



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année 2020

THESE n° 63

T H E S E

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 01/07/2020 par

Mme Mathilde Ballet

Née le 12/08/1994

A Paris

**IMPACT DE L'AJOUT D'ANTIBIOTIQUES DANS LES CIMENTS ORTHOPEDIQUES SUR LA
PREVENTION DE LA FORMATION DE BIOFILM AU COURS D'INFECTIONS SUR PROTHESE
ARTICULAIRE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

JURY

M. LAURENT Frédéric, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

M. JOSSE Jérôme, Maître de conférence des universités

Mme KOLENDA Camille, Assistant Hospitalier Universitaire

M. FERRY Tristan, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université
- Présidence du Conseil Académique
- Vice-Président du Conseil d'Administration
- Vice-Président de la Commission Recherche
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire

Frédéric FLEURY
Hamda BEN HADID
Didier REVEL
Fabrice VALLEE

Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est

Directeur : Gilles RODE

UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux

Directrice : Carole BURILLON

Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques

Directrice : Christine VINCIGUERRA

UFR d'Odontologie

Directrice : Dominique SEUX

Institut des Sciences et Techniques de

Directeur : Xavier PERROT

Réadaptation (ISTR)

Département de formation et centre de
recherche en Biologie Humaine

Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies
UFR de Sciences et Techniques des Activités
Physiques et Sportives (STAPS)

Directeur : M. Fabien DE MARCHI

Directeur : M. Yannick VANPOULLE

Polytech Lyon

Directeur : M. Emmanuel PERRIN

I.U.T. LYON 1

Directeur : M. Christophe VITON

Institut des Sciences Financières et
d'Assurance (ISFA)

Directeur : M. Nicolas LEBOISNE

ESPE

Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

Observatoire des Sciences de l'Univers

Directrice : Mme Isabelle DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE
GALENIQUE**

CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

BIOPHYSIQUE

Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (Pr)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

DROIT DE LA SANTE

Madame Valérie SIRANYAN (Pr)
Madame Sarah PERIE-FREY (ATER)

ECONOMIE DE LA SANTE

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

INFORMATION ET DOCUMENTATION

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX

Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)
Madame Delphine HOEGY (AHU)

QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE

Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU - enseignant contractuel temps partiel)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

MATHEMATIQUES – STATISTIQUES

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

CHIMIE ORGANIQUE

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)
Monsieur Florian VAUTRIN (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

TOXICOLOGIE

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

PHYSIOLOGIE

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

PHARMACOLOGIE

Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU - PH)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

COMMUNICATION

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL

Monsieur Olivier CATALA (Pr - enseignant contractuel temps partiel)
Madame Anne INIGO PILLET (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

IMMUNOLOGIE

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)

HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Madame Sarah HUET (MCU-PH)
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)

MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (Pr)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)
Madame Camille LOURS (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE

Madame Pascale COHEN (Pr)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU- PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)
Monsieur Alexandre JANIN (AHU)

BIOLOGIE CELLULAIRE

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU- enseignant contractuel temps partiel)
Madame Valérie VOIRON (MCU- enseignant contractuel temps partiel)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Jérôme d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, de m'avoir relue et corrigée à plusieurs reprises. Merci pour tes conseils et réponses à mes questions, c'était agréable de travailler avec toi, que ce soit au labo ou sur ma thèse.

Merci à Frédéric Laurent d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Merci également à Camille Kolenda et Tristan Ferry d'avoir également accepté de faire partie de ce jury.

A tous les membres du labo de bactério, pour leur accueil lors de mon stage, leur disponibilité et leur bonne humeur. J'en garde un très bon souvenir. A l'équipe des stagiaires, la team XR, spécialement à mes collègues préférés Walid et Jeanne.

Merci au soutien de ma famille, mes parents pour leurs conseils, Bertille pour ton enjouement parfois un peu trop marqué, Louise pour ta créativité, Marie pour ta bonne humeur et tes compliments, et Marguerite la vive (petite) dernière. A mes grands-parents, pour leur écoute et leurs efforts pour comprendre mes études. A mes cousins que je vois peu, mais toujours avec grand plaisir.

A mes amis.

A Anaïs, Maxine et Sophie, et nos places réservées au fond de l'amphi. Merci pour ces 3 années de fac passées ensemble, de fous-rires, papotages et exaspération à vos côtés. A nos heures passées à la BU, pas toujours productives.

A Audrey, ma copine de PACES, pour ta gentillesse.

Je remercie également les pharma-mineurs Aline (pour nos récentes pyjamas-thèse-party), Camille, Chloé, Loïs, Matthieu et Sophie pour m'avoir accompagnée dans ces 2 années de dur labeur. A nos quelques sessions de travail, nos échanges inter-colocs et nos soirées animées.

A mes amis de plus longue date ; Anne-Sophie, Mathilde et Capucine, merci d'être là même à distance.

Merci à mon relecteur des îles pour tes encouragements et ton soutien.

Et à tous ceux que je n'ai pas cités ici mais qui ne sont pas oubliés.

Impact de l'ajout d'antibiotiques dans les ciments orthopédiques sur la prévention de la formation de biofilm au cours d'infections sur prothèse articulaire à *Staphylococcus aureus*

Table des matières

Introduction.....	15
Recherches bibliographiques.....	17
1 Infections sur prothèse articulaire	17
1.1 Généralités sur les infections ostéoarticulaires.....	17
1.2 Physiopathologie et étiologie bactérienne des infections sur prothèse articulaire.....	19
1.2.1 Physiopathologie.....	19
1.2.2 Étiologie bactérienne	20
1.3 Prise en charge : diagnostic et traitement des IPA	21
1.3.1 Diagnostic	21
1.3.1.1 Signes cliniques.....	21
1.3.1.2 Diagnostic d'imagerie	22
1.3.1.3 Diagnostic par les marqueurs biologiques.....	24
1.3.1.4 Diagnostic microbiologique	25
1.3.2 Prise en charge	27
1.3.2.1 Traitement chirurgical	27
1.3.2.2 Traitement antibiotique	30
2 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	32
2.1 Généralités sur <i>Staphylococcus aureus</i>	32
2.2 Mécanismes physiopathologiques des infections à <i>S. aureus</i>	33
2.2.1 Expression de facteurs de virulence.....	33
2.2.1.1 Facteurs de colonisation.....	34
2.2.1.2 Production de toxines et d'enzymes.....	35
2.2.1.3 Mécanismes de défense contre le système immunitaire.....	36
2.2.2 Survie intracellulaire.....	36
2.2.3 Expression de Small Colony variants	37
2.2.4 Formation de biofilm	38

2.3	Antibiotiques et résistance	41
2.3.1	Émergence de résistance chez <i>S. aureus</i>	41
2.3.2	Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	42
2.3.3	Utilisation des antibiotiques.....	44
3	Utilisation de ciment orthopédique supplémenté en antibiotiques.....	45
3.1	Fabrication des ciments orthopédiques.....	45
3.1.1	Généralités sur les ciments orthopédiques.....	45
3.1.2	Préparation des ciments orthopédiques.....	46
3.1.3	Ajout d'antibiotiques aux ciments orthopédiques.....	47
3.1.4	Antibiotiques utilisés	49
3.1.4.1	Gentamicine.....	50
3.1.4.2	Vancomycine.....	50
3.1.4.3	Clindamycine.....	50
3.2	Indications.....	51
3.2.1	Utilisations du ciment osseux en PMMA en chirurgie orthopédique	51
3.2.2	Intérêts du ciment supplémenté en antibiotiques	52
3.3	Effets indésirables et complications	55
3.3.1	Complications liées à l'utilisation de ciment orthopédique	55
3.3.2	Inconvénients liés à l'ajout d'antibiotiques au PMMA.....	56
	Partie expérimentale	58
1	Matériel et Méthodes	58
1.1	Objectif de l'étude	58
1.2	Ciments orthopédiques utilisés pour cette étude	58
1.3	Souches bactériennes utilisées	59
1.4	Étude de l'impact du milieu sur le biofilm	59
	Protocole général de formation et quantification de biofilm :.....	60
1.5	Étude de l'impact des antibiotiques élués des ciments sur les souches bactériennes	62
1.5.1	Élution des antibiotiques contenus dans les ciments	62
1.5.2	Impact des antibiotiques contenus dans les solutions sur le biofilm de <i>S. aureus</i>	63
1.6	Représentation graphique et statistiques.....	66
1.6.1	Tests statistiques	66
1.6.2	Représentation graphique.....	67
2	Résultats.....	68

2.1	Étude de l'impact du milieu sur le biofilm	68
2.2	Formation de biofilm par les différentes souches.....	70
2.3	Résultats obtenus pour la souche SASM (SH1000)	71
2.4	Résultats obtenus pour la souche SARM.....	72
2.5	Résultats obtenus pour la souche SARM résistante à la gentamicine	73
2.6	Résultats obtenus pour la souche SASM résistante à la vancomycine	75
2.7	Résultats obtenus pour la souche SARM résistante à la clindamycine	76
2.8	Résultats obtenus pour la souche SASM résistante à la clindamycine.....	78
2.9	Résultats sur l'ensemble des souches regroupées.....	79
3	Discussion.....	81
	<i>Conclusion.....</i>	<i>87</i>
	<i>Bibliographie.....</i>	<i>89</i>

Table des illustrations

<i>Figure 1 - Infections ostéoarticulaires : types d'infection et inoculation, signes. D'après F. Valour, E. Pilly 2018</i>	20
<i>Figure 2 - Radiographie d'une prothèse de hanche infectée : liseré autour de la cupule, dilatation corticale à la pointe de la tige, ostéolyse et liseré autour du ciment. D'après Zimmerli et al. (12)</i>	22
<i>Figure 3 – Possibilités de prise en charge médicale et chirurgicale dans le cadre d'une infection sur prothèse articulaire</i>	29
<i>Figure 4 – Résumé des facteurs de virulence et de colonisation de Staphylococcus aureus. D'après Foster et Geoghegan, 2015 (44)</i>	34
<i>Figure 5 - Formation et maturation du biofilm bactérien, d'après J.Josse</i>	40
<i>Figure 6 - Mode d'action des antibiotiques et mécanismes de résistance. D'après Wright, 2010 (76)</i>	42
<i>Figure 7 - Initiation de la polymérisation du MMA, d'après Seyyed Hosseinzadeh, 2013 (82)</i>	46
<i>Figure 8 - Cinétique d'élution in vitro de la vancomycine et par Galvez-Lopez et al. (88)</i>	48
<i>Figure 9 - Divers espaceurs pour le genou et la hanche, d'après Van Vugt et al (101)</i>	54
<i>Figure 10- Éluion in vitro d'antibiotiques après retrait de spacers implantés durant 12 à 36 semaines dans des hanches de patients, d'après Bertazzoni Minelli et al. (104)</i>	55
<i>Figure 11 - Protocole de formation de biofilm bactérien et révélation de sa densité</i>	62
<i>Figure 12 - Protocole d'élution des antibiotiques contenus dans des ciments orthopédiques</i>	63
<i>Figure 13 – Méthode d'incubation des ciments dans la solution TSB + glucose</i>	63
<i>Figure 14 - Spots de bactéries S. aureus réalisés sur une gélose COS</i>	65
<i>Figure 15- Formation de biofilm durant 24 heures par diverses souches S. aureus dans 2 milieux : TSB et TSB+1 % glucose</i>	68
<i>Figure 16 - Variation de la formation de biofilm par une souche SASM avec des ciments supplémentés ou non en antibiotiques</i>	71
<i>Figure 17 – Variation de la formation de biofilm par une souche clinique SARM avec des ciments supplémentés ou non en antibiotiques</i>	72
<i>Figure 18 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche clinique SARM résistante à la gentamicine</i>	73
<i>Figure 19 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche SASM résistante à la vancomycine</i>	75
<i>Figure 20- Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche SARM résistante à la clindamycine</i>	76
<i>Figure 21 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche SASM résistante à la clindamycine</i>	78
<i>Figure 22 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur l'ensemble des souches étudiées</i>	79

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 - Synthèse des ciments utilisés</i>	67
<i>Tableau 2 - Antibiogramme des souches réalisé lors des prélèvements.</i>	69

Liste des abréviations

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA-MRSA	<i>Community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CHIPS	<i>Chemotaxis inhibitory proteins of Staphylococcus aureus</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COS	Gélose Columbia au sang
CRIOAc	Centre de référence des infections ostéoarticulaires complexes
CRP	<i>C reactive protein</i>
DAIR	<i>Debridement, Antibiotics and Implant Retention</i>
DO	Densité optique
FDG	Fluorodésoxyglucose
FnBP	<i>Fibronectin binding protein</i>
GISA	<i>Glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus</i>
IL-6	Interleukine 6
IMC	Indice de masse corporelle
IOA	Infection ostéoarticulaire
IPA	Infection sur prothèse articulaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IV	Intraveineux
MMA	Méthylméthacrylate
MSCRAMMs	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (Tampon phosphate salin)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFT	<i>Pore-forming toxin</i>

PMMA	Polyméthylméthacrylate
PNN	Polynucléaire neutrophile
PO	<i>Per os</i> (par voie orale)
PSM	- Poste de sécurité microbiologique (bibliographie partie 1) - <i>Phenol soluble modulin</i> (bibliographie partie 2)
PVL	<i>Panton-Valentine Leukocidin</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méthicilline
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SCN	Staphylocoque à coagulase négative
SCV	<i>Small Colony Variants</i>
TDM	Tomodensitométrie
TEP	Tomographie par émission de positons
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSST	<i>Toxic shock syndrome toxin</i>
UFC	Unité formant colonie
VISA	<i>Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<i>Vancomycin resistant Staphylococcus aureus</i>
VS	Vitesse de sédimentation

Introduction

La pose de prothèse orthopédique est en plein essor, liée au vieillissement de la population. Les interventions pour les articulations de la hanche et du genou figurent parmi les plus répandues. En France au cours de l'année 2017, 142 000 patients ont été opérés pour une pose de prothèse totale de hanche, ce qui représente une augmentation de 5 % en 3 années (1). De plus, les prothèses totales de genou représentent à elles seules environ 100 000 actes chirurgicaux par an en France, en augmentation de plus de 30 % en 5 ans entre 2008 et 2013 (2,3).

Cependant, bien que la pose de prothèse articulaire soit une opération répandue, elle ne reste pas sans risques. Une des complications importantes suite à cette opération est la survenue d'une infection, souvent par une contamination peropératoire. La prévalence est faible, comprise entre 0,5 et 3 %, mais peut toutefois conduire à la mort du patient si elle n'est pas traitée rapidement (4).

Les bactéries du genre *Staphylococcus* restent très présentes dans ces contaminations, avec une prédominance de *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*. D'autres micro-organismes sont également fréquemment retrouvés, mais aussi des infections polymicrobiennes. Ces bactéries possèdent de nombreux mécanismes de persistance et de virulence, permettant le développement d'infections. Ainsi, les souches de *S. aureus* peuvent se regrouper, adhérer à la surface du matériel implanté et former un biofilm, les protégeant des attaques extérieures. Elles deviennent alors plus tolérantes à une antibiothérapie et plus résistantes à l'action du système immunitaire (5).

Lors d'interventions en chirurgie orthopédique (septique ou non), des ciments orthopédiques peuvent être utilisés pour renforcer la fixation de la prothèse ou maintenir un espace lors d'une procédure en deux temps. Dans un contexte septique, un ou plusieurs antibiotiques peuvent être ajoutés aux ciments osseux utilisés en chirurgie orthopédique. Celui-ci sera alors relargué progressivement dans le milieu et peut ainsi avoir un rôle prophylactique en empêchant la formation de biofilm par les bactéries ou un rôle thérapeutique, en complément d'une antibiothérapie systémique. La gentamicine reste pour cela l'antibiotique de référence, mais une combinaison d'antibiotiques peut également être utilisée (6).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'efficacité de l'addition d'antibiotiques dans des ciments orthopédiques sur diverses souches de *Staphylococcus aureus*, plus spécifiquement sur leur capacité à former un biofilm. Dans un premier temps, une partie bibliographique sera développée dans laquelle seront abordés les infections sur prothèse (IPA) et leur prise en charge, les mécanismes d'action et de persistance de *S. aureus* et les différents ciments orthopédiques pouvant être utilisés au cours de la prévention et du traitement des IPA. Dans un second temps, une partie expérimentale sera exposée présentant le protocole exploité pour réaliser cette étude, les résultats obtenus au cours des manipulations, puis une discussion de ces résultats.

Recherches bibliographiques

1 Infections sur prothèse articulaire

1.1 Généralités sur les infections ostéoarticulaires

Les infections ostéoarticulaires (IOA) se présentent sous diverses formes : elles peuvent affecter l'ensemble des articulations (arthrites) et des os natifs. Il s'agit alors d'ostéites ou ostéomyélites, ou de spondylodiscites si elles touchent une vertèbre. Elles englobent également les infections sur pied, une des principales complications du diabète. Les IOA concernent tous les os, mais se retrouvent particulièrement au niveau du membre inférieur : hanche, genou (7). En outre, elles peuvent également être liées à du matériel implantable, tel que des prothèses articulaires ou du matériel d'ostéosynthèse (8). En France, on estime par an entre 2000 et 2500 nouveaux cas d'infections sur prothèse articulaire (IPA) (9).

Les infections sont une complication grave et redoutée des interventions chirurgicales de la pose de prothèse. En effet, elles sont souvent difficiles à traiter et peuvent mener jusqu'à la mort du patient si elles ne sont pas prises en charge à temps et correctement. Le risque est très important pendant les deux années suivant l'opération, durant lesquelles surviennent 60 à 70 % des IPA (10).

Leurs origines sont diverses :

- Une contamination directe peut se produire lors de l'acte chirurgical (dans la période peropératoire), le personnel médical ou le patient lui-même en sont à l'origine. Elle peut résulter d'un contact direct de la plaie avec le micro-organisme ou provenir de la voie aérienne.
- Par la voie hématogène ou lymphogène : le micro-organisme peut provenir d'un autre foyer infectieux, comme une infection cutanée, pulmonaire ou urinaire. L'IOA est alors secondaire à une bactériémie. Ce phénomène est observé surtout chez les enfants ou les personnes âgées et concerne principalement les os longs (tibia, fémur) ou encore les vertèbres (11).
- Par contact avec un site infectieux adjacent : par exemple une ostéomyélite ou une plaie cutanée voisines peuvent causer par contiguïté une infection sur matériel orthopédique.

Cependant, la majorité des infections trouvent leur origine au cours de l'opération de pose de la prothèse ou sont dues à une mauvaise cicatrisation, ce qui démontre l'importance de la mise en place de précautions d'hygiène et d'une antibioprophylaxie efficace lors de l'intervention chirurgicale (12).

Les facteurs de risques associés à la présence d'une infection sur prothèse sont :

- Le sexe masculin : en France le sex ratio étant de 1,15 en faveur des femmes pour les IOA sur matériel, et de 1,6 en faveur des femmes pour toutes les IOA en 2013 (13).
- L'âge : l'âge moyen des patients est légèrement supérieur à 65 ans. Quelques études démontrent un risque supérieur de complications post-opératoires chez les personnes âgées (14).
- L'obésité : Le risque de contracter une infection de prothèse de hanche chez un patient avec un Indice de Masse Corporelle (IMC) $> 30 \text{ kg/m}^2$ est de 1,82 ‰ par an alors qu'il est de 0,91 ‰ avec un IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$ (15). Les personnes obèses présentent également de nombreuses comorbidités, pouvant justifier cette augmentation.
- Le risque augmente pour les patients présentant des comorbidités telles qu'un diabète, des maladies chroniques pulmonaires ou hépatiques, une pathologie cardiaque, de la démence, un cancer, ou également des antécédents chirurgicaux ou foyers infectieux associés.
- Une maladie inflammatoire comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus, ou encore la prise d'un traitement immunosuppresseur tels que des corticoïdes, qui affectent le système immunitaire (5).
- Le tabagisme ou l'alcoolisme induisent également une augmentation du risque d'infection. Un tabagisme actif par exemple peut induire une insuffisante circulation dans les os, à l'origine d'une nécrose osseuse propice à une multiplication bactérienne.

La présence de matériel dans l'articulation favorise l'infection par divers mécanismes : l'acte chirurgical nécessaire à la pose, mais également le matériel étranger implanté qui permet une meilleure adhérence bactérienne et facilite la formation de biofilm à sa surface. En effet, en présence de prothèse, un inoculum plus faible est alors suffisant pour induire le développement d'une infection. De plus, à la suite de la pose d'une prothèse, le système immunitaire anti-infectieux est perturbé, et les infections sont alors plus fréquentes (5). Les IPA sont à l'origine d'environ 30 % des IOA en France (13).

