, L'hériteau F, Coignard B.** Prévalence des infections nosocomiales France 2006. *Hygiènes* 2007;15:349–354.
425. **Novick RP.** Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Fed. Proc.* 1967;26(1):29–38.
426. **Reynolds PE, Brown DF.** Penicillin-binding proteins of beta-lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Effect of growth conditions. *FEBS Lett.* 1985;192(1):28–32.
427. **Hartman BJ, Tomasz A.** Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1984;158(2):513–516.
428. **Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK.** Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(14):1342–1347.