1.2 Physiopathologie et étiologie bactérienne des infections sur prothèse articulaire

1.2.1 Physiopathologie

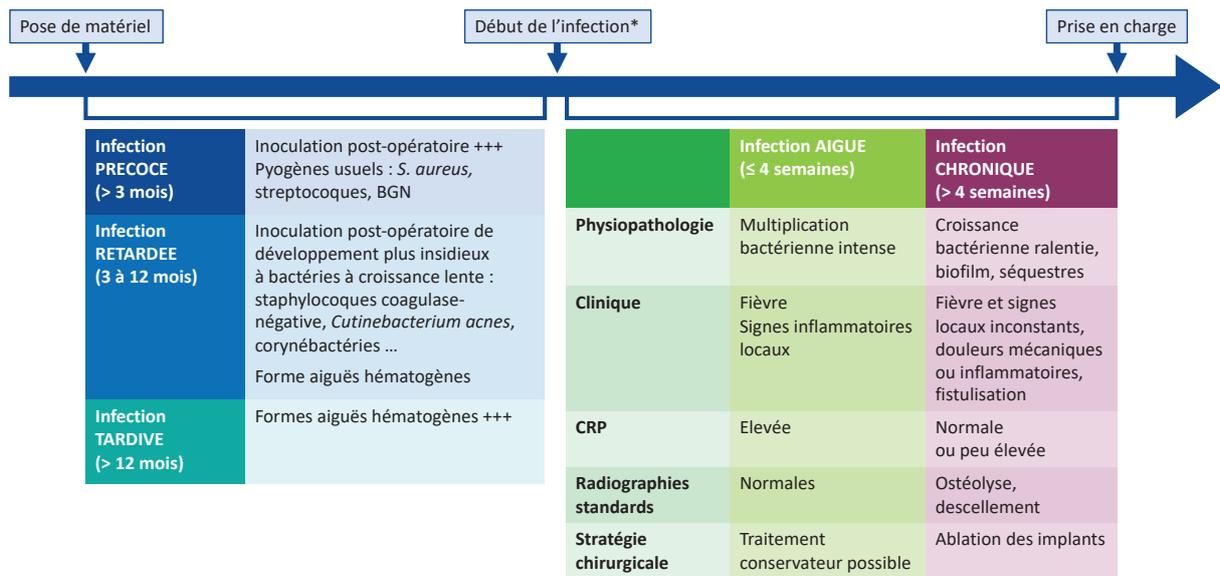
Suite au développement bactérien, une réaction inflammatoire se produit au niveau du site infecté. Des enzymes et autres substances protéolytiques (dont les élastases ou collagénases) vont être apportées par les cellules pro-inflammatoires, responsables de la destruction du site et donc d'une nécrose osseuse. Des lésions tissulaires peuvent alors être induites, qui vont engager le pronostic fonctionnel de l'articulation et de la prothèse. Ainsi une ostéolyse peut être observée à l'interface os/matériel : ostéolyse périprothétique (voir radiographie Figure 2). L'apparition d'une infection chronique est favorisée par le séquestre osseux créé, la mauvaise vascularisation entraînée et l'insuffisance de la réponse inflammatoire, propices à la multiplication bactérienne (16,17).

Les IPA peuvent être classifiées en trois catégories, en fonction de leur moment d'apparition à la suite de l'opération : elles peuvent être précoces, retardées ou tardives (voir Figure 1) (10).

- Une infection précoce survient dans les 3 premiers mois suivant l'intervention chirurgicale. Elle est d'origine peropératoire, et causée par des souches virulentes telles que *S. aureus*, des streptocoques et des bacilles à Gram négatif aérobiques, telles que *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (18).
- Une infection retardée survient entre 3 et 12 mois après l'opération (certains auteurs limitent cette durée à 6 mois, d'autres à 2 ans). Elle est généralement acquise lors de l'opération, mais due à des pathogènes moins virulents et à croissance plus lente, comme les staphylocoques à coagulase négative ou *Cutibacterium acnes*. Elle peut aussi être acquise par la voie hématogène.
- Une infection tardive est fréquemment d'origine hématogène, superficielle ou profonde, apparaissant plus de 1 an après l'opération chirurgicale (entre 6 mois et 2 ans selon les auteurs). Elle peut être engendrée par des bactéries causant des infections cutanées comme *S. aureus*, contaminant les voies respiratoires comme les pneumocoques, les intestins pour *Salmonella spp.*, des infections urinaires dans le cas de *E. coli*, ... Elle

peut néanmoins être liée à une infection peropératoire indolore dans les premiers mois suivant la contamination (10,12).

Ces infections peuvent aussi être classifiées selon leur délai d'évolution. Elles sont alors considérées comme aiguës si elles sont apparues depuis moins de 3 ou 4 semaines au moment de la prise en charge (ce délai n'est pas unanimement défini, il varie selon les études et les auteurs), sinon il s'agit d'une forme chronique. La stratégie de prise en charge sera différente selon le type d'infection (19).



*En cas d'inoculation per opératoire, le début de l'infection équivaut à la pose du matériel

Figure 1 - Infections ostéoarticulaires : types d'infection et inoculation, signes. D'après F. Valour, E. Pilly 2018

1.2.2 Étiologie bactérienne

Les agents pathogènes causant les IOA peuvent être variés selon l'origine de la contamination, le site infectieux, l'âge du patient, ... Le spectre de pathogène est large, mais les bactéries du genre *Staphylococcus* sont les plus souvent incriminées. *S. aureus* est retrouvé dans 35 à 65 % des IOA natives selon les études.

S'agissant des IPA, le genre *Staphylococcus* est aussi fréquemment imputé, dans environ 50 % des cas : 30 à 43 % pour les SCN et 12 à 23 % pour *S. aureus*. Une contamination polymicrobienne est retrouvée dans 10 à 36 % des IPA. Des bacilles à Gram négatif ou streptocoques peuvent également être incriminés, avec une fréquence plus faible (5,10,12,20).

1.3 Prise en charge : diagnostic et traitement des IPA

1.3.1 Diagnostic

Un diagnostic rapide et précis d'une infection sur matériel orthopédique est fondamental. En effet, plus celle-ci est détectée et prise en charge rapidement, plus les chances de réussite des traitements sont élevées. Cependant, ce diagnostic est rendu complexe par la multitude de signes cliniques potentiellement observables et leur manque de spécificité. Celui-ci nécessite une collaboration multidisciplinaire importante entre les professionnels impliqués (21).

1.3.1.1 Signes cliniques

Les signes cliniques sont variés selon le type d'infection sur matériel. Cependant, ils sont révélateurs d'une inflammation : douleur, rougeur, gonflement et érythème ou chaleur autour de l'articulation, avec éventuellement présence de fièvre. Les symptômes évocateurs d'une infection précoce sont facilement repérables car ils sont généralement caractéristiques et se manifestent dans un délai court suivant l'opération chirurgicale, pouvant également se présenter comme une exsudation prolongée de la plaie, la présence d'un écoulement souvent purulent, une absence ou un retard de cicatrisation, l'apparition d'un épanchement ou de fistule à proximité. La présence d'une infection retardée est moins symptomatique, pouvant cependant se manifester par des fistules ou des abcès profonds, ainsi que des suintements. Un inconfort ou une limitation articulaire sont également observables, ainsi que de la fièvre ou des signes locaux inconstants. Les symptômes d'une infection hémotogène (souvent tardive) sont similaires à ceux d'une infection précoce, avec une possible présence de signes d'infection primaire comme de la toux, de la fièvre ou encore une éruption cutanée.

Les signes cliniques d'une infection aigue sont généralement bruyants, il s'agit de signes inflammatoires locaux (douleur, rougeur, gonflement autour de l'articulation) ainsi que de signes généraux (fièvre, syndrome inflammatoire biologique). A l'inverse, les infections chroniques sont moins symptomatiques, évoluant plus lentement et à bas bruit. La présence de fièvre et de signes locaux est inconstante, mais elle peut être accompagnée de fistules, ou de douleurs mécaniques (5,10,12,22,23).

1.3.1.2 Diagnostic d'imagerie

Au cours de la pose d'une prothèse, une radiologie est réalisée pour s'assurer de la bonne position et fixation du matériel. Ce cliché pourra servir de référence pour un futur suivi (14). Lors de la suspicion d'une infection, une radiographie standard est réalisée en première intention. En effet, malgré le manque de sensibilité de cet examen (sa sensibilité est de 14 % et sa spécificité de 70 %), celui-ci est facilement accessible et peu coûteux. Les signes de l'infection peuvent mettre plusieurs semaines à être visibles et être divers : zone d'ostéolyse, présence d'un liseré clair autour du matériel, réaction périostée, séquestre osseux, présence de gaz ou encore fracture ou descellement du matériel. Il n'existe cependant aucun signe radiologique spécifique de l'infection sur prothèse (17,21,22). D'autres examens complémentaires peuvent être réalisés.



Figure 2 - Radiographie d'une prothèse de hanche infectée : liseré autour de la cupule, dilatation corticale à la pointe de la tige, ostéolyse et liseré autour du ciment. D'après Zimmerli et al. (12)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de détecter plus rapidement les œdèmes et réactions périostées et permet une bonne visualisation des tissus mous. Cependant, son utilisation en présence de matériel prothétique en métal peut produire des artefacts à proximité des implants métalliques, et dans ce cas altérer les résultats des examens radiologiques. Ceux-ci peuvent néanmoins être réduits en modifiant certains paramètres d'acquisition (orientation du membre, diminution du temps d'écho, ...). Il est également recommandé de réaliser une injection intraveineuse de Galodinium®, un produit de contraste.

L'IRM présente une bonne valeur diagnostique dans le cas d'une infection rachidienne (spondylodiscite) (25).

Un examen tomodensitométrie (TDM) ou scanner permet une bonne visualisation de la structure osseuse, de possibles lésions, séquestres ou abcès. Cette analyse est plus précise que la radiographie standard, employée pour rechercher d'éventuelles complications en cas de bilan initial douteux. La présence d'appositions périostées, d'ostéolyses, d'anomalies des tissus mous est recherchée. Cependant son utilisation est, comme l'IRM, altérée par le parasitage métallique lié à la prothèse (26).

L'échographie peut également être utilisée, elle permet de visualiser les épanchements intra-articulaires et possède l'avantage de pouvoir être exécutée rapidement. Elle aide également à la réalisation de ponctions afin d'analyser les micro-organismes infectieux. Elle est cependant peu employée pour détecter des infections (26).

La médecine nucléaire est aussi utilisée, une scintigraphie osseuse peut être réalisée en utilisant des diphosphonates marqués au Technétium ($^{99m}\text{Tc-MDP}$), permettant de suivre l'activité ostéoblastique. Cet examen présente une sensibilité très importante, entre 90 et 100 % mais une mauvaise spécificité (environ 40 %). Un résultat positif ne signifie pas obligatoirement la présence d'une infection : des résultats anormaux peuvent être observés en cas de fracture, après la pose d'une prothèse, de métastases ou de descellement aseptique. Si cet examen s'avère positif, il est ensuite nécessaire de réaliser un second marquage, en utilisant par exemple :

- Une scintigraphie au citrate de Gallium-67 : la fixation en cas de présence de prothèse sera plus intense qu'avec le technétium 99m. Il est toujours associé à une scintigraphie au $^{99m}\text{Tc-MDP}$. Sa spécificité est située entre 60 et 100 %. Il s'agit de l'examen de référence pour le rachis (26).
- Des leucocytes autologues marqués à l'indium 111 ($^{111}\text{In-oxidate}$) ou au technétium 99m ($^{99m}\text{Tc-HMPAO}$) peuvent aussi être utilisés, cette technique présente une bonne spécificité (sauf pour le rachis) et est employée en complément de la scintigraphie au $^{99m}\text{Tc-MDP}$ (5).
- D'autres traceurs comme la tomographie par émission de positons au ^{18}F -fluorodésoxyglucose (TEP au $^{18}\text{F-FDG}$), la scintigraphie aux leucocytes marqués *in vivo*, ou de nouveaux traceurs TEP peuvent également être employés.

1.3.1.3 Diagnostic par les marqueurs biologiques

Les marqueurs d'une inflammation sont à rechercher lors d'une suspicion d'infection : la vitesse de sédimentation (VS), la protéine C-réactive (CRP), une hyperleucocytose. Ces indicateurs ne sont cependant pas spécifiques d'une IPA. En effet, il est nécessaire de mesurer ces paramètres permettant d'indiquer et de suivre une infection, mais les seuils permettant de confirmer la présence d'une infection ne sont pas bien définis (22,27).

La présence d'une hyperleucocytose sérique n'est ni sensible, ni spécifique et la VS ne présente pas une bonne spécificité. En effet, son augmentation peut être induite par une IPA mais également par une anémie, une grossesse, certaines pathologies cardiaques ou rénales ou encore la prise d'oestrogénostatifs. La CRP est un meilleur marqueur (28).

La valeur de la CRP est utile pour le suivi d'une infection, en prenant en compte son évolution et non sa valeur absolue. Son taux diminue rapidement après le début d'un traitement, son augmentation peut donc signifier la présence d'une complication. Cependant, les paramètres biologiques seuls ne permettent pas d'affirmer l'existence d'une infection sur prothèse. Bien que très utilisées pour le suivi thérapeutique, des valeurs normales de la CRP ou de la VS ne permettent pas d'exclure la présence d'une IPA (22).

Malgré la nécessité de techniques plus invasives, il est possible de réaliser une analyse du liquide synovial. En effet, les marqueurs qui y sont présents sont généralement plus performants que les marqueurs sériques (29). Une augmentation du nombre de leucocytes synoviaux, ou encore du pourcentage de polynucléaires neutrophiles (PNN) peut signifier la présence d'une IPA. La présence de la leucocyte estérase synoviale peut également être mesurée en utilisant une bandelette urinaire. Cette enzyme est produite par les PNN au niveau du site infectieux, cependant ce test est ininterprétable en cas de contamination sanguine du prélèvement articulaire, pouvant fausser les résultats de la bandelette (30).

De nouveaux marqueurs sont également occasionnellement utilisés. Ainsi la mesure de l'interleukine-6 (IL-6) peut être réalisée dans le sérum ou à partir de liquide articulaire. Cette cytokine est activée plus en amont dans la cascade inflammatoire donc plus rapidement que la CRP, ce test sera ainsi plus précis et sensible. Cependant, ce marqueur est encore peu utilisé en pratique à cause de l'hétérogénéité des résultats, du coût induit et de l'absence de définition d'un seuil précis (31). L'alpha-défensine est aussi un nouveau biomarqueur synovial

prometteur, il s'agit d'un peptide antimicrobien produit par les PNN activés, son taux augmente en réponse aux pathogènes. Cependant, malgré sa bonne spécificité et sensibilité, le coût de ce test reste très élevé, donc il est encore peu utilisé (32). L'étude des D-dimères sériques, des produits de dégradation de la fibrine, est également un bon marqueur. Une augmentation des D-dimères en cas d'IPA va entraîner une différence significative et plus marquée qu'avec les autres infections (par exemple une infection cutanée ou pulmonaire), en comparaison à des mesures de CRP ou de VS. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer son intérêt par rapport aux méthodes utilisées actuellement (33). D'autres nouveaux biomarqueurs sériques ou synoviaux sont encore à l'étude, tels que la procalcitonine, l'IL 1 β synoviale, le TNF- α (*Tumour necrosis factor-alpha*) (29).

1.3.1.4 Diagnostic microbiologique

Il est nécessaire de réaliser des prélèvements microbiologiques afin d'affirmer la présence d'une infection sur prothèse mais également de caractériser le ou les micro-organismes responsables de celle-ci. De plus, les résultats obtenus vont permettre d'adapter le traitement antibiotique.

Les prélèvements doivent être réalisés avant le début du traitement. Toutefois, si une antibiothérapie est en cours, les prélèvements doivent être réalisés après au moins deux semaines d'arrêt du traitement, notamment pour vérifier son efficacité et l'éradication de l'infection. Ce délai permet de réduire le risque d'obtenir des résultats faussement négatifs. Il est également recommandé de réaliser plusieurs prélèvements. Ceux-ci doivent être exécutés dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination, qui pourrait fausser les résultats obtenus (34).

Lorsqu'il y a une suspicion d'infection sur matériel, des prélèvements peuvent être réalisés par ponction articulaire ou d'une collection au contact de la prothèse. Si les résultats sont positifs, il est nécessaire d'envisager un traitement chirurgical et une antibiothérapie postopératoire adaptée doit être mise en place. Des prélèvements superficiels, par exemple sur des fistules ou plaies ouvertes, sont à éviter à cause d'un risque élevé de contamination (22).

Des prélèvements peropératoires doivent également être réalisés au début de l'intervention. Selon les recommandations, il est nécessaire d'effectuer cinq prélèvements au niveau de sites différents et macroscopiquement pathologiques, afin de limiter le risque de faux négatifs. Ces

prélèvements sont soit liquides, à partir de pus ou de liquide articulaire, soit solides en prélevant des tissus comme du tissu osseux. Il est également possible de prélever directement la prothèse pour analyse, dans le cas où le laboratoire peut prendre en charge ce type d'examen (22,34).

En cas de suspicion d'infection et de fièvre ou de signes généraux, des hémocultures peuvent également être effectuées.

Les échantillons sont ensuite rapidement transportés au laboratoire, si possible dans les deux heures, il s'agit d'une des étapes pré-analytiques capitales pour garantir la qualité des prélèvements. Ces prélèvements doivent ensuite être manipulés dans des conditions stériles strictes, sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II. Les prélèvements tissulaires ou osseux sont broyés, de manière à libérer les bactéries attachées à la matrice osseuse ou au biofilm (16,34).

Un examen direct avec coloration de Gram est ensuite pratiqué sur les prélèvements pour rechercher la présence de bactéries, une coloration pour évaluation semi-quantitative des PNN est également réalisée. En outre, des ensemencements des liquides et broyats seront effectués sur divers milieux riches avec incubation à 35 °C. Il est recommandé d'incuber ces cultures dans des atmosphères variées (aérobie/ anaérobie/ variation CO₂), et de prolonger l'incubation pendant 14 jours pour optimiser la sensibilité de l'examen, par exemple en cas d'IOA retardée. La lecture des géloses doit systématiquement comporter la recherche de *Small Colony Variants* (SCV), des micro-colonies à croissance lente, existantes chez plusieurs espèces bactériennes. Les colonies isolées seront ensuite identifiées et un antibiogramme sera réalisé sur chacune d'entre-elles. Ceci permet alors de caractériser le phénotype de résistance, qui peut varier pour une même espèce bactérienne et chez un même patient. La technique de spectrométrie MALDI-TOF est recommandée pour éviter tout risque de confusion, l'identification biochimique pouvant être faussée par les SCVs. Si un doute persiste ou en cas de résultats négatifs des cultures, une approche moléculaire peut être envisagée (en réalisant une PCR) (16,23,34).

Les critères permettant de confirmer l'existence d'une infection ne sont pas clairement définis, il n'existe pas de consensus pour le diagnostic des IPA. Cependant, les critères suivants sont fréquemment retenus :

- Au moins trois prélèvements peropératoires ou deux prélèvements espacés dans le temps (un peropératoire et une ponction ou hémoculture) sont positifs à la même

bactérie qui appartient à la flore cutanée, dans ce cas son isolement pourrait justifier une éventuelle contamination : SCN, *C. acnes*, corynébactérie...

- Un prélèvement profond (peropératoire ou par ponction ou hémoculture) est positif à une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée ou une bactérie exceptionnelle : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, entérobactéries, *Salmonella*, *S. pneumoniae*, ...

D'autres critères sont retenus par certains experts comme la présence d'une fistule ou de pus au contact de la prothèse ou dans l'articulation (22).

1.3.2 Prise en charge

Un traitement précoce sera profitable afin de limiter l'infection et d'augmenter les chances de succès. La prise en charge doit être multidisciplinaire, en concertation avec les professionnels de santé impliqués (médecin, chirurgien, microbiologiste, infectiologue, radiologue, ...) et adaptée à chaque patient. Celle-ci nécessitera généralement l'association d'une intervention chirurgicale et d'un traitement médical. Le but de cette prise en charge est à la fois d'éradiquer les bactéries à l'origine de l'infection, mais également de rétablir le bon fonctionnement de la prothèse et de l'articulation, d'éliminer d'éventuelles douleurs et de minimiser la mortalité et la morbidité qui lui sont liées (10,35).

1.3.2.1 Traitement chirurgical

L'objectif de cette intervention est l'élimination de tout matériel et tissu infecté, ou la diminution de la quantité de biofilm si la prothèse ne peut pas être enlevée, afin que le traitement médical associé suffise à éradiquer l'infection.

i- Débridement sans changement de prothèse

Dans le premier mois suivant l'implantation du matériel, le traitement recommandé est une synovectomie-lavage (ou débridement). Elle consiste en une excision de la membrane synoviale, de la capsule articulaire et des tissus infectés, ainsi qu'un nettoyage de la cavité articulaire avec changement des pièces mobiles de la prothèse. Un traitement antibiotique est ensuite instauré pour le patient. Cette technique est communément nommée *DAIR* en anglais : « *Debridement, Antibiotics and Implant Retention* » (10). Passé cette date, un changement de

la prothèse est nécessaire pour pouvoir éradiquer le biofilm formé à sa surface par les bactéries responsables de l'infection (18,22).

Cette méthode est réservée aux prothèses stables, sans descellement, si le pathogène responsable de l'infection est sensible aux antibiotiques. Il ne doit y avoir ni fistule, ni dommage important de tissus et si le délai d'évolution est inférieur à trois ou quatre semaines (35). Le succès de cette technique réside principalement dans la précocité de l'intervention : si l'évolution est inférieure à dix jours, le taux de guérison est de 90 %, il baisse cependant à 50 % quand l'infection est présente depuis plus de trois semaines (14).

ii- Chirurgie en 1 temps

Cette technique est principalement indiquée chez les patients dont l'état de santé ne permet pas de subir plusieurs chirurgies à la suite, et/ou si le pathogène responsable de l'infection est identifié et facile à traiter avec des antibiotiques courants. L'état des tissus avoisinants doit également être correct, ainsi que le stock osseux du patient, et il ne doit pas présenter d'antécédents d'IOA. Dans ce cas, l'excision de la prothèse et des tissus infectés se fait dans le même temps chirurgical que la pose de la nouvelle prothèse, avant la mise en place d'une antibiothérapie (21). Cette technique possède un taux de réussite élevé, une mobilité plus précoce, une durée d'hospitalisation moins longue et un coût moins élevé que la chirurgie en 2 temps (35).

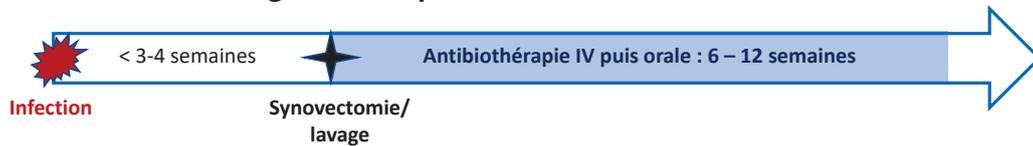
iii- Chirurgie en 2 temps

L'excision du matériel et des tissus infectés est réalisée dans un premier temps puis un délai de plusieurs semaines est respecté sans remplacement de la prothèse. Il est possible d'utiliser un espaceur ou *spacer*, permettant de soulager le patient après la dépose du matériel et d'assurer une mobilité en attendant la pose d'une nouvelle prothèse. Celui-ci est composé de ciment osseux, souvent imprégné d'antibiotiques, pour un traitement local de l'infection. L'intervalle entre la dépose du matériel infecté et la pose de la nouvelle prothèse est variable selon les études et selon l'état des patients (de 2 semaines à plusieurs mois) (35,36). On parle de « 2 temps courts » ou de « 2 temps longs », durant cette période une antibiothérapie initialement probabiliste sera administrée.

En cas de 2 temps courts, le délai entre la dépose et la repose est classiquement de 4 à 6 semaines, l'antibiothérapie ne sera arrêtée qu'après la repose de prothèse. En cas de 2 temps longs, le délai est de 3 à 6 mois, et un arrêt de l'antibiothérapie est préconisé 15 jours avant la

réimplantation puis sa reprise est indiquée en postopératoire. Pour ces 2 techniques, l'antibiothérapie est arrêtée lorsque les prélèvements peropératoires de la repose de prothèse sont négatifs au bout de 15 jours de culture (22).

Débridement sans changement de prothèse



Chirurgie en 1 temps



Chirurgie en 2 temps

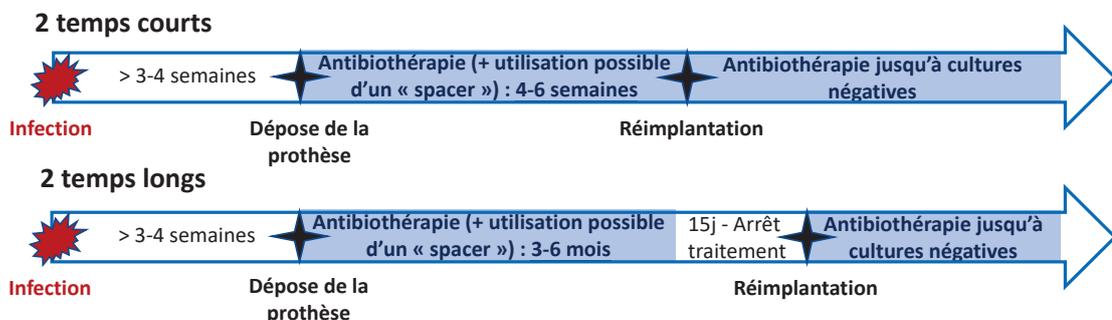


Figure 3 – Possibilités de prise en charge médicale et chirurgicale dans le cadre d'une infection sur prothèse articulaire

Il n'existe pas de consensus pour choisir la chirurgie en 1 ou 2 temps lors d'un changement de prothèse. Les approches semblent comparables en termes de risque de réinfection après l'opération, bien que les données de la littérature ne soient pas toutes issues d'études comparatives. L'approche chirurgicale en 1 temps est cependant plus confortable pour le patient, et est moins couteuse mais la chirurgie en 2 temps est une méthode plus radicale (36). En cas d'échec de ces thérapies, une résection arthroplastique définitive parfois associée à la mise en place d'un espaceur en ciment sera envisagée. L'amputation est réservée aux patients présentant une infection potentiellement mortelle, ou en cas d'échec à toutes les autres options de traitement (10).

1.3.2.2 Traitement antibiotique

Une antibiothérapie probabiliste est mise en place en postopératoire, après réalisation des prélèvements, puis adaptée aux résultats bactériologiques obtenus. Ce traitement est administré initialement par voie intraveineuse (IV). Cette voie sera utilisée habituellement pendant 15 jours, selon la bactérie identifiée et le terrain. Un relai par voie orale pourra ensuite être mis en place si la tolérance et l'observance du patient sont bonnes, et si les antibiotiques ont une biodisponibilité et diffusion osseuse intéressantes (22). Des antibiotiques à large spectre seront utilisés en probabiliste, présentant une bonne diffusion osseuse et une action sur le biofilm. Ils sont aussi choisis en fonction de l'épidémiologie locale et de l'anamnèse du patient, afin de tenter de documenter l'IPA. Leur utilisation en association est également recommandée, contenant au minimum dans leur spectre d'action *S. aureus* et les entérobactéries communautaires. (14). L'antibiothérapie est ensuite adaptée, à spectre plus étroit, dès que les prélèvements peropératoires sont analysés : une identification du micro-organisme responsable de l'infection et un antibiogramme sont réalisés, pour que le traitement choisi soit actif sur les souches incriminées.

L'antibiothérapie est étroitement surveillée, pour son efficacité et sa tolérance. L'efficacité est évaluée par une surveillance clinique (fièvre, douleur, cicatrisation, allergie) et biologique (en utilisant notamment la CRP). La tolérance est appréciée par un interrogatoire auprès du patient et par les signes biologiques (tolérance hépatique, rénale et hématologique). En effet, de nombreux effets indésirables peuvent se manifester et l'association de médicaments peut être à l'origine d'interactions. La concentration sérique ou plasmatique de certains antibiotiques est également à surveiller (notamment en cas d'association avec la rifampicine, un inducteur enzymatique) (22).

Traitement des infections sur prothèse articulaire à *S. aureus*

Lors de l'antibiothérapie initiale par voie IV, les anti-infectieux de première intention sont les β -lactamines (oxacilline, cloxacilline ou céfazoline) pour les *S. aureus* sensibles à la méthicilline (SASM). Les glycopeptides (vancomycine ou teicoplanine) ou la clindamycine sont préconisés en cas de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM), ou en cas d'allergie à la pénicilline. Ces traitements sont associés à de la gentamicine, de la rifampicine ou de l'acide fusidique (22). Il est recommandé d'utiliser une association d'antibiotiques afin d'éviter l'acquisition de nouvelles résistances par les souches staphylococciques (37).

Le relai *per os* (PO), réalisé classiquement au moins 15 jours après le début du traitement, consiste donc en une association de rifampicine et d'une fluoroquinolone (ofloxacine, péfloxacine, ciprofloxacine, lévofloxacine) (22). En deuxième intention, de l'acide fusidique, du cotrimoxazole ou de la clindamycine pourront être utilisés en association avec la rifampicine. Le recours à d'autres antibiothérapies peut également être envisagé par l'infectiologue.

La durée de traitement recommandée varie entre 6 semaines et 3 mois (23). Le traitement est à adapter selon le micro-organisme incriminé mais également selon le patient : son poids, ses antécédents ou pathologies actuelles, ses allergies à des antibiotiques, ... En cas de germe particulier ou d'IOA complexe, une expertise peut être demandé par l'infectiologue à un centre de référence : les CRIOAc (Centre de Référence des Infections OstéoArticulaires complexes) ou d'autres centres correspondants (14).

2 *Staphylococcus aureus*

2.1 Généralités sur *Staphylococcus aureus*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des *cocci* à Gram positif, regroupés en amas, caractérisés par une résistance importante en milieu extérieur, et facilement cultivables. Ces bactéries sont classifiées selon leur aptitude à faire coaguler le sang. On peut distinguer les staphylocoques à coagulase positive, principalement représentés par l'espèce *S. aureus* (aussi communément appelé staphylocoque doré) de ceux à coagulase négative (SCN), comme *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* ou *S. hominis* (38). Il s'agit souvent de bactéries opportunistes. *S. aureus* et les SCN sont particulièrement impliqués dans les infections sur matériel, comme sur les cathéters, chambres implantables, pacemakers, mais également sur les prothèses articulaires.

S. aureus appartient à la flore commensale cutanéomuqueuse humaines : 30 à 50 % des personnes saines en sont porteuses intermittentes, et 10 à 20 % sont des porteurs permanents. Le site de portage le plus fréquent est la muqueuse nasale. Sa transmission peut être manuportée, particulièrement à l'hôpital par le personnel soignant ou les patients, le pourcentage de porteurs est donc plus élevé en ce milieu. Une infection peut survenir quand la barrière cutanée est affectée (au cours d'une blessure ou d'un geste chirurgical, transmise par les soignants ou par le patient lui-même) et est favorisée par une diminution des défenses immunitaires. Ces facteurs en font un des principaux germes responsables d'infections nosocomiales, avec *E. coli* et *P. aeruginosa*. Des mesures strictes d'hygiène sont alors nécessaires pour prévenir ou limiter sa transmission à l'hôpital. Cette bactérie peut également être responsable d'infections communautaires dont certaines d'origine alimentaire (39–41).

Les infections à *S. aureus* sont principalement d'origine cutanée, par une plaie. La clinique est variée. Cette bactérie est essentiellement source d'infections cutanéomuqueuses suppuratives comme le panaris ou d'abcès cutanés, d'infections sur les ongles comme l'onyxis, d'otites ou de sinusites. Celles-ci peuvent cependant se propager au niveau loco-régional ou par voie hématogène et entraîner des bactériémies, des endocardites ou des sepsis. Elle est également responsable d'IOA natives ou sur matériel, et d'atteintes des muscles (myosites staphylococciques). *S. aureus* peut atteindre les poumons et être responsable de pneumopathies. Elle sécrète également des toxines pouvant être à l'origine d'infections toxiques : impétigo bulleux, toxi-infections alimentaires, choc toxique staphylococcique, ... (38,42)

Du fait de leurs nombreux mécanismes d'adaptation, les souches staphylococciques sont résistantes à de nombreux antibiotiques et mécanismes immunitaires, les rendant alors plus compliquées à éradiquer. La résistance à la méthicilline est la plus communément acquise, souvent retrouvée en milieu hospitalier : on parle de SARM (*S. aureus* résistants à la méthicilline) par opposition aux SASM (*S. aureus* sensibles à la méthicilline).

2.2 Mécanismes physiopathologiques des infections à *S. aureus*

2.2.1 Expression de facteurs de virulence

S. aureus exprime divers facteurs de virulence, lui assurant son pouvoir pathogène important. En effet, après la colonisation du patient par une souche, celle-ci peut provoquer différents types d'infections selon les facteurs de virulence produits. Ainsi, des protéines de surface et des toxines vont être exprimées, mais également d'autres facteurs permettant le développement et l'extension de l'infection. On peut donc classer ceux-ci selon leur action, à différents stades (42,43) :

- dans l'attachement à la cellule
- dans la persistance de l'infection
- dans la protection par échappement aux mécanismes de défenses de l'hôte cellulaire
- dans l'invasion ou la pénétration des tissus
- dans des syndromes spécifiques liés aux toxines.

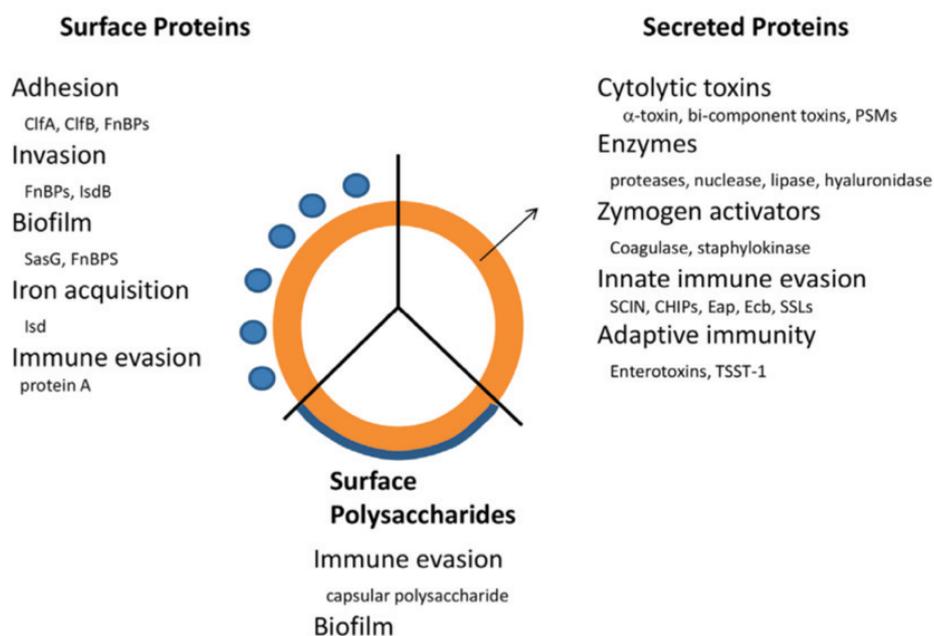


Figure 4 – Résumé des facteurs de virulence et de colonisation de *Staphylococcus aureus*. D'après Foster et Geoghegan, 2015 (44)

Tous ces facteurs de virulence et de persistance de *S. aureus* constituent des cibles thérapeutiques intéressantes. Ainsi, des anticorps sont actuellement en cours de développement pour cibler l'α-toxine, d'autres agissent sur les entérotoxines, et des formes mutées de la protéine A sont aussi à l'étude (45).

2.2.1.1 Facteurs de colonisation

Afin de coloniser les tissus et les cellules, *S. aureus* va exprimer diverses protéines de surface, lui conférant une adhésion aux tissus hôtes. La bactérie exprime des adhésines, la majorité appartiennent à la famille des MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) et reconnaissent des composants de la matrice extracellulaire. Ainsi, elles peuvent lier des molécules plasmatiques comme le fibrinogène, la fibronectine, mais également des composants cellulaires comme le collagène ou l'élastine. Ce mécanisme est particulièrement impliqué dans l'initiation de certaines infections : infections endovasculaires, IOA, IPA, (43,46)

2.2.1.2 Production de toxines et d'enzymes

Les toxines sont des substances toxiques produites par les bactéries responsables d'infections, qui vont interférer directement avec la cellule hôte, par exemple via la membrane cellulaire, les récepteurs, ou par le biais des enzymes produites (47).

Certaines toxines sécrétées sont impliquées dans le développement de l'infection. Ainsi, les « *pore-forming toxins* » (PFTs) vont induire la formation de pores dans la membrane, ce qui va entraîner un efflux d'ions nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Ce déséquilibre peut engendrer une lyse de la cellule affectée. Les PFTs sont classées en deux groupes, selon leur structure secondaire : les α -PFTs et les β -PFTs (les plus nombreuses). L'alpha-hémolysine (ou alpha-toxine) pour sa part lyse les cellules endothéliales, les monocytes et thrombocytes. Des leucotoxines interviennent également, ciblant principalement les leucocytes, dont la leucocidine de Panton-Valentine (PVL). Celle-ci est très présente dans les infections à SARM communautaires (CA-MRSA) et lyse les monocytes, macrophages, PNN, mais n'est pas hémolytique (48). Elle peut être isolée chez des sujets jeunes lors d'infections cutanées ou de pneumonies nécrosantes sévères (38). D'autres toxines, comme les hémolysines β et γ , ou encore la famille des *phenol-soluble modulins* (PSM) vont aussi être sécrétées, et possèdent une action cytolytique. Les PSMs permettent en effet la lyse des neutrophiles.

En outre, les toxines sécrétées peuvent également être responsables de pathologies spécifiques. Les exfoliatines, entre autres, peuvent être à l'origine d'impetigo bulleux staphylococcique ou du syndrome d'exfoliation généralisée, caractérisés par la perte d'adhérence de zones épithéliales de l'épiderme. D'autres toxines possèdent une activité superantigénique, elles peuvent entraîner une activation polyclonale des lymphocytes T, résultant en une activation massive du système immunitaire et la production de cytokines. La TSST-1 (*Toxic shock syndrome toxin-1*) peut être à l'origine de choc toxique staphylococcique, de même que quelques entérotoxines (B ou C). Celles-ci peuvent causer des intoxications alimentaires (49). Ces toxines sont également impliquées dans l'expression de maladies auto-immunes dont la dermatite atopique, la maladie de Kawasaki ou encore le psoriasis (44,46,47,50,51).

Certains facteurs de virulence lui confèrent également la propriété de pénétrer dans les tissus conjonctifs pour pouvoir les dégrader. Il s'agit notamment de protéases, lipases, métalloprotéases, hyaluronidases ; par leur biais l'infection va pouvoir s'expandre du foyer aux tissus avoisinants (51).

2.2.1.3 Mécanismes de défense contre le système immunitaire

De plus, *S. aureus* sécrète d'autres exoenzymes, lui permettant d'échapper au système immunitaire. Ainsi, des inhibiteurs de protéases sont produits comme l'inhibiteur CHIPS « *chemotaxis inhibitory proteins of Staphylococcus aureus* ». Lors de l'infection, celui-ci bloque le chimiotactisme des PNN et monocytes, et ainsi l'activation et la migration des cellules immunitaires (47,50).

En outre, la majorité des souches de *S. aureus* (90%) sont capables de produire une capsule polysaccharidique (39). Celle-ci permet alors à la bactérie d'être plus virulente, en lui conférant une résistance à la phagocytose, inhibée par les antigènes capsulaires. En effet, les souches encapsulées sont rendues moins sensibles à l'opsonisation, il s'agit donc d'un mécanisme supplémentaire d'évasion de *S. aureus* du système immunitaire de l'hôte. La composition de cette capsule varie d'une souche à l'autre : 11 types capsulaires différents ont été décrits (52). L'échappement immunitaire est également permis par l'action de la protéine A, appartenant aux MSCRAMMs, qui se lie aux immunoglobulines G par leur fragment Fc et protège ainsi la bactérie contre l'opsonisation et la phagocytose (42,44).

2.2.2 Survie intracellulaire

S. aureus est capable de s'internaliser et d'envahir certaines cellules, par exemple les cellules épithéliales, endothéliales, les leucocytes mais également les cellules osseuses.

Les ostéoblastes permettent la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse, ainsi que son renouvellement et la réparation des os. Les ostéoclastes, à l'inverse, sont responsables de sa résorption. Un équilibre entre l'action des ostéoblastes et ostéoclastes est donc nécessaire pour maintenir une homéostasie osseuse (7).

S. aureus interagit avec les ostéoblastes par sa capacité à les envahir. Ce phénomène est observable à la fois *in vitro* et *in vivo* (53). La première étape de cette internalisation consiste en l'adhésion bactérienne à la cellule hôte, par l'intermédiaire d'adhésines, dont les MSCRAMMs. Un pont de fibronectine se crée ensuite, reliant les intégrines de surface de la cellule $\alpha_5\beta_1$ et des protéines de surface présentes sur le staphylocoque, les *Fibronectin Binding Proteins* (FnBPA et FnBPB). Le cytosquelette d'actine va alors être réarrangé, permettant une

invagination de la membrane cellulaire et l'internalisation bactérienne dans les ostéoblastes ou les ostéocytes (54).

Le staphylocoque est ensuite présent dans les cellules infectées, il peut être persistant dans une vacuole, mais également s'en échapper et survivre dans le cytosol ou être éliminé par les lysosomes ou d'autres mécanismes antimicrobiens. *S. aureus* a la capacité d'induire la perte osseuse, en diminuant l'activité des ostéoblastes, en entraînant leur mort et activant les ostéoclastes. Il joue également sur la production de médiateurs de l'inflammation. La mort des cellules ostéoblastiques peut être due à un phénomène de nécrose (par la production de toxines dirigées contre la membrane comme les PSMs) ou par apoptose de la cellule. Par ce phénomène, les bactéries intracellulaires viables vont diffuser dans le milieu et envahir d'autres ostéoblastes pour continuer l'infection. Le staphylocoque intervient également dans le processus de maturation et d'activation des ostéoclastes résultant en une augmentation de la résorption osseuse. La perte des ostéoblastes associée à la suractivité des ostéoclastes créent alors un déséquilibre important. La destruction des cellules osseuses va donc s'étendre, pouvant induire un descellement de la prothèse (Figure 2) (55,56).

Le traitement des ostéoblastes infectés par *S. aureus* est important dans le cas d'ostéomyélite. En effet, les antibiotiques utilisés doivent présenter une activité intracellulaire pour être capables de tuer ces bactéries. Un traitement avec un antibiotique efficace, et une concentration adaptée doit donc être considéré (55). La rifampicine, la clindamycine et les fluoroquinolones ont ainsi démontré une bonne activité bactéricide intraostéoblastique. La daptomycine ou la vancomycine n'ont cependant pas une activité intracellulaire suffisante pour éradiquer ces bactéries (53,57).

2.2.3 Expression de *Small Colony variants*

Les *small colony variants* (SCVs) sont un phénotype bactérien particulier, notamment retrouvé dans les infections chroniques et persistantes à staphylocoques. Après culture sur gélose, les SCVs apparaissent sous forme de microcolonies qui sont environ dix fois plus petites que les colonies habituelles, non pigmentées et non hémolytiques. Dans la majorité des cas, elles sont moins virulentes et leur croissance est plus lente (58). Il s'agit d'un état temporaire que peut atteindre *S. aureus* lors d'une situation de stress pour assurer sa survie : variation de pH, température, osmolarité ou la prise d'antibiotiques (59). Le métabolisme de la bactérie est alors ralenti et elle exprime moins de facteurs de virulence, ce qui peut être comparé à un état

de dormance. Ce variant va ainsi lui permettre d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de faciliter sa survie intracellulaire, mais également de mieux résister à l'action des antibiotiques. Ainsi la sensibilité des SCVs aux aminoglycosides est 10 à 30 fois inférieure à celle du phénotype sauvage. De plus, leur division étant ralentie, les antibiotiques actifs contre la paroi des bactéries comme les bêta-lactamines sont également moins efficaces. Le phénotype SCV est donc plus enclin à entraîner des infections chroniques persistantes. Cependant, ce phénotype est réversible rapidement, en moins de 24 heures ces souches peuvent regagner leur virulence dès qu'elles ne sont plus soumises à leurs facteurs de stress (60–62).

De surcroît, les SCVs sont plus enclin à former un biofilm que le phénotype sauvage, ce qui renforce leur mécanisme de persistance et de résistance aux attaques de l'hôte ou des antibiotiques. Ils sont également présents dans les ostéoblastes, pour améliorer la survie intracellulaire de *S. aureus*. Ils sont donc fréquemment retrouvés au cours d'ostéomyélites ou d'infections sur matériel (63).

Il convient donc de les détecter, afin d'adapter le traitement. Un antibiotique possédant une bonne activité intracellulaire et permettant de limiter l'émergence des SCVs est alors à privilégier, comme les fluoroquinolones (57).

2.2.4 Formation de biofilm

Certaines bactéries, dont *S. aureus* et *S. epidermidis*, peuvent se regrouper et former un biofilm. Ce phénomène est habituel et commun à plus de 80 % des micro-organismes vivants (12). Il s'agit d'une communauté bactérienne complexe enveloppée d'une matrice extracellulaire. Il peut être monomicrobien, donc constitué d'un seul organisme ou polymicrobien et contenir plusieurs espèces. Celui-ci adhère à la surface d'un organisme vivant ou d'un objet inerte, prolifère et forme une barrière permettant à la bactérie de survivre et de se développer, même dans un environnement hostile. Cependant, l'existence d'agrégats semblables à des biofilms non adhérents à des surfaces a été démontrée. Ceux-ci se forment dans la cavité articulaire et persistent sous forme d'amas de staphylocoques mobiles flottants dans le liquide synovial. Ils permettent également une meilleure résistance bactérienne au système de défense de l'hôte et une tolérance aux antibiotiques (64,65).

La matrice extracellulaire, encore mal caractérisée dans la littérature, est composée d'eau, de polysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire et représente environ 80 % du

biofilm. Elle peut varier selon les espèces qui la composent. Elle permet de protéger les bactéries, favorise leur adhérence sur les surfaces et est composée de canaux aqueux pour la distribution des nutriments et de l'oxygène qu'elle piège (66).

Le biofilm est un environnement hétérogène, présentant des gradients de pH, des différences de métabolites et d'apport en oxygène et en nutriments selon sa structure. Cette structure permet la cohabitation de plusieurs espèces bactériennes ou fongiques mais également de plusieurs sous-populations d'une même espèce bactérienne (qui présentent une différence d'expression génique). Certaines souches vont avoir une activité très importante, d'autres seront dans un état de persistance (elles sont parfois appelées *persisters*) ou de dormance, et des bactéries mortes peuvent aussi être présentes (67,68).

Sa formation comporte plusieurs étapes (10,66,69,70) :

1- Adhésion des bactéries à une surface

Les premières bactéries s'attachent à la surface des tissus et biomatériaux grâce à des forces ou interactions, l'action de protéines comme des adhésines (mais également par leurs flagelles ou pili pour d'autres espèces mobiles comme *P. aeruginosa*). Cette phase initiale est dynamique et réversible.

2- Croissance et multiplication des bactéries – maturation du biofilm

Lorsque les forces d'attraction sont supérieures à celles induisant la répulsion, quelques bactéries se fixent irréversiblement, prolifèrent et forment une fine couche à la surface. La synthèse de la matrice extracellulaire est alors initiée. Le contact entre la bactérie et la surface colonisée va induire l'expression de nouveaux gènes. Ceux-ci favorisent la production de facteurs permettant aux bactéries d'être sessiles, et stabilisent le biofilm comme la formation de la matrice. De surcroît, de nouveaux micro-organismes vont s'agréger au biofilm, créant alors un film hétérogène tridimensionnel composé de plusieurs couches. Une croissance des microcolonies formées est également observée, elles deviennent des macrocolonies.

Le système de *quorum sensing* (QS) va également être impliqué dans les étapes de formation du biofilm par la communication inter-bactérienne. En fonction de la densité de population bactérienne, la bactérie va être capable de réguler l'expression de certains gènes par la production d'auto-inducteurs. Celui-ci va permettre de coordonner la maturation puis le détachement du biofilm, mais possède aussi une action sur l'expression de facteurs de virulence par *S. aureus*.

3- Détachement d'une partie du biofilm

Les bactéries peuvent se détacher, seules ou en amas, donc devenir planctoniques et être dispersées dans le milieu. Ce phénomène peut être induit par l'insuffisance de nutriments dans le biofilm, des changements environnementaux comme la variation d'apport en oxygène, des substances toxiques, une dégradation de la matrice, le phénomène de QS, ... Elles peuvent alors potentiellement infecter d'autres sites, former de nouveaux biofilms, et causer des infections chroniques récidivantes.

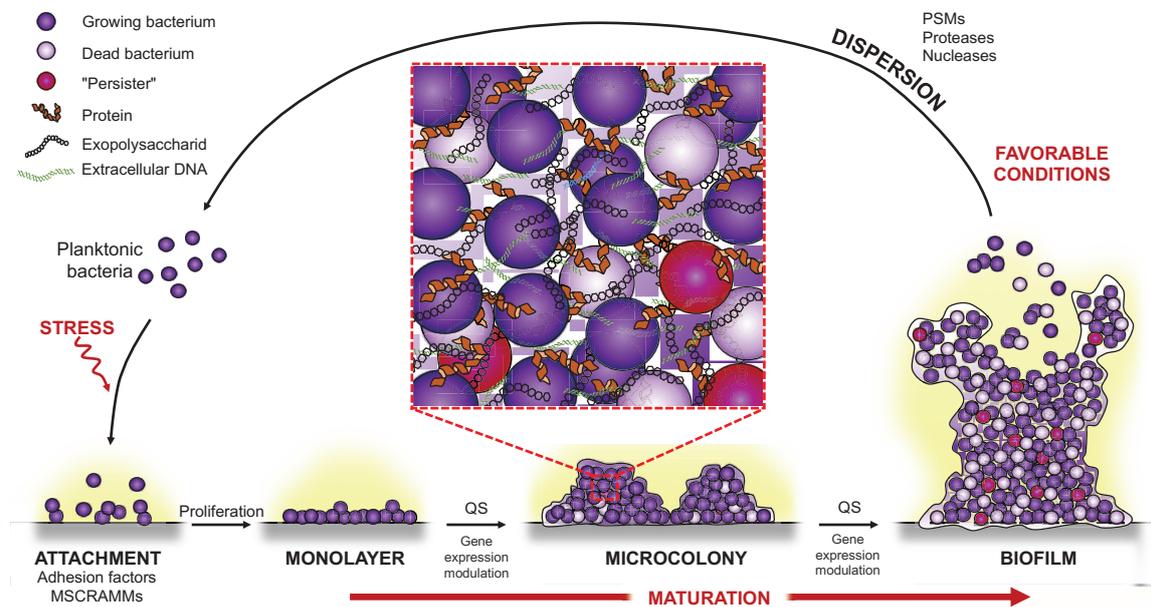


Figure 5 - Formation et maturation du biofilm bactérien, d'après J.Josse

La présence de ce biofilm complique donc fortement l'élimination de la bactérie par des mécanismes immunitaires de l'hôte mais aussi par des antibiotiques. En effet, ceux-ci peinent à diffuser dans la matrice du biofilm et ne peuvent donc pas ou peu atteindre les bactéries impliquées. Un gradient de concentration se forme à l'intérieur de la matrice, et les bactéries des couches profondes sont plus difficiles à atteindre. En outre, l'activité du biofilm peut générer un environnement acide ou anaérobie, peu favorable aux antibiotiques. Plusieurs gènes vont également être exprimés, régulant des mécanismes de résistance aux antibiotiques comme l'activité de pompes à efflux. De plus certaines bactéries sont dans un état de « persistance », elles peuvent survivre même en présence de fortes concentrations d'antibiotiques bactéricides, et sont difficilement atteignables par le système immunitaire dans

le biofilm (71,72). Un biofilm mature est plus résistant qu'un biofilm jeune, à la fois à la phagocytose, mais également à l'action des antibiotiques.

Ce phénomène est particulièrement impliqué dans les IOA. En effet, le biofilm est présent dans plus de 80 % des infections, incluant les méningites, infections rénales, endocardites, mais également les infections sur prothèse et autres dispositifs médicaux implantables (cathéters, stents, valves cardiaques, ...). La présence d'un matériel étranger est très propice à la colonisation et elle diminue de plus de 10^5 fois la dose minimale d'UFC (Unité Formant Colonie) de *S. aureus* nécessaire pour former un abcès permanent. Ceci s'explique en grande partie par la formation de biofilm à sa surface, les bactéries peuvent facilement y adhérer (71,73).

Le traitement des infections sur dispositifs médicaux est donc complexe, une antibiothérapie seule n'est généralement pas suffisante pour l'éradication du biofilm formé. C'est pour cette raison qu'une prise en charge chirurgicale doit lui être associée. La prévention de formation de biofilm est également indispensable par l'adoption de mesures stériles pour la pose de prothèse ainsi qu'une antibioprophylaxie efficace lors de l'opération. En outre, certains matériaux sont moins susceptibles d'être colonisés que d'autres, par exemple l'argent et les nanoparticules d'argent sont à l'étude pour leur activité anti-biofilm (72).

2.3 Antibiotiques et résistance

2.3.1 Émergence de résistance chez *S. aureus*

Le traitement des infections à *S. aureus* est compliqué, de par l'émergence de nombreuses résistances. Dès les années 1940, soit quelques années après le début de son utilisation clinique, l'apparition de résistance à la pénicilline par *S. aureus* est constatée. De plus, en 1960, seulement un an après l'introduction de la méthicilline, les premiers SARM ont été retrouvés au Royaume-Uni (51,74).

En effet, le génome bactérien du staphylocoque doré est très adaptable selon les conditions environnementales, il est composé d'éléments génétiques mobiles et accessoires déterminant sa virulence et résistance. Il peut alors échanger une partie de son matériel génétique avec d'autres espèces bactériennes, par un transfert horizontal de gènes (75). Ces échanges peuvent

aboutir à une acquisition de nouvelle résistance par *S. aureus*. Des régulations de mécanismes de résistance naturellement existants chez la bactérie peuvent aussi être majorés, parfois induits par un usage prolongé d'antibiotiques, et réduisent ainsi la sensibilité de la souche aux traitements.

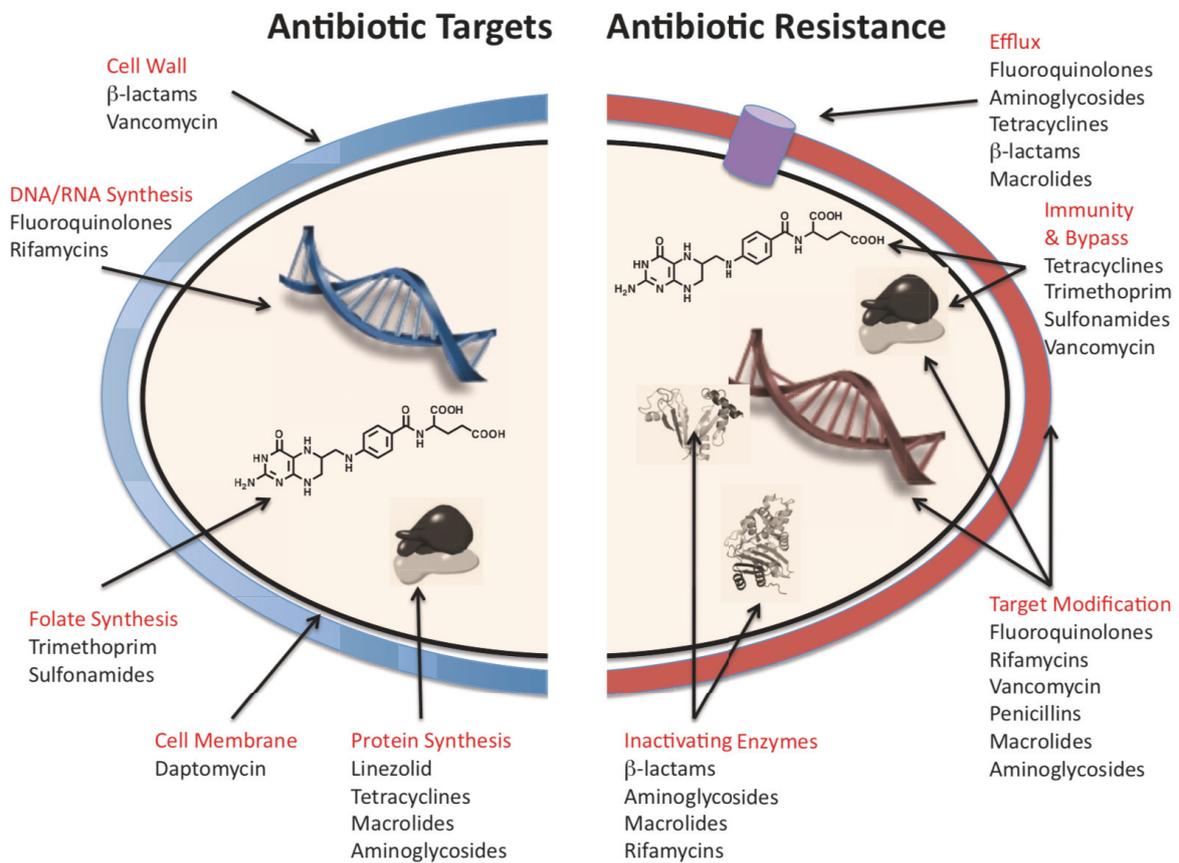


Figure 6 - Mode d'action des antibiotiques et mécanismes de résistance. D'après Wright, 2010 (76)

2.3.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance la plus courante et la plus étudiée pour le staphylocoque doré reste celle à la méthicilline (souches SARM). Ces souches représentent aujourd'hui en France 30 à 50 % des infections à *S. aureus* et sont classiquement retrouvées à l'hôpital. Néanmoins, certains SARM communautaires sont apparus depuis les années 2000 (CA-MRSA), et sont en augmentation. Ces souches sont généralement plus susceptibles aux antibiotiques, mais possèdent une virulence augmentée, certaines pouvant notamment exprimer la leucocidine de Pantone-Valentine (75,77).

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'apparition d'une résistance : modification de la cible des traitements, interaction avec le phénomène d'efflux, inactivation d'enzymes ou encore une action sur l'imperméabilité de la bactérie (Figure 6).

En modifiant la cible des antibiotiques, *S. aureus* peut en devenir résistant. Ainsi, la résistance des SARM est due à l'acquisition d'un gène *mecA*, inclus dans une cassette staphylococcique, un élément génétique mobile (*staphylococcal cassette chromosome mec* ou SCCmec). Celui-ci va coder un homologue de la protéine liant les pénicillines, cible initiale de ces antibiotiques. Cette modification de la cible va donc diminuer la sensibilité des staphylocoques aux traitements. D'autres gènes de résistances sont également inclus dans cette cassette, induisant la multirésistance de certains SARM (74). Des résistances à divers traitements peuvent être acquises par la mutation de cible : la topoisomérase et l'ADN gyrase pour les fluoroquinolones, l'ARN ribosomique pour les macrolides, ...

La surexpression de pompes à efflux par les souches bactériennes peut également diminuer leur sensibilité à des antibiotiques comme les fluoroquinolones, les tétracyclines, ou encore les macrolides. L'antibiotique est alors présent en quantité insuffisante dans le cytosol, induisant une augmentation de la CMI et donc une sensibilité diminuée. De plus, une mutation génétique de transporteurs avec un spectre large peut entraîner une multirésistance (78).

Des inactivations enzymatiques donnent aussi lieu à l'émergence de nouvelles résistances. Une résistance aux aminosides comme la gentamicine peut ainsi apparaître par l'action d'enzymes inactivatrices, par des phénomènes d'adénylation, d'acétylation ou encore de phosphorylation. La production de méthylase peut induire des phénomènes de résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramines B. De cette manière, une résistance staphylococcique à la clindamycine peut être acquise. (79)

L'imperméabilité de la paroi bactérienne peut aussi être affectée. Par exemple certaines souches de *S. aureus* présentent une sensibilité diminuée aux glycopeptides, résultant en une augmentation de la CMI de vancomycine pour le traitement. Elles sont nommées VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*) ou GISA (*glycopeptide intermediate S. aureus*) lorsque cela concerne l'ensemble des glycopeptides. Quelques rares souches résistantes VRSA (*vancomycin resistant S. aureus*) ont été rapportées, dues à l'acquisition d'un gène. Certaines populations sont caractérisées hétéro-VISA (h-VISA), il s'agit de populations hétérogènes de sensibilités différentes à la vancomycine, difficiles à détecter, particulièrement par la croissance ralentie des VISA. Ces souches sont principalement des SARM. Cette sensibilité intermédiaire

(souches VISA et h-VISA) semble être due à un épaississement de la paroi bactérienne, inductible par un usage prolongé de glycopeptides, mais sans support génétique connu. Ce phénomène implique une augmentation du nombre de cibles des glycopeptides, leur activité résultante est alors insuffisante (75,80).

2.3.3 Utilisation des antibiotiques

Quelques antibiotiques ne sont jamais prescrits en monothérapie, afin de prévenir l'émergence de résistances. Ainsi, la rifampicine est un antibiotique bactéricide à spectre large, très utilisée dans le traitement des infections à staphylocoques, dont les IOA. Cependant, elle doit être utilisée en association du fait de l'émergence rapide de résistance à cet antibiotique. Les mêmes précautions sont à prendre pour l'acide fusidique, également beaucoup employé, ainsi que la fosfomycine, pour lesquels *S. aureus* présente des fréquences élevées de mutations (79).

S. aureus est donc très adaptable à son environnement par l'acquisition de résistances aux antibiotiques, son échappement au système immunitaire, ses facteurs de virulence et de persistance.

Lors d'infections, il est important de détecter la bactérie responsable (dans ce cas *S. aureus*) mais également de la caractériser (présence de SCV, de biofilm, réalisation d'un antibiogramme, ...) pour pouvoir proposer au patient un traitement efficace. Du fait de l'apparition de nombreuses résistances, le choix des antibiotiques est important et parfois complexe. De plus, cela restreint l'usage des antibiotiques, limitant les nouvelles molécules à certaines indications précises. Le choix du traitement et de la dose administrée doit donc être judicieux, lui permettant d'être efficace contre la souche bactérienne tout en évitant l'apparition de nouvelles résistances.

3 Utilisation de ciment orthopédique supplémenté en antibiotiques

3.1 Fabrication des ciments orthopédiques

3.1.1 Généralités sur les ciments orthopédiques

L'usage initial et principal des ciments orthopédiques est la fixation de prothèses. La majorité des ciments osseux sont fabriqués en utilisant du polyméthylméthacrylate (PMMA). L'utilisation du PMMA commence au début du XIX^e siècle, il est breveté sous la marque « Plexiglas » en 1933 par le chimiste Otto Rohm pour une utilisation industrielle dans la construction d'avions ou de sous-marins. En 1936, la société Kulzer développe l'emploi du ciment osseux en mélangeant de la poudre de PMMA et du méthylméthacrylate (MMA) liquide, mais ce mélange devait être chauffé à 100 °C pour être polymérisé. Le ciment osseux polymérisable à température ambiante a été développé et breveté en 1943 par la société Kulzer, et utilisé initialement en odontologie. Sa première utilisation en orthopédie est due au Dr John Charley en 1958 pour une arthroplastie fémorale en tant que fixateur. Depuis, les techniques se sont améliorées et le ciment osseux est très employé en chirurgie orthopédique, à la fois pour sceller des prothèses, corriger certains défauts, stabiliser des fractures notamment au niveau vertébral mais également lors d'infections. Dans ce dernier cas, le ciment peut servir à prévenir ou traiter une infection de prothèse en ajoutant des antibiotiques au PMMA, ou une ostéite grâce à des chaînes de billes de ciments en comblement d'une cavité (6,81,82).

Divers substituts osseux synthétiques sont disponibles, mais moins utilisés, par exemple des ciments phosphocalciques sont disponibles, ou encore d'autres à base de polyalkénoate, plus employés en odontologie, qui ne seront pas évoqués ici (83).

Les ciments orthopédiques sont aujourd'hui classés comme dispositifs médicaux, de classe IIB pour le marquage CE selon le règlement européen pour les dispositifs médicaux 2017/745. Lorsqu'ils contiennent un ou des antibiotiques, ils sont alors considérés comme des produits de classe III, car ils permettent l'administration d'un médicament. Cette classification est liée à leur destination et les risques inhérents, ces dispositifs sont donc considérés comme présentant un risque élevé ou très élevé. Ceci est principalement lié à leur longue durée d'utilisation, ainsi que leur caractère invasif (84,85).

3.1.2 Préparation des ciments orthopédiques

Le ciment est obtenu en mélangeant une poudre avec un liquide, passant d'une forme liquide à solide en une dizaine de minutes. La poudre contient du PMMA, un initiateur (le peroxyde de benzoyle), un radio-opacifiant (souvent du dioxyde de zirconium ou du sulfate de barium) et peut aussi être composée d'un ou plusieurs antibiotiques. Le liquide est lui formé à partir de MMA et d'un activateur, le diméthyl-paratoluidine, qui encourage la polymérisation à température ambiante (83). Un stabilisateur, comme l'hydroquinone peut également être ajouté pour éviter une polymérisation précoce. Il est possible d'adjoindre de la chlorophylle en tant que colorant, afin de bien distinguer le ciment de l'os. La poudre de PMMA et le liquide contenant le MMA sont alors mélangés, afin de former une pâte. L'activateur et l'initiateur vont réagir ensemble et libérer un grand nombre de radicaux libres, qui permettent la polymérisation rapide du MMA en PMMA, et ainsi le durcissement du ciment. Cette réaction est exothermique et peut atteindre des températures très élevées, entre 70 et 120 °C *in vitro*. Cependant, cette température est considérablement réduite *in vivo*, à environ 40-46 °C. Cette différence peut s'expliquer par la fine épaisseur de la couche de ciment, la circulation sanguine, l'interface avec l'os et les échanges thermiques avec les tissus (6,82).

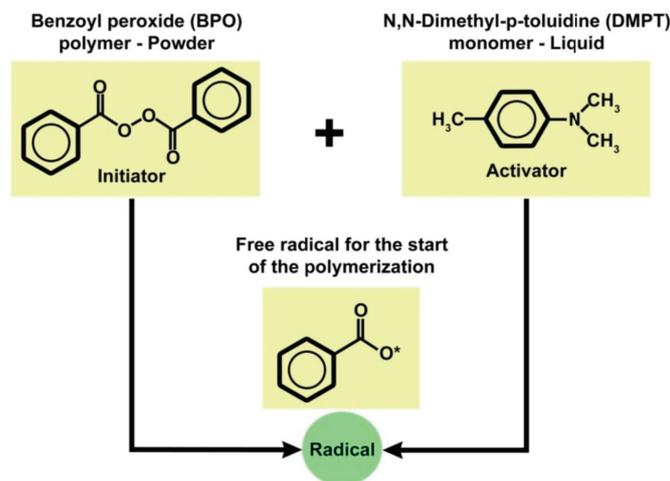


Figure 7 - Initiation de la polymérisation du MMA, d'après Seyyed Hosseinzadeh, 2013 (82)

L'étape de mélange entre la poudre et le liquide est très importante : lors de celle-ci vont se former des pores, ils résultent de la réaction chimique qui se produit et de la variation de volume. Ceux-ci peuvent cependant être à l'origine de fissures et fragiliser le ciment. Il est alors possible de réaliser cette phase sous vide, pour obtenir un mélange plus homogène et moins poreux. Ensuite, une période d'attente de quelques minutes est à observer afin d'atteindre une

viscosité suffisante, avant une phase de travail pendant laquelle le ciment peut être manipulé et mis en place. La phase de durcissement termine ce processus de fabrication (82,86).

La viscosité du ciment est fondamentale : une viscosité faible diminue ses propriétés mécaniques et augmente le risque de descellement. Une viscosité élevée est donc recommandée afin de privilégier la longévité du ciment et éviter sa reprise. Cependant, une viscosité trop élevée empêchera une bonne pénétration du ciment entre l'os et le matériel : plus celui-ci est fluide, plus il pourra pénétrer dans les interstices. La maîtrise de ce paramètre est donc primordiale pour le bon maintien du ciment (83).

3.1.3 Ajout d'antibiotiques aux ciments orthopédiques

L'addition d'antibiotiques au ciment date de 1970, par Buchholz et Engelbrecht, par l'ajout de gentamicine au PMMA. Celle-ci est libérée progressivement par diffusion dans le milieu et va pouvoir agir localement sur des infections ou être utilisée en prophylaxie pour les prévenir. En effet, en plus du risque de contamination présent au cours de l'opération, la rugosité de la surface des ciments facilite l'adhésion des bactéries, et ainsi la formation de biofilm ; une prévention du développement d'infection est donc importante. Cependant, la libération de l'antibiotique s'opère en deux phases. La concentration atteinte sera très forte les premiers jours après la pose du ciment pour diminuer graduellement ensuite et atteindre une concentration faible mais stable. En effet, selon des travaux *in vitro* de H. Wahlig et E. Dingeldein (1980), la concentration de gentamicine était détectable durant 5 ans, mais à des valeurs très faibles à la fin de l'expérience. Cette quantité libérée sera aussi proportionnelle à la surface occupée par le ciment, une grande surface permettant une meilleure élution (87). Le taux d'antibiotiques atteint doit rester supérieur à la CMI de la souche bactérienne pour pouvoir inhiber sa croissance ou entraîner sa mort. Toutefois, cette technique d'ajout de médicament au PMMA est controversée par certaines études car elle pourrait affecter les propriétés mécaniques du ciment et engendrer des résistances aux traitements utilisés (4).

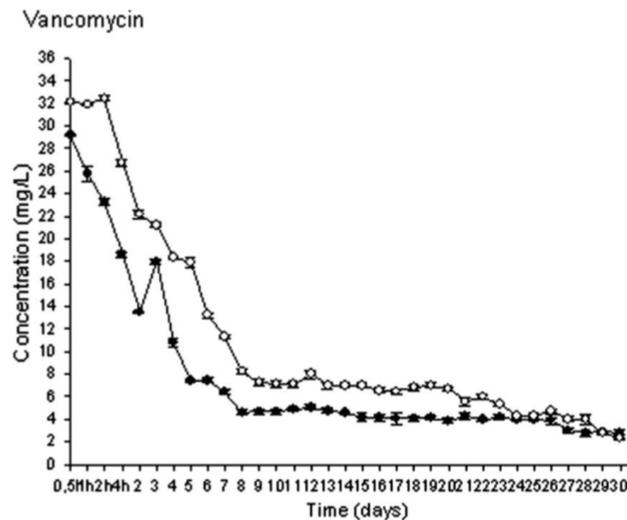


Figure 8 - Cinétique d'élution in vitro de la vancomycine et par Galvez-Lopez et al. (88).

Les cercles blancs représentent une concentration de 20 % en antibiotiques, 10 % pour les cercles noirs

Plusieurs antibiotiques peuvent être utilisés, mais tous ne possèdent pas les propriétés nécessaires pour être sélectionnés. Ils doivent en effet satisfaire certaines contraintes :

- Ils doivent être stables à température élevée, afin de ne pas se dégrader lors de la polymérisation du PMMA, pouvant atteindre plus de 80 °C. Ils ne doivent pas non plus entraîner d'interaction avec le PMMA ou les autres composants.
- Leur spectre d'action doit inclure les micro-organismes les plus fréquemment retrouvés dans ses infections, en particulier *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et des bacilles aérobies Gram négatifs.
- Ces antibiotiques doivent pouvoir agir à faible dose pour que leur action soit prolongée au sein du ciment.
- Leur solubilité doit être élevée dans l'eau, leur permettant ainsi une bonne diffusion dans le milieu.
- Ils ne doivent pas être source d'allergie.
- Ils ne doivent pas favoriser le développement de résistance.
- Ils nécessitent d'être insérés dans le ciment sous forme solide dans la poudre, la forme liquide favorisant l'altération des propriétés mécaniques du PMMA. Les caractéristiques mécaniques du ciment (résistance à la rupture, élasticité, densité) doivent rester similaires malgré l'addition d'antibiotiques.

La gentamicine, vancomycine, clindamycine et tobramycine répondent notamment à ces critères et sont les plus communément ajoutés aux ciments osseux (4,86,89). La rifampicine par exemple, très utilisée pour traiter des infections à *S. aureus* ne peut pas être mélangée au PMMA car elle retarde son durcissement. Les fluoroquinolones sont également peu employées à cause de leur action cytotoxique à haute concentration (12).

Les antibiotiques peuvent être directement contenus dans la poudre commercialisée ou ajoutés extemporanément par le chirurgien dans la phase solide au cours de l'intervention, avant le mélange. Cette méthode manuelle ne permet pas cependant d'obtenir un mélange aussi homogène que le mélange industriel. Ces ciments peuvent contenir un seul antibiotique, mais également une combinaison. Celle-ci permettra alors d'obtenir un spectre d'action plus large, certains antibiotiques présentent aussi des effets synergiques, comme les aminoglycosides et les glycopeptides. Une synergie est observée lorsque l'action de 2 médicaments associés est supérieure à la somme des actions séparées des médicaments. Cette association présente ainsi plusieurs avantages : elle permet d'améliorer le spectre d'activité du traitement, d'augmenter la vitesse de bactéricidie, de prévenir la sélection de mutants résistants et de diminuer les doses de chacun des médicaments qui la compose. De plus, l'ajout d'au moins deux antibiotiques permet de former plus de vides dans le ciment et donc une libération plus importante dans le milieu des substances qu'il contient (4). Les combinaisons peuvent être réalisées par l'industriel ou un deuxième antibiotique peut parfois être ajouté manuellement à une poudre commerciale en contenant déjà un. L'étape de mélange est très importante : le ciment doit être assez poreux pour permettre une bonne diffusion des antibiotiques, mais pas trop afin de ne pas fragiliser sa structure (86).

3.1.4 Antibiotiques utilisés

Beaucoup d'antibiotiques peuvent être inclus seuls ou en association dans la composition de ciments orthopédiques. Ainsi, en 2016, au sein des ciments commercialisés en France, de la gentamicine, clindamycine, vancomycine, érythromycine, colistine et tobramycine étaient employées (84). Cependant, seuls les traitements utilisés dans l'étude menée seront évoqués ici, soit la gentamicine, vancomycine, et clindamycine.

3.1.4.1 Gentamicine

La gentamicine fait partie de la famille des aminosides ou aminoglycosides, elle possède une action bactéricide concentration-dépendante. Elle se fixe de façon irréversible à la sous unité 30S du ribosome bactérien et inhibe ainsi la synthèse protéique, en entraînant des erreurs de lecture de l'ARN messager. Des protéines aberrantes s'accumulent aussi dans le cytoplasme. Ceci va altérer la perméabilité de la membrane cellulaire, permettre la rupture de l'enveloppe cellulaire, et provoquer la mort de la bactérie (90). Son spectre d'activité comprend principalement des bacilles aérobies Gram négatif, quelques bactéries aérobies Gram positif, les bactéries anaérobiques ne sont généralement pas sensibles aux aminoglycosides. Les souches de *S. aureus* étaient initialement toutes sensibles à cet antibiotique. Néanmoins, des résistances sont apparues dans les années 1970, et 10 ans après, la majorité des souches SARM étaient également résistantes à la gentamicine (91). Il s'agit de l'antibiotique le plus utilisé comme composant des ciments osseux, grâce à un spectre antibactérien intéressant, une bonne stabilité thermique et hydrosolubilité (84).

3.1.4.2 Vancomycine

La vancomycine appartient à la famille des glycopeptides. Elle possède une activité bactéricide temps-dépendant et inhibe la synthèse de la paroi bactérienne (90). En effet, elle se lie au précurseur du peptidoglycane, qui ne peut donc pas devenir mature et former une paroi. Son spectre d'activité contient principalement des bactéries Gram positif, les bactéries Gram négatif y sont naturellement résistantes. La molécule ne peut effectivement pas traverser leur membrane externe à cause de sa taille importante. La vancomycine était active sur toutes les souches de *S. aureus* jusque dans les années 1990, avec l'apparition de souches h-VISA, VISA puis de rares VRSA ensuite (*cf* paragraphe 2.3). Les souches de staphylocoques à coagulase négative, comme *S. epidermidis* y sont également sensibles (92,93).

3.1.4.3 Clindamycine

La clindamycine fait partie de la famille des lincosamides. Elle possède une activité bactériostatique. Elle inhibe la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome. Cet antibiotique est actif contre la majorité des bactéries à Gram positif comme les staphylocoques (dont certaines souches SARM), les pneumocoques et d'autres

streptocoques. Les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes aux lincosamides. Cependant, des souches de *S. aureus* résistantes à la clindamycine sont de plus en plus retrouvées. Ce traitement possède également des propriétés immunomodulatrices, en augmentant la production d'anticorps, potentialisant la phagocytose et l'opsonisation, ... Il possède une bonne pénétration dans les os et le liquide synovial, peut agir sur des *S. aureus* intracellulaires et augmenter l'activité des neutrophiles. Il est aussi capable d'inhiber la formation de biofilm et l'adhérence bactérienne, ce qui en fait un bon candidat pour le traitement des infections ostéoarticulaires, en particulier des IPA, malgré son activité bactériostatique (94,95).

3.2 Indications

3.2.1 Utilisations du ciment osseux en PMMA en chirurgie orthopédique

Ces ciments sont utilisés comme fixateur lors de la pose d'implants articulaires tels que des prothèses de hanche, de genou, d'épaule, de cheville et de coude (84). En effet, il s'agit de leur indication d'origine, et celle pour laquelle ils sont principalement employés. Le ciment permet d'adapter les prothèses à la morphologie osseuse du patient, mais également de les stabiliser en répartissant les contraintes (6).

Une autre indication des ciments orthopédiques est la vertébroplastie et kyphoplastie. La vertébroplastie est l'injection dans les vertèbres de ciment pour renforcer le rachis, éventuellement stabiliser les fractures et permettre de diminuer les douleurs des patients. La kyphoplastie ou cyphoplastie repose sur le même principe, en créant auparavant une cavité dans le corps vertébral à l'aide de ballonnets, ce qui permet également de réduire la déformation de la colonne vertébrale. Ceci permet de diminuer les risques de fuite de ciment par rapport à la vertébroplastie. Ces techniques sont à visée antalgique, elles sont aussi utilisées en chirurgie oncologique, en cas de métastases ostéolytiques (96,97).

La technique de « membrane induite » par Masquelet a été développée pour induire une reconstruction osseuse en utilisant des ciments orthopédiques. Elle se réalise en deux temps et est employée lors de défauts osseux importants sur les os longs : traumatisme, ostéomyélite, résection de tumeur. La première étape consiste à exciser les parties lésées de l'os, stabiliser ce

défaut, consolider éventuellement les parties molles grâce à un lambeau et ajouter un espaceur en PMMA. Ce système permet d'éviter le comblement du défaut par du tissu fibreux. Durant 6 à 8 semaines, une membrane va se développer et encapsuler le ciment. Celle-ci crée un environnement favorable, permettant la reconstruction de l'os par une riche vascularisation et la sécrétion de facteurs de croissance. Lorsque les parties molles sont cicatrisées, une deuxième intervention a lieu, l'espaceur en PMMA est enlevé, mais la membrane reste en place. La cavité créée est comblée avec de l'os spongieux prélevé sur ce même patient, en général à partir d'os iliaque, permettant une reconstruction osseuse. Des ciments avec antibiotiques peuvent également être utilisés au cours de cette technique (98,99).

Le ciment en PMMA est utilisé également pour combler des défauts osseux, par exemple dus à des tumeurs ou des traumatismes. Il peut ainsi être intéressant d'ajouter des substances bioactives, comme du chitosan ou de l'hydroxyapatite, permettant alors une meilleure croissance des tissus osseux (100).

Le ciment osseux peut être employé lors d'infections : soit d'ostéites, soit d'infections sur prothèse. Dans ces cas, il peut être ajouté un antibiotique, afin de traiter localement l'infection ou pour un effet prophylactique. Toutefois, il n'existe pas actuellement de recommandation française concernant l'utilisation de ciment avec ou sans antibiotiques, le ciment à privilégier, le type d'antibiotique ou encore leur dosage (84).

3.2.2 Intérêts du ciment supplémenté en antibiotiques

Le but de l'ajout d'antibiotiques au ciment est d'obtenir une concentration locale très importante, qui ne pourrait pas être atteinte par la voie orale ou IV sans des effets toxiques sérieux dus à la posologie élevée des médicaments. Le ciment agit alors comme un système de libération de médicament, à visée prophylactique ou curative. Cependant il ne dispense pas d'une antibiothérapie complémentaire par voie IV ou orale (89).

Les ciments avec ajout d'antibiotiques peuvent avoir diverses utilisations : (84)

- Lors d'une arthroplastie primaire, il peut être utilisé en prophylaxie si le patient présente des antécédents d'infections sur articulation ou en routine, souvent pour les articulations de la hanche ou du genou.
- Lors de révision aseptique de prothèse de hanche ou de genou, il est employé en prophylaxie, mais également en tant que traitement additionnel lors d'une prise en

charge en 1 temps d'une IPA. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de caractériser la souche responsable avant le choix du ou des antibiotiques à utiliser.

- Ils peuvent également être utilisés en tant qu'espaceurs ou *spacers* lors de chirurgie de reprise de prothèse en 2 temps.

L'ajout d'un antibiotique au ciment PMMA permet donc de réduire le risque d'infection suite à l'intervention chirurgicale. En effet, celui-ci diminue de moitié environ, passant de 2,3 % à 1,2 % pour une arthroplastie primaire de hanche (selon une méta-analyse de Parvizi *et al.*, 2008). Ces résultats sont confirmés par des données issues de registres de Norvège et de Suède (101). Son utilisation diminue donc également le risque de rechute après remplacement d'une prothèse infectée.

Ces ciments chargés en antibiotiques locaux peuvent être utilisés lors d'un changement de prothèse en un temps, mais également en deux temps, sous forme d'un espaceur. Ils contiennent généralement des doses plus élevées en antibiotiques. Ceux-ci peuvent être fabriqués à la main, parfois avec l'aide d'un moule, ou pré-fabriqués, statiques ou dynamiques (Figure 9). Ils permettent de délivrer une concentration locale importante du traitement, supérieure à la CMI de la souche, tout en stabilisant temporairement l'articulation en l'absence de prothèse. Certains espaceurs permettent également au patient de garder une certaine mobilité, par exemple au niveau de l'articulation du genou.

L'utilisation de chaînes de billes de PMMA imprégnées en antibiotiques est possible, mais les propriétés mécaniques du ciment ne sont alors pas exploitées, il ne sert pas de fixateur ou de stabilisateur. Elles sont adaptées au remplissage de cavités, employées par exemple au cours d'ostéomyélites. Elles permettent une libération plus importante du traitement car présentent une plus grande surface en contact avec le milieu (101,102).

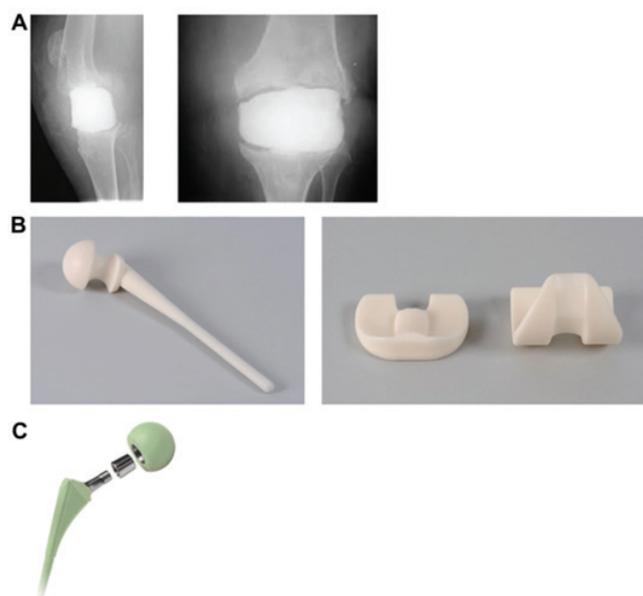


Figure 9 - Divers espaceurs pour le genou et la hanche, d'après Van Vugt et al (101).
 A- espaceur travaillé à la main. B- espaceurs modelés grâce à un moule. C- exemple d'espaceur mobile

Comme indiqué auparavant (au paragraphe 3.1.3), une association de deux antibiotiques permet d'obtenir un spectre antibactérien plus large qu'avec une seule substance. De plus, certaines molécules ont des effets synergiques. Leur combinaison permet alors une augmentation de libération des antibiotiques mais également une amélioration de l'efficacité antibactérienne. Ainsi, une combinaison de gentamicine et de vancomycine permet, en plus d'obtenir un spectre d'action couvrant presque tous les pathogènes, une meilleure libération en comparaison à un ciment chargé seulement en gentamicine (Figure 10). Une association de gentamicine et clindamycine offre également un meilleur effet antibactérien, la clindamycine ayant une bonne activité intracellulaire (86,101). En outre, une association d'antibiotiques permet de diversifier les mécanismes de défense pour la prévention de formation de biofilm, et d'avoir une meilleure action pour l'éradication de ces derniers. La combinaison d'un ciment chargé en antibiotiques et d'un traitement systémique permet ainsi de varier les mécanismes d'activités antibactériens.

De plus, beaucoup de souches sont résistantes ou présentent une susceptibilité diminuée à certains antibiotiques, l'ajout d'un deuxième médicament permet donc d'obtenir une action plus conséquente sur ces pathogènes. Ainsi, l'addition de clindamycine à de la gentamicine permet d'avoir une action inhibitrice sur les souches résistantes à cette dernière. De surcroît, ceci pourrait prévenir l'apparition de nouvelles résistances (103).

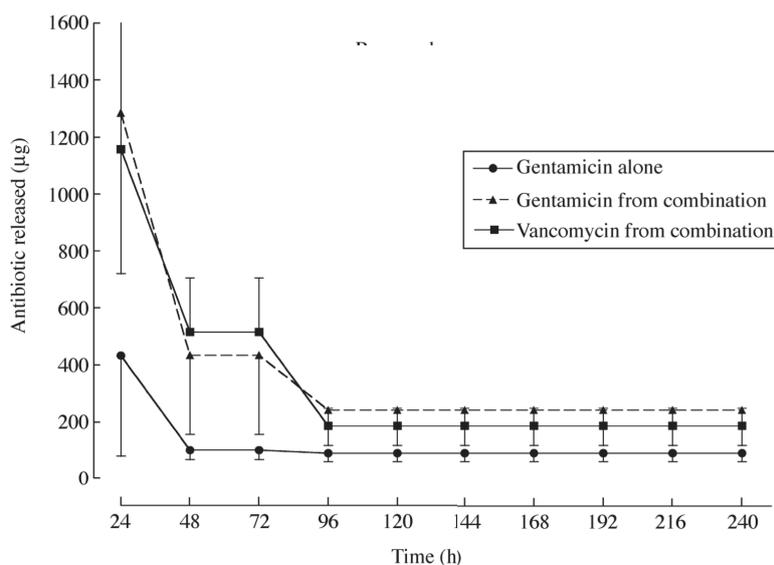


Figure 10- Éluion *in vitro* d'antibiotiques après retrait de spacers implantés durant 12 à 36 semaines dans des hanches de patients, d'après Bertazzoni Minelli et al. (104)

3.3 Effets indésirables et complications

3.3.1 Complications liées à l'utilisation de ciment orthopédique

Le syndrome d'implantation ou encore « choc au ciment » (en anglais *Bone Cement Implantation Syndrome*) est une complication à l'origine de mortalité et morbidité importante. Il est habituellement retrouvé chez des patients ayant subi une arthroplastie de la hanche. Le mécanisme physiopathologique n'est pas bien connu, l'hypothèse la plus plausible étant la formation d'une embolie. Les signes cliniques peuvent être variés : hypoxie, hypotension, perte de connaissance du patient, arythmie voire arrêt cardiaque (6,83).

La fuite de ciment est également une complication redoutée, souvent présente au cours de vertébroplastie. Celui-ci peut envahir les tissus voisins et causer des complications neurologiques (6).

En outre, le ciment orthopédique est un matériau pour lesquelles les bactéries présentent une bonne adhérence, elles peuvent facilement se fixer et un biofilm peut donc se développer à sa surface. Le risque d'infection peut alors être augmenté par rapport à une prothèse non cimentée. Cependant, selon plusieurs études, l'ajout d'antibiotiques au PMMA permet de réduire le risque d'IOA, il est alors similaire au risque encouru suite à la pose d'une prothèse

non cimentée. Bien que l'utilisation de ciment avec antibiotiques ne soit pas remise en cause, son intérêt clinique est parfois discuté et elle peut entraîner des complications (84,105).

3.3.2 Inconvénients liés à l'ajout d'antibiotiques au PMMA

L'hydrophobicité du PMMA limite la diffusion des antibiotiques. En effet, la libération des molécules anti-infectieuses se déroule en 2 temps : celles qui sont présentes à la surface sont très rapidement libérées après l'implantation du ciment. Dans un second temps, celles qui sont internalisées au niveau des pores, par le passage de fluides, pourront également diffuser et agir dans le milieu. Cependant, la majeure partie de l'antibiotique sera piégée dans le ciment et n'aura aucune action même dans le temps. Selon les études et les ciments utilisés, cette proportion de substance libérée varie entre environ 5 et 20 %. Certaines techniques permettent d'améliorer cette libération, on peut notamment ajouter des polymères hydrosolubles, comme la glycine ou le xylitol (86,101,104,106).

La prothèse ou le ciment peuvent générer des débris, qui vont entraîner une réaction inflammatoire et potentialiser la résorption osseuse. Cependant, il n'a pas été identifié d'augmentation de risque de descellement mécanique (ou descellement aseptique) de prothèse cimentée en ajoutant de la gentamicine au PMMA. Quelques études démontrent même la supériorité des ciments avec antibiotiques (84,107,108).

Les propriétés mécaniques du ciment sont légèrement altérées par l'ajout d'antibiotiques. Toutefois il s'agit d'une très faible dose, qui induit une fragilisation, mais celle-ci reste mineure et les exigences ISO 5833 sur les propriétés du ciment orthopédique restent respectées (en termes de compression, de pic de température, de flexion, ...) (107).

La concentration locale très importante des antibiotiques pourrait être à l'origine d'effets toxiques. Néanmoins, selon la conférence de consensus de 2008, les experts ont décrit l'absence de toxicité majeure avec l'utilisation de ciment supplémenté en gentamicine : ototoxicité ou néphrotoxicité. Toutefois, des posologies élevées (plus de 2 g d'antibiotiques) sont contre-indiquées chez des patients atteints d'insuffisance rénale (107).

Une des complications de l'ajout d'antibiotiques au ciment est l'apparition de résistance. En effet, il s'agit d'un traitement à libération prolongée et au bout d'un certain temps, la concentration en substance libérée devient inférieure à la CMI (elle est donc sub-inhibitrice).

Dans ces conditions, la bactérie n'est plus affectée par les médicaments, sa croissance n'est plus inhibée et elle peut développer des résistances par des mutations. Certains auteurs ont démontré l'apparition de résistances bactériennes à la gentamicine après utilisation de ciments supplémentés en cet antibiotique. De plus, des fissures ou fractures peuvent se créer dans le ciment au cours de son usage, relarguant alors une quantité importante d'antibiotiques, sub-inhibitrice. Cet effet peut également être initiateur de résistance bactérienne (109). L'ajout d'un deuxième antibiotique, comme la vancomycine, permettrait de diminuer le risque d'apparition de résistance. Cependant, il n'existe pas de preuves suffisantes pour affirmer que l'usage de ces dispositifs médicaux en est la cause, ni l'occurrence d'apparition de ces résistances (86,109,110).

Bien que les ciments orthopédiques au PMMA présentent de nombreuses indications, leur usage peut néanmoins entraîner des complications. L'ajout d'un ou plusieurs antibiotiques au ciment permet de diminuer le risque d'infection du matériel orthopédique ou permet un traitement complémentaire à l'antibiothérapie systémique. Leur utilisation n'est pas remise en cause mais reste controversée, particulièrement avec la possibilité d'apparition de résistances bactériennes. Sa nécessité est donc à étudier en fonction de l'état du patient, de l'infection présente, de la bactérie incriminée et de son profil de résistance, ...

Dans une seconde partie, l'intérêt de l'ajout d'un ou plusieurs antibiotiques dans ce type de ciment sera étudié selon leur action prophylactique sur le biofilm créé par *S. aureus*, au travers des expériences menées.

Partie expérimentale

1 Matériel et Méthodes

1.1 Objectif de l'étude

Le but des manipulations effectuées est i) de valider *in vitro* l'efficacité de ciments orthopédiques commercialisés contenant un ou plusieurs antibiotiques pour prévenir la formation de biofilm par des souches de *S. aureus* ; ii) d'évaluer *in vitro* l'efficacité de l'ajout d'un deuxième antibiotique comparé avec un ciment contenant un seul antibiotique (dans notre cas, la gentamicine). Au cours de ces expériences, un ciment contenant de la gentamicine est étudié, ainsi que son association avec de la clindamycine ou de la vancomycine. Afin de démontrer leur effet, des souches de *S. aureus* ayant des profils de résistance et sensibilité divergents aux antibiotiques considérés sont utilisées : méthicilline, gentamicine, vancomycine ou clindamycine.

1.2 Ciments orthopédiques utilisés pour cette étude

Les ciments employés pour réaliser les manipulations sont fabriqués et commercialisés par Heraeus Medical. Les antibiotiques sont ajoutés dans les ciments par l'industriel. Il s'agit de :

- PALACOS[®] R : il s'agit d'un ciment PMMA ne contenant pas d'antibiotique, qui sera utilisé comme contrôle lors des expérimentations. En effet, il s'agit de la condition pour laquelle la quantité de biofilm attendue est la plus élevée : sa formation ne sera pas altérée par la présence d'antibiotiques. L'action des autres ciments contenant des antibiotiques est ainsi comparée à celui-ci.
- PALACOS[®] R+G : ce ciment PMMA contient 0,5 g de gentamicine.
- COPAL[®] G+V : ce ciment est chargé avec une association d'antibiotiques, il contient 0,5 g de gentamicine et 2 g de vancomycine.
- COPAL[®] G+C : une combinaison de 1 g de gentamicine et de 1 g de clindamycine est incluse dans ce ciment.

1.3 Souches bactériennes utilisées

Pour réaliser ces expérimentations, des souches cliniques de *S. aureus* ont été sélectionnées à partir d'isolats conservés provenant d'infections sur patients : hémocultures, souches prélevées au niveau ostéoarticulaire, plaies ou prélèvements respiratoires. Le choix de ces souches a été effectué en fonction de leur profil de sensibilité et de résistance aux antibiotiques utilisés, leur antibiogramme ayant été réalisé au moment du diagnostic de l'infection. Leur capacité à produire du biofilm est testée en présence de chacun des quatre ciments. Ainsi, l'action des divers ciments sur le biofilm pourra être comparée et l'intérêt de l'association de molécules déterminé par rapport à un antibiotique seul et au simple ciment PMMA.

Les souches utilisées pour l'expérience sont :

- SASM
- SARM
- SASM résistant à la gentamicine
- SARM résistant à la gentamicine
- SASM résistant à la clindamycine
- SARM résistant à la clindamycine
- SASM résistant à la vancomycine
- SARM résistant à la vancomycine

Les souches sélectionnées ne doivent pas présenter de résistance aux autres antibiotiques cités, ainsi la souche résistante à la gentamicine est sensible à l'action de la clindamycine et de la vancomycine. Il en est de même pour les bactéries résistantes aux autres antibiotiques.

1.4 Étude de l'impact du milieu sur le biofilm

Afin d'élaborer le protocole pour tester l'impact des ciments sur le biofilm de divers staphylocoques dorés, des tests de mise au point sont nécessaires pour définir les meilleures conditions. Les souches sont cultivées dans un milieu riche : le milieu *Tryptic Soy Broth* (TSB). La capacité des souches à produire un biofilm dans ce milieu est testée pendant 24 et 48 heures puis dans du TSB et TSB supplémenté avec 1 % de glucose.

Le protocole ci-après de formation et quantification de biofilm est utilisé pour ces tests de mise au point. Le but de ces premières manipulations est de sélectionner les conditions et les souches pour lesquelles une quantité maximale de biofilm est produite.

Protocole général de formation et quantification de biofilm :

Jour J0 (début de la manipulation) : Ensemencement sur gélose des bactéries

Les bactéries sont ensemencées et cultivées sur des géloses au sang (géloses COS) pendant 18 à 24 h, il s'agit d'un milieu nutritif riche afin d'optimiser la croissance des colonies, même des plus exigeantes. La présence de sang frais de mouton permet également la lecture du caractère hémolytique des bactéries.

J1 (jour suivant) : Ensemencement de colonies en milieu liquide

Quelques colonies sont prélevées depuis la gélose et ensemencées dans du milieu liquide BHI (*Brain Heart Infusion*), pour une culture pendant la nuit (culture *overnight*) à 37 °C. Il s'agit d'un milieu couramment utilisé, efficace pour la croissance d'un grand nombre de micro-organismes. Ainsi, les bactéries peuvent se développer et se multiplier dans ce milieu.

J2 : Standardisation et mise en plaque des bactéries

Les bactéries sont réparties dans les puits d'une microplaque afin de permettre une formation de biofilm quantifiable par la suite :

- Les cultures dans le milieu BHI sont homogénéisées puis standardisées en mesurant leur densité optique à 600 nm, qui doit être égale à 1 +/- 0.05 (en diluant si nécessaire dans du milieu BHI stérile). Les milieux présentent alors tous une concentration similaire en bactéries.
- Celles-ci sont ensuite diluées au 1/100^e dans du milieu TSB ou TSB + glucose.
- 100 mL de cette suspension est ensuite introduit dans chaque puit dans une plaque 96 puits à fond non coatée.

La plaque est incubée pendant 24 h (ou 48 h) en chambre humide à 37 °C. Durant ce temps, les bactéries présentes se développent et forment un biofilm attaché au fond du puit.

J3 : Rinçage de la plaque et lecture

La plaque doit être rincée pour enlever les bactéries planctoniques, présentes dans les puits mais non adhérentes au biofilm. Le biofilm est ensuite coloré et un deuxième rinçage est nécessaire pour éliminer l'excès de colorant. Une méthode de rinçage à la vapeur est utilisée, celle-ci constituant une méthode plus douce pour rincer les puits que le rinçage par aspiration

du milieu à la pipette, qui dégrade souvent une partie du biofilm. Cette méthode est basée sur l'article de Tasse *et al.* (111)

La microplaque est retournée pour éliminer le milieu puis un premier lavage est effectué pour rincer le milieu et enlever les bactéries planctoniques. Pour cela, la microplaque est placée à l'envers au-dessus d'une source de vapeur d'eau durant 40 min (donc les puits sont tournés vers le bas, pour permettre de déverser le liquide contenu). Une source de froid de type pain de glace est placée sur la plaque pour permettre la condensation dans les puits et ainsi éviter de tuer les bactéries par la chaleur (voir schéma Figure 11). La vapeur d'eau montante va alors repasser à l'état liquide au contact des puits de la microplaque et retomber dans l'eau en ébullition. Ce phénomène permet d'ôter le milieu et les bactéries planctoniques restants dans les puits, en ne conservant que les bactéries sessiles.

Le biofilm est ensuite coloré afin de le quantifier. La coloration se fait grâce au crystal violet, avec un volume de 150 μL par puit. Celui-ci va pénétrer dans les bactéries présentes et colorer la biomasse. Un deuxième rinçage à la vapeur est nécessaire, pour éliminer le surplus de colorant, celui-ci étant réalisé grâce à la même méthode que le premier rinçage. La plaque va ensuite sécher à l'air libre. Une fois les puits secs, de l'acide acétique est utilisé pour détacher et dissoudre le biofilm coloré au crystal violet et permettre d'obtenir des solutions plus ou moins colorées en fonction de la biomasse présente. Ensuite, la densité optique (DO) de chaque puit de la microplaque sera mesurée au spectrophotomètre à 590 nm, il s'agit de la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance du crystal violet sera maximale, donc pour laquelle la visibilité sera la plus élevée. Plus la densité optique mesurée est élevée, plus la quantité de biofilm formée est importante.

En complément de la coloration au crystal violet, un système de dilution, ensemencement puis de comptage des bactéries après lavage peut être employé pour obtenir des résultats plus précis, et permettre de compter les bactéries vivantes. Celui-ci sera évoqué dans le paragraphe 1.5.2.

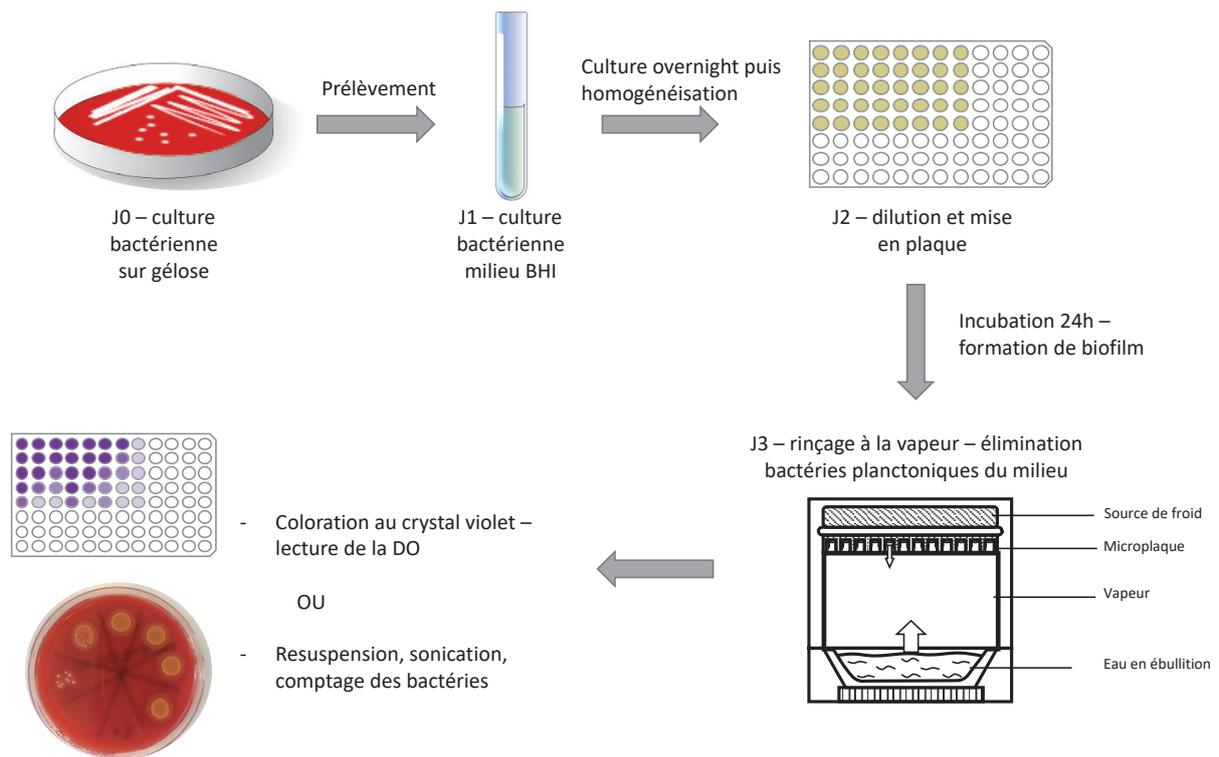


Figure 11 - Protocole de formation de biofilm bactérien et révélation de sa densité

1.5 Étude de l'impact des antibiotiques élués des ciments sur les souches bactériennes

1.5.1 Éluion des antibiotiques contenus dans les ciments

Les ciments utilisés ont une forme cylindrique, mesurant 2,5 cm de diamètre pour 1 cm de hauteur. Ceux-ci sont placés dans des tubes de diamètre légèrement supérieur, contenant un milieu TSB enrichi en glucose puis ces tubes sont incubés à 37°C pendant 24 h. Les milieux contenant les ciments sont ensuite changés toutes les 24 h avant d'être réincubés. Les solutions d'éluion de chaque ciment (contenant le milieu TSB + glucose ainsi que les composants élués du ciment) sont récupérées après 1, 3 et 9 jours. Ces solutions seront ensuite mises en présence des staphylocoques, dans le but d'observer l'impact des antibiotiques élués sur la formation de biofilm et l'évolution de leur action au fil des jours.

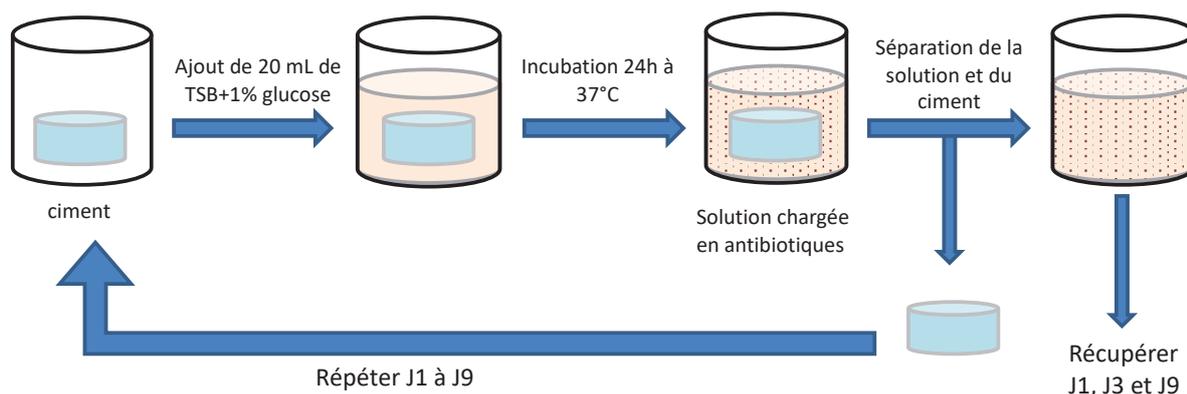


Figure 12 - Protocole d'éluion des antibiotiques contenus dans des ciments orthopédiques

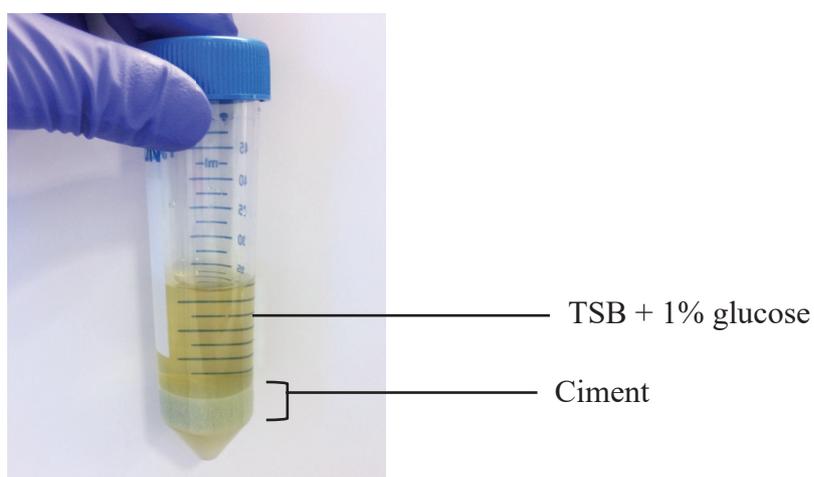


Figure 13 – Méthode d'incubation des ciments dans la solution TSB + glucose

1.5.2 Impact des antibiotiques contenus dans les solutions sur le biofilm de *S. aureus*

Le protocole précédent de formation de biofilm sera respecté, en remplaçant le milieu BHI pour dilution dans la microplaque par la solution d'éluion des antibiotiques contenus dans les ciments.

Jour J0 : Incubation des ciments et solutions

Le ciment est placé dans un tube contenant 20 mL de milieu TSB + 1 % de glucose (Figure 13), puis incubé à 37 °C pendant 24 h. Les bactéries sont placées dans un milieu liquide BHI pour permettre leur croissance.

Jour J1 : mise en plaque des souches bactériennes dans les solutions d'élution (on réalisera la même manipulation pour les solutions prélevées à J3 et J9)

Les souchesensemencées dans du milieu BHI sont directement mises en présence des différentes solutions d'élutions des ciments. Les nouvelles solutions obtenues sont ensuite placées dans les puits d'une microplaque pour incubation. Pour cela, le protocole précédent (paragraphe 1.4 – J2) est respecté, en remplaçant le BHI employé par la solution d'élution.

Jour J2 (idem pour J4 et J10) : **Rinçage de la plaque et ensemencement des bactéries sessiles sur gélose**

La plaque est rincée grâce à une méthode à la vapeur évoquée auparavant (paragraphe 1.4 – J3) pendant 40 min pour ne conserver que les bactéries accrochées à un éventuel biofilm (bactéries sessiles). La biomasse restante dans chacun des puits après le rinçage est ensuite resuspendue en ajoutant 200 µL de solution tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pour dissoudre les bactéries sessiles mais tout en les conservant vivantes. Le biofilm est détruit en aspirant et mélangeant à plusieurs reprises le contenu du puit grâce à une pipette et la solution contenue dans chaque puit est homogénéisée par sonication.

Une méthode de *spotting* est utilisée dans le but de quantifier la biomasse : chaque puit de la plaque de départ sera dilué 8 fois : allant du 1/10^e au 1/10^{8e}. 10 µL de chaque solution (ce volume représentant un spot) est ensemencé sur gélose COS et incubé à 37 °C pendant 24 h pour observer une pousse de bactéries (voir Figure 14). Les UFC sont comptées pour les dilutions permettant d'observer des colonies isolées quantifiables, puis multipliées selon la dilution pour obtenir la quantité contenue dans la solution mère. Les résultats seront exprimés en log UFC/mL.

Jour J3 (idem pour J5 et J11) : **Comptage des bactéries sur gélose**

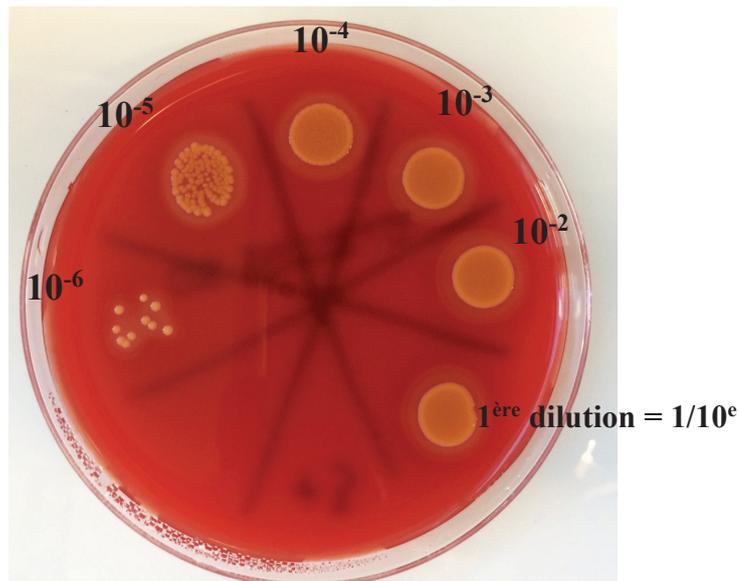


Figure 14 - Spots de bactéries *S. aureus* réalisés sur une gélose COS

Dans cet exemple, il est possible de compter le nombre de colonies à partir de la 6^e dilution : il y en a 10 soit $10/10^{-6} = 10^7$ UFC.

Le volume déposé était de 10 μ L, on obtient $10^7/10^{-2} = 10^9$ UFC/mL soit 9 log UFC/mL.

A partir du comptage des bactéries, des comparaisons peuvent être établies pour une même souche dans les différents milieux. On peut donc observer les impacts des antibiotiques contenus dans les ciments orthopédiques, qui sont dispersés ensuite dans les solutions d'éluion, sur les souches sélectionnées.

La méthode de *spotting* utilisée donne des résultats bien plus précis que les méthodes de colorations et de mesure de la densité optique mais impose un minimum de colonies visibles. En effet, 10 μ L de solutions sont déposés sur gélose COS puis le comptage est effectué en UFC/mL de solution d'éluion. Le minimum de bactéries comptable est donc 1 UFC pour 10 μ L soit 100 UFC/mL. Les valeurs inférieures à 100 UFC sont donc négligeables, le minimum pris en compte est donc 10^2 UFC/mL et non 0. Cette précision semble suffisante mais pourrait être augmentée en réalisant une dilution supplémentaire sur la solution d'éluion de départ.

Les résultats sont rassemblés selon les souches bactériennes utilisées, et des comparaisons entre les ciments sont réalisées pour chaque jour testé.

1.6 Représentation graphique et statistiques

1.6.1 Tests statistiques

La concentration en UFC de *S. aureus* dans les solutions d'élution des ciments contenant un ou plusieurs antibiotiques est comparée à la solution d'élution du ciment ne contenant pas d'antibiotiques. Ainsi, le résultat obtenu avec ce dernier est considéré comme la valeur de référence pour ces manipulations. Sa valeur est alors fixée à 0, et les résultats obtenus pour les autres ciments seront rapportés en variation de la concentration en bactéries par rapport à celle-ci. Ils sont exprimés en variation de log. Ceci permet d'estimer l'inhibition de la formation de biofilm entraînée par l'ajout d'un (gentamicine) ou de plusieurs antibiotiques au ciment (association de gentamicine et de clindamycine ou vancomycine) par rapport au ciment orthopédique seul.

Les tests statistiques utilisés sont des tests non paramétriques de Kruskal Wallis. En effet, le test de Shapiro-Wilk réalisé sur les différents échantillons indiquent que leur distribution ne suit pas pour tous une loi normale, de plus il s'agit d'échantillons de petite taille. Les conditions d'application des tests paramétriques ne sont pas réunies. Le seuil de significativité est fixé à 5 %, soit $\alpha=0,05$.

Ces tests permettent de comparer le nombre moyen de bactéries dans le biofilm formé dans les diverses solutions d'élution une à une. Ils sont répétés pour tous les jours testés (J1, J3 et J9) et pour toutes les souches.

L'hypothèse nulle H_0 est l'absence de différence entre les distributions des échantillons, donc l'homogénéité entre toutes les distributions de concentration bactérienne obtenues. L'hypothèse alternative H_1 est que la différence entre les distributions est différente de 0, en ce cas au moins une des solutions contient un nombre différent de colonies dans son biofilm.

Lorsque l'hypothèse nulle est rejetée, un deuxième test post-hoc est ensuite réalisé afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par paires. Ainsi, les solutions chargées en antibiotiques sont comparées à la fois à la solution contenant le ciment de référence, ainsi qu'aux autres solutions. Le test post-hoc utilisé est le test de Dunn, avec une correction de Bonferroni. Le seuil de significativité corrigé est alors de 0,0083.

1.6.2 Représentation graphique

Les résultats obtenus pour les trois jours (J1, J3 et J9) sont représentés sur les graphiques, pour les quatre ciments testés. Des représentations de type boîtes à moustaches (*box plot*) sont utilisées : les bords du bas et du haut du rectangle symbolisent respectivement le premier et le troisième quartile de la distribution des valeurs. La ligne horizontale présente dans le rectangle représente la médiane et la croix indique la moyenne. Les extrémités des moustaches sont calculées avec 1,5 fois la distance interquartile.

- « Ciment Ø ATB » représente la solution ayant contenu le ciment PALACOS® R
- « Genta » représente la solution ayant contenu le ciment PALACOS® R+G
- « Genta + Vanco » représente la solution ayant contenu le ciment COPAL® G+V
- « Genta + Clinda » représente la solution ayant contenu le ciment COPAL® G+C

Dénomination	Nom commercial	Quantités d'antibiotiques contenues		
		Gentamicine	Vancomycine	Clindamycine
Ciment Ø ATB	PALACOS® R	Ø	Ø	Ø
Genta	PALACOS® R+G	0,5 g	Ø	Ø
Genta+Vanco	COPAL® G+V	0,5 g	2 g	Ø
Genta+Clinda	COPAL® G+C	1 g	Ø	1 g

Tableau 1 - Synthèse des ciments utilisés

* représente une différence significative en comparaison avec la solution contenant le ciment PMMA sans antibiotiques (la p-value est inférieure au seuil corrigé : $\alpha=0,0083$)

* représente une différence significative en comparaison avec la solution contenant le ciment PMMA chargé en gentamicine (la p-value est inférieure au seuil corrigé : $\alpha=0,0083$)

2 Résultats

2.1 Étude de l'impact du milieu sur le biofilm

La plupart des souches sélectionnées sont capables de former une quantité de biofilm satisfaisante après une culture pendant 24 h à 37 °C dans une microplaque 96 puits. En outre, placer les souches à l'étuve durant 48 h n'apporte pas de bénéfices. Le milieu nutritif TSB employé ici, largement utilisé en microbiologie, est composé notamment de produits de digestion enzymatiques fournissant des aminoacides et de glucose. Il permet une croissance importante pour des bactéries comme *S. aureus*. Le temps d'incubation choisi est de 24 h, afin d'obtenir une croissance bactérienne suffisante dans un délai plus avantageux.

Des manipulations ont ensuite été menées et répétées trois fois en suivant le protocole expliqué au paragraphe 1.4 précédent pour déterminer le milieu dans lequel la production de biofilm est la plus importante : milieu TSB ou milieu TSB + 1 % de glucose. Plusieurs souches cliniques ont été testées, dans le but également de pouvoir sélectionner celles produisant une plus grande quantité de biofilm et de les utiliser par la suite.

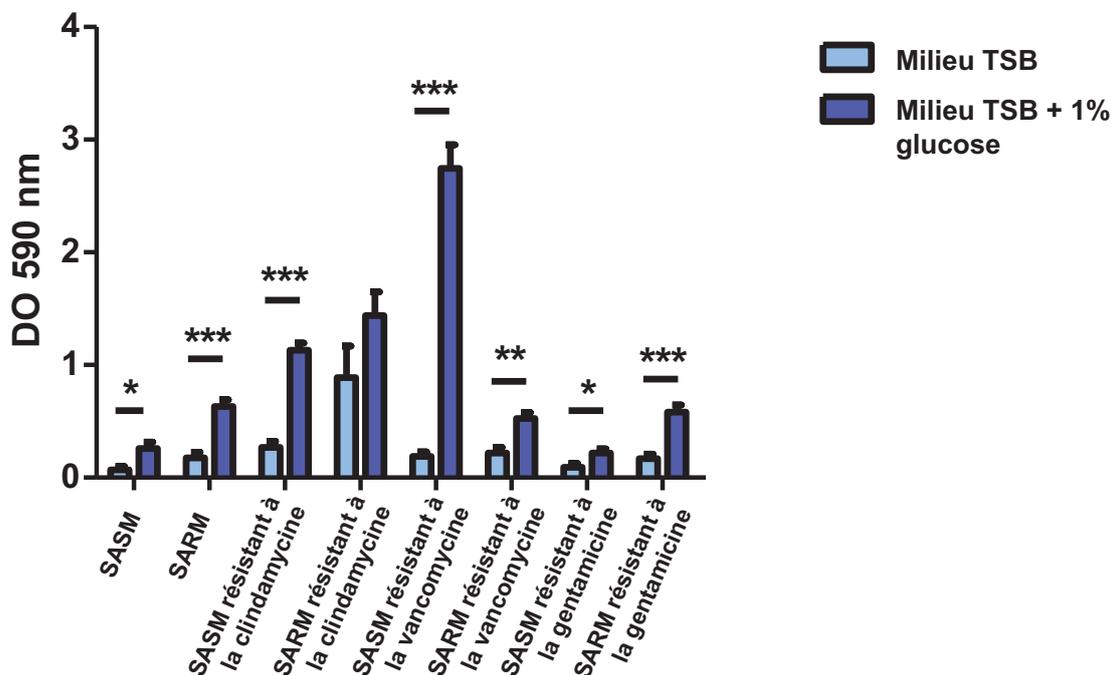


Figure 15- Formation de biofilm durant 24 heures par diverses souches *S. aureus* dans 2 milieux : TSB et TSB+1 % glucose.

*, **, *** indiquent une différence significative : p -value <0,05, <0,01 et <0,001 respectivement

Sur les résultats présentés en Figure 15, plus la densité optique (DO) est élevée, plus il y a de bactéries sessiles restantes donc qui étaient contenues dans le biofilm. Celle-ci est mesurée au spectrophotomètre à 590 nm. Pour la majorité des souches, la quantité de biofilm produite en milieu TSB ou en TSB + 1 % glucose est significativement différente sauf pour le SARM résistant à la clindamycine. La DO est plus élevée pour les conditions dans lesquelles du glucose est rajouté au milieu, ce phénomène est observé pour toutes les souches utilisées. Il est donc judicieux de choisir de réaliser les manipulations avec un milieu TSB + 1 % de glucose afin d'obtenir une meilleure croissance bactérienne et une quantité de biofilm plus importante.

Certaines souches ont ensuite été sélectionnées pour réaliser les manipulations, selon leur profil de résistance ainsi que la quantité de biofilm produite. Il est nécessaire de choisir une souche résistante à chaque antibiotique utilisé pour cette étude et sensible aux autres. Lorsque plusieurs souches résistantes au même antibiotique ont été testées, celle produisant la quantité de biofilm la plus importante (donc pour laquelle la DO mesurée était la plus élevée) a été sélectionnée. Les souches de *S. aureus* retenues sont alors :

- SASM : SH1000, une souche de référence, communément utilisée
- SARM
- SARM résistant à la gentamicine
- SASM résistant à la vancomycine
- SARM résistant à la clindamycine, qui présente une sensibilité diminuée à la gentamicine durant les expériences réalisées, non renseignée sur son antibiogramme
- SASM résistant à la clindamycine, qui présente pour sa part une meilleure sensibilité à la gentamicine contenue dans les ciments

	Méthicilline	Gentamicine	Vancomycine	Clindamycine
SASM	S	S	S	S
SARM	R	S	S	S
SARM résistant à la gentamicine	R	R	S	S
SASM résistant à la vancomycine	S	S	R	S
SARM résistant à la clindamycine	R	« S »	S	R
SASM résistant à la clindamycine	S	S	S	R

Tableau 2 - Antibiogramme des souches réalisé lors des prélèvements.

S représente la sensibilité et *R* la résistance à l'antibiotique

« S » indique une sensibilité renseignée sur l'antibiogramme mais non retrouvée au cours des manipulations, possiblement une sensibilité intermédiaire

2.2 Formation de biofilm par les différentes souches

Chacun des quatre ciments a donc été utilisé pendant 10 jours, de J0 à J9, les solutions d'élutions sont conservées et étudiées aux jours J1, J3 et J9. L'impact des antibiotiques élués dans cette solution sur la formation de biofilm a été testé pour six souches de *S. aureus* possédant différents profils de résistance. Ces manipulations ont été réalisées en triplicata et conduites trois fois indépendamment, permettant d'obtenir neuf mesures pour chaque condition (selon chaque souche, ciment et jour d'élution).

Pour toutes les souches et tous les jours testés, les résultats des tests de Kruskal-Wallis permettent tous de rejeter l'hypothèse nulle H_0 ($p < 0,05$), au moins une distribution du nombre de colonies obtenues dans les solutions testées est alors différente des autres. Des tests post-hoc sont donc effectués.

Les résultats sont présentés dans les graphes ci-dessous. Ils sont exposés selon les souches de *Staphylococcus aureus*, afin de pouvoir mieux comparer l'effet des différents ciments entre eux, et donc l'impact des antibiotiques élués sur le biofilm créé par chaque souche.

2.3 Résultats obtenus pour la souche SASM (SH1000)

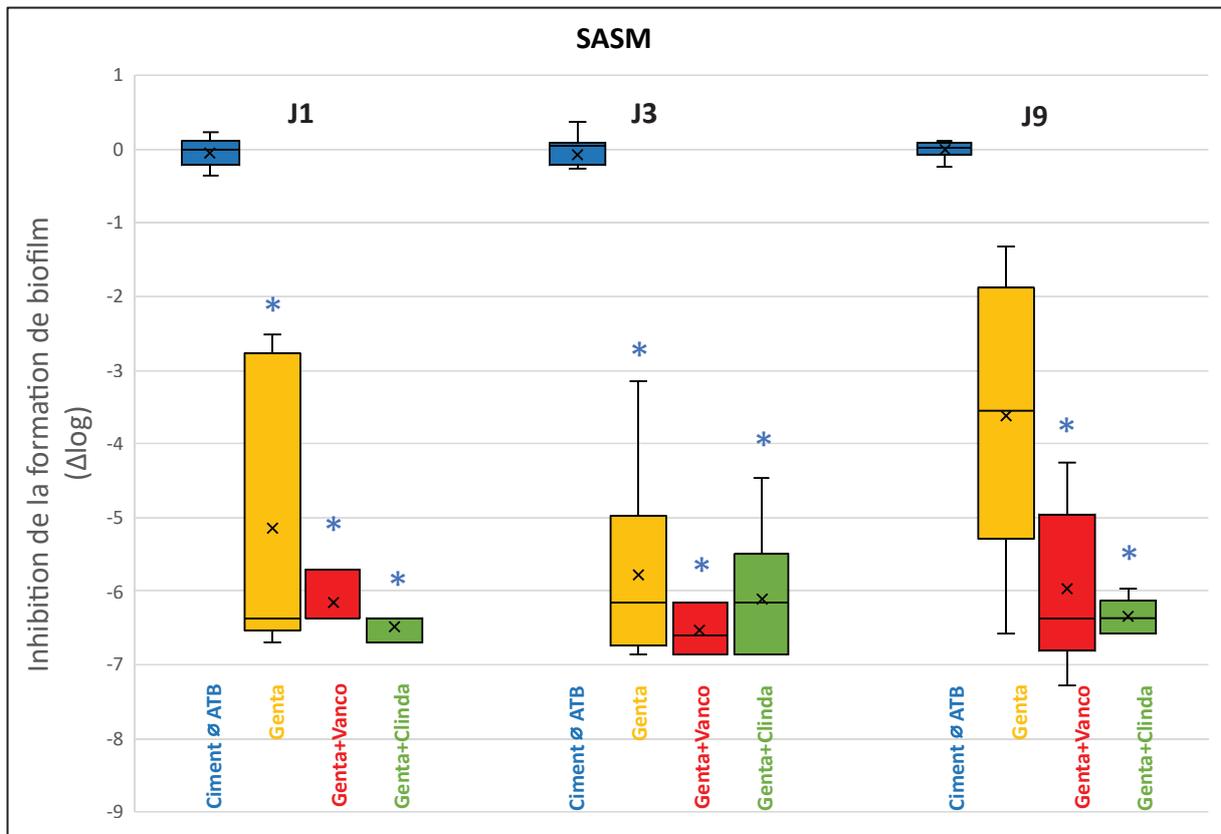


Figure 16 - Variation de la formation de biofilm par une souche SASM avec des ciments supplémentés ou non en antibiotiques

Pour la souche SASM, l'ajout d'antibiotiques au ciment entraîne une réduction du nombre de colonies contenues dans le biofilm formé par cette souche (voir Figure 16). En effet, une diminution significative du nombre de colonies est observée avec le ciment contenant un antibiotique par rapport au ciment de référence pour les jours J1 et J3. Une inhibition médiane sur ces deux jours d'au moins 6 log est constatée en ajoutant de la gentamicine. Cette valeur est plus restreinte pour le jour 9, une diminution de la concentration en colonies restantes à la fin de l'expérience est observée en ajoutant un antibiotique (avec une valeur médiane de -3,6 log). Cependant, cette différence avec un ciment PMMA seul n'est pas statistiquement significative.

Deux ciments contenant une association d'antibiotiques ont également été testés. Ainsi, de la clindamycine ou vancomycine sont ajoutées à la gentamicine, dans ces situations la valeur médiane est comprise entre -6,5 et -6 log pour les trois jours testés. La différence avec le ciment PMMA est alors significative. Les résultats obtenus sont proches de la limite de détection (qui est de 10^2 UFC/mL), peu de biofilm se forme en présence de ces combinaisons de traitement.

Ces ciments Genta + Clinda et Genta + Vanco présentent une diminution significative du biofilm également à J9, contrairement au ciment à la gentamicine, toutefois les différences entre les ciments chargés en antibiotiques ne sont significatives pour aucun des trois jours testés.

2.4 Résultats obtenus pour la souche SARM

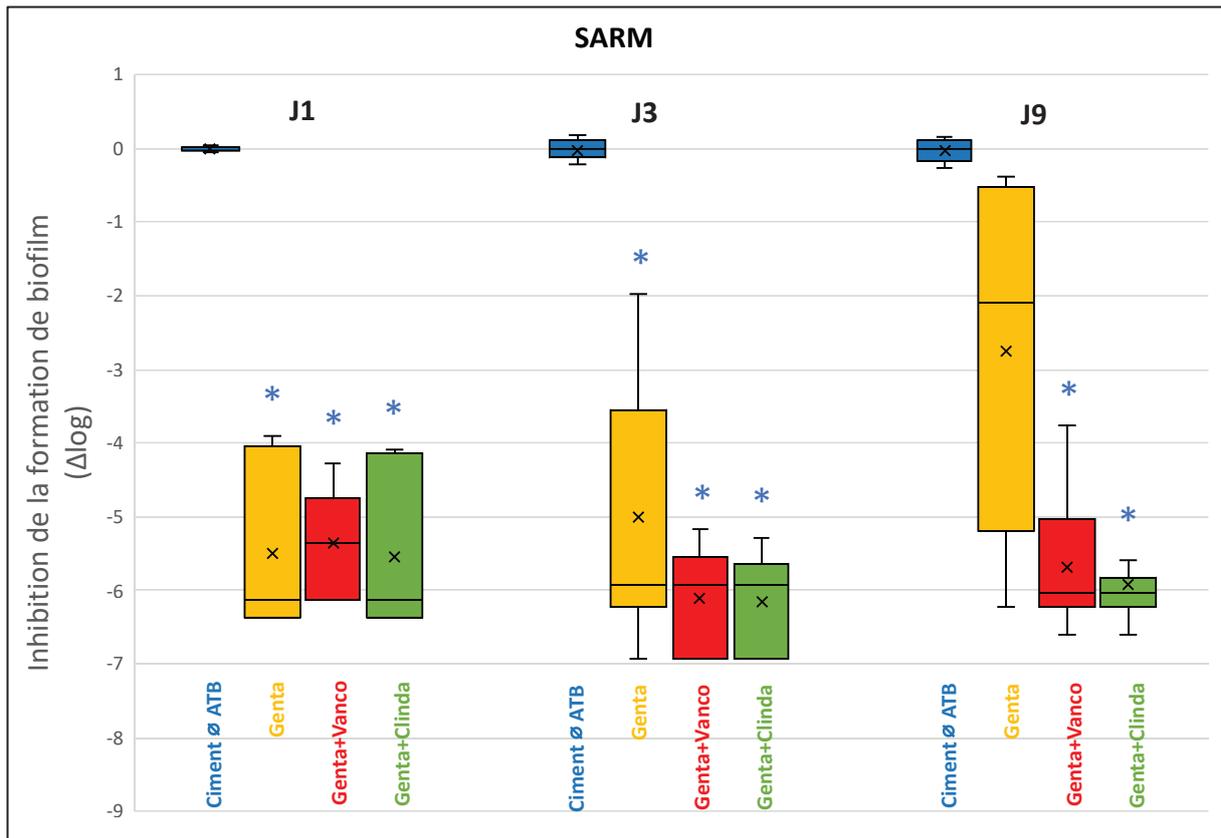


Figure 17 – Variation de la formation de biofilm par une souche clinique SARM avec des ciments supplémentés ou non en antibiotiques

Une diminution de la formation de biofilm par la souche SARM est observable en présence de toutes les solutions chargées en antibiotiques (Figure 17). La valeur médiane est une réduction d’au moins 5 log pour toutes les solutions à J1 et J3 dès l’ajout d’au moins un antibiotique par rapport au ciment PMMA seul. Le ciment Genta permet à J1 et J3 une inhibition significative du nombre de colonies bactériennes contenues dans le biofilm par rapport au ciment sans antibiotique (médiane d’environ -6 log). Néanmoins, à J9, une diminution médiane de 2 log est observable pour ce ciment, mais celle-ci n’est pas significative.

En ajoutant un deuxième antibiotique à la gentamicine, la différence de concentration en bactéries dans le biofilm est significative en comparaison à la solution sans traitement, même pour J9. La valeur médiane est comprise entre -6,1 et -5,3 log selon les associations et les jours d'éluion, elle reste stable sur la durée de l'expérience. La différence entre les solutions chargées avec un ou deux traitements n'est significative pour aucun des jours testés, toutefois la prévention du biofilm à J9 n'est possible qu'en utilisant un ciment chargé avec une association d'antibiotiques.

2.5 Résultats obtenus pour la souche SARM résistante à la gentamicine

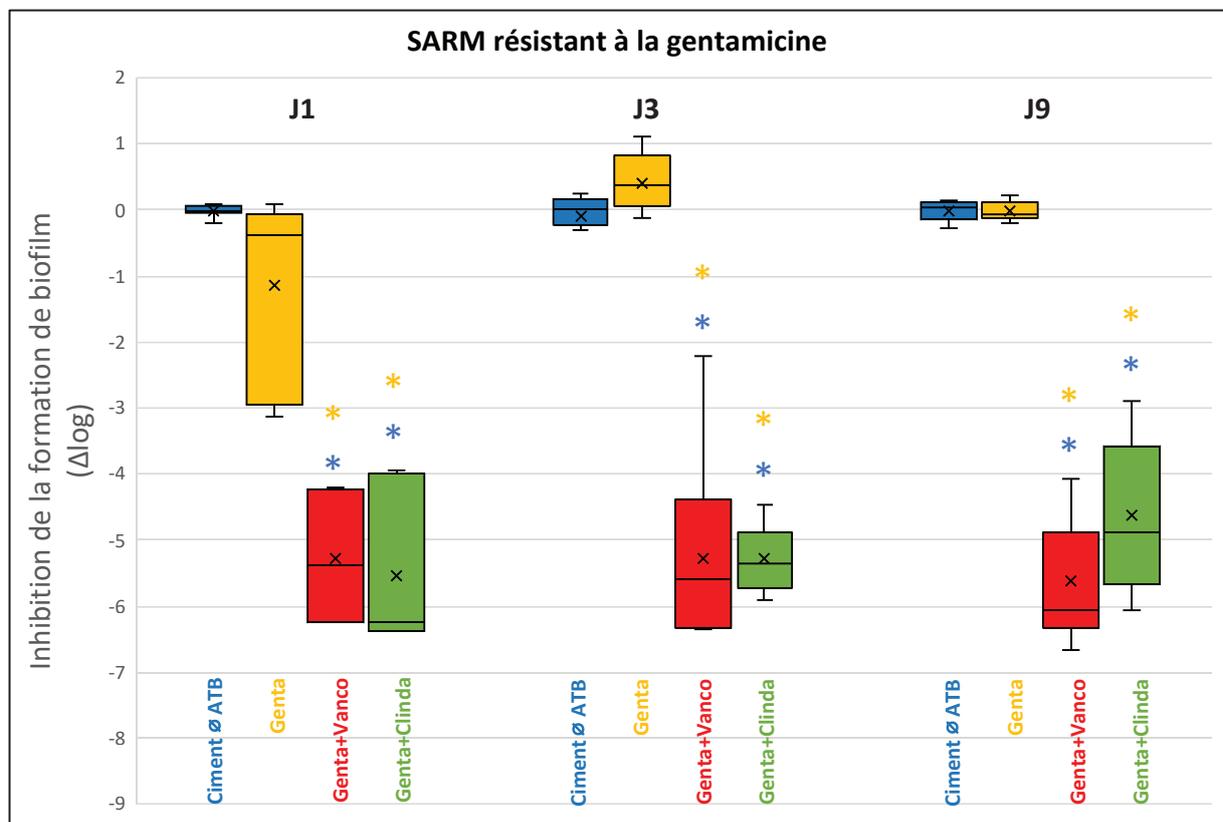


Figure 18 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche clinique SARM résistante à la gentamicine

Pour cette souche SARM résistante à la gentamicine, dans la condition où la solution d'éluion contient seulement de la gentamicine, celle-ci n'induit pas de différence significative avec le ciment PMMA seul (voir Figure 18). En effet, les concentrations bactériennes sont comparables pour ces deux solutions sur la durée de l'expérience (à J1, J3, J9). Cependant, au

bout de 24 heures (à J1), une faible diminution du nombre de colonies constituant le biofilm est observable en ajoutant de la gentamicine au PMMA, mais la différence entre les deux ciments n'est pas significative. A J3, une légère augmentation de la concentration en *S. aureus* est observée en présence du ciment Genta, il s'agit sûrement d'un biais lié au seuil de sensibilité des manipulations. La concentration bactérienne obtenue avec la solution ne contenant pas d'antibiotiques doit effectivement être maximale, puisque la constitution de biofilm n'est pas affectée. Cette différence n'est cependant pas significative.

Cependant, l'addition d'un second antibiotique entraîne une diminution significative importante du nombre de bactéries restantes à la fin de l'expérience en comparaison avec le ciment sans antibiotique.

En effet, la combinaison avec de la vancomycine inhibe la formation de biofilm à J1, J3 et J9. Cette inhibition n'est pas totale, mais reste stable sur la durée de l'expérience : les médianes sont comprises entre -6 et -5,4 log. En outre, les différences sont significatives en comparaison avec le ciment seul, mais également avec le ciment Genta. Cette observation est valable pour tous les jours testés.

En ajoutant de la clindamycine à la gentamicine, une réduction de la concentration bactérienne dans le biofilm est aussi observable. Les valeurs médianes de concentration sont comprises entre -6,2 et -5 log, bien que cet effet inhibiteur semble s'amoinrir au cours du temps. Une différence statistique significative à 5 % est identifiable pour J1, J3 et J9, à la fois avec le ciment de référence, mais également par rapport à celui contenant seulement un antibiotique. Il n'y a cependant pas de différence significative entre l'ajout de vancomycine ou de clindamycine au ciment à la gentamicine. Les valeurs obtenues restent stables sur les 9 jours.

2.6 Résultats obtenus pour la souche SASM résistante à la vancomycine

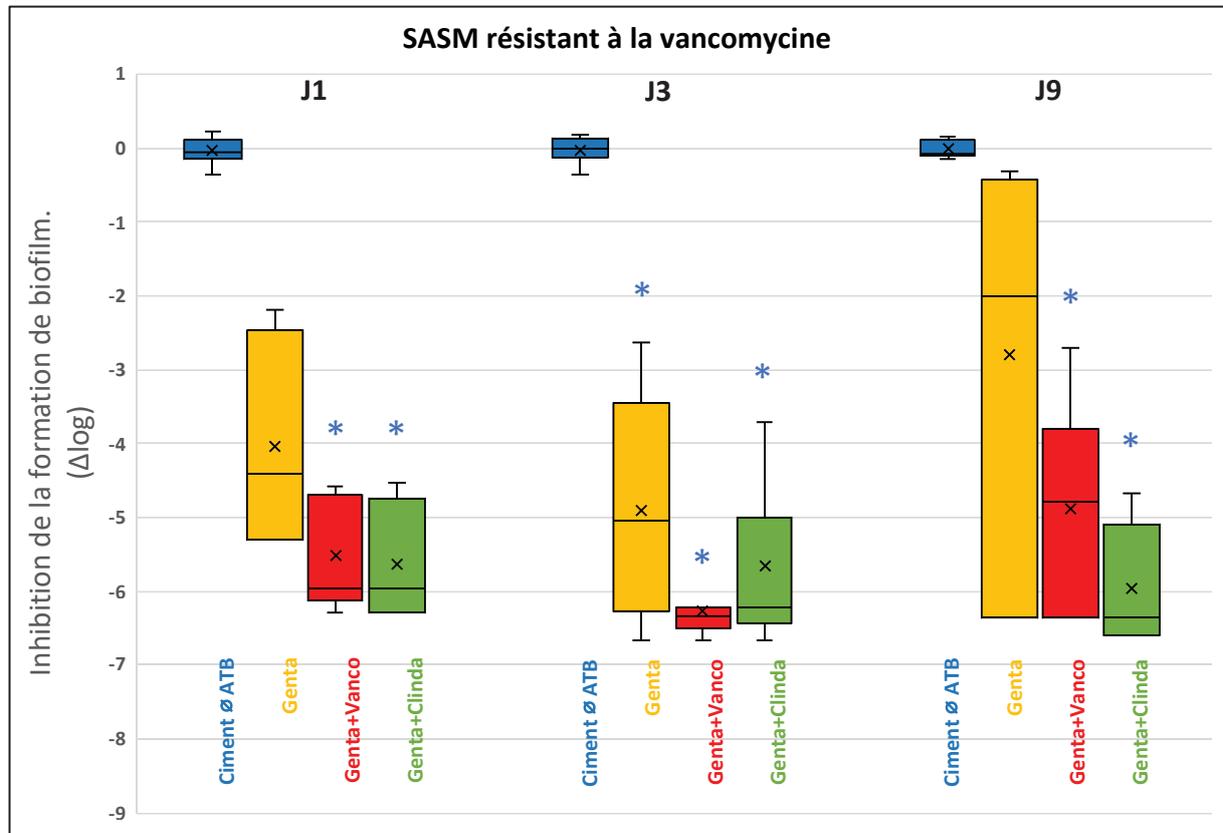


Figure 19 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche SASM résistante à la vancomycine

Une perte de la quantité de bactéries constituant le biofilm de cette souche SASM résistante à la vancomycine est remarquable lorsque la gentamicine est ajoutée au ciment PMMA, mais cette différence n'est significative qu'à J3 (Figure 19). A J1, cette réduction est observable (la médiane étant une diminution d'environ 4,5 log), mais celle-ci n'est pas statistiquement significative. Au neuvième jour, l'inhibition est plus faible, la variation médiane étant de -2 log en comparaison avec le ciment PMMA sans antibiotiques. Toutefois pour ce ciment, les écarts-types sont importants, notamment à J9 avec un écart type de 2,8, ce qui montre une dispersion conséquente des résultats obtenus, donc une hétérogénéité des résultats entre les manipulations.

L'ajout de vancomycine et de gentamicine au ciment PMMA entraîne à J1, J3 et J9 une diminution statistique significative à 5 % de la concentration de bactéries dans la solution. La variation médiane est d'environ -6 log à J1 et J3, mais l'effet d'inhibition est moins marqué à J9, la perte médiane de bactérie est de 4,8 log. Contrairement au ciment contenant un seul

antibiotique, l'ajout de vancomycine entraîne un effet prophylactique sur tous les jours testés, la différence entre les deux ciments n'est toutefois pas significative.

Une addition de clindamycine à la gentamicine permet à J1, J3 et J9 une diminution significative de la concentration bactérienne en comparaison au ciment PMMA. En effet, la variation médiane obtenue avec cette combinaison de traitement est stable sur les 9 jours et comprise entre -6,3 et -6 log. La différence par rapport au ciment chargé avec un seul traitement est notable, particulièrement à J9, mais n'est cependant pas statistiquement significative.

Les combinaisons de deux antibiotiques permettent d'obtenir des actions prophylactiques sur la formation de biofilm similaires sur tous les jours de l'expérience.

2.7 Résultats obtenus pour la souche SARM résistante à la clindamycine

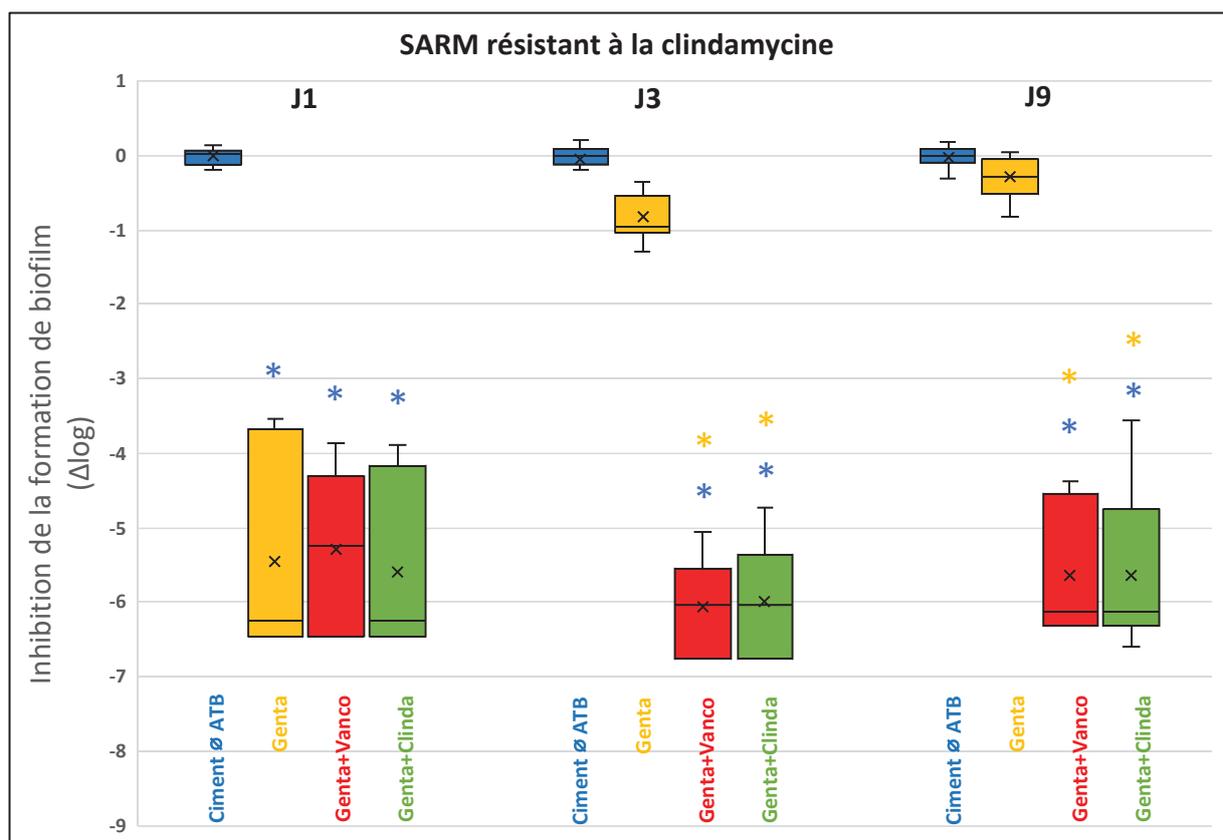


Figure 20- Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche SARM résistante à la clindamycine

Cette souche est un SARM résistant à la clindamycine. L'ajout de gentamicine au ciment permet à J1 une différence statistique significative par rapport au ciment sans antibiotique dans le sens d'une perte de bactéries dans le biofilm (voir Figure 20). Concernant les jours suivants (J3 et J9), l'ajout de gentamicine au ciment PMMA n'entraîne pas de diminution significative du nombre de colonies contenues dans le biofilm. Cette réduction est effectivement très faible, comprise entre -1 et 0 log. Cette souche présente donc une sensibilité diminuée à la gentamicine.

En ajoutant deux antibiotiques au ciment PMMA seul, on observe à J1 une différence statistique significative du nombre de bactéries contenues dans le biofilm. Les valeurs obtenues sont similaires à celles acquises avec le ciment chargé en gentamicine seule. A J3 et J9, une diminution significative d'UFC contenues dans le biofilm est remarquable pour ces deux ciments Genta + Clinda et Genta + Vanco, en comparaison aux ciments sans et avec un seul antibiotique. En effet, ces combinaisons distinctes de deux traitements permettent une diminution médiane comprise entre 5 et 6 log, qui reste constante sur les neuf jours étudiés. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux ciments.

2.8 Résultats obtenus pour la souche SASM résistante à la clindamycine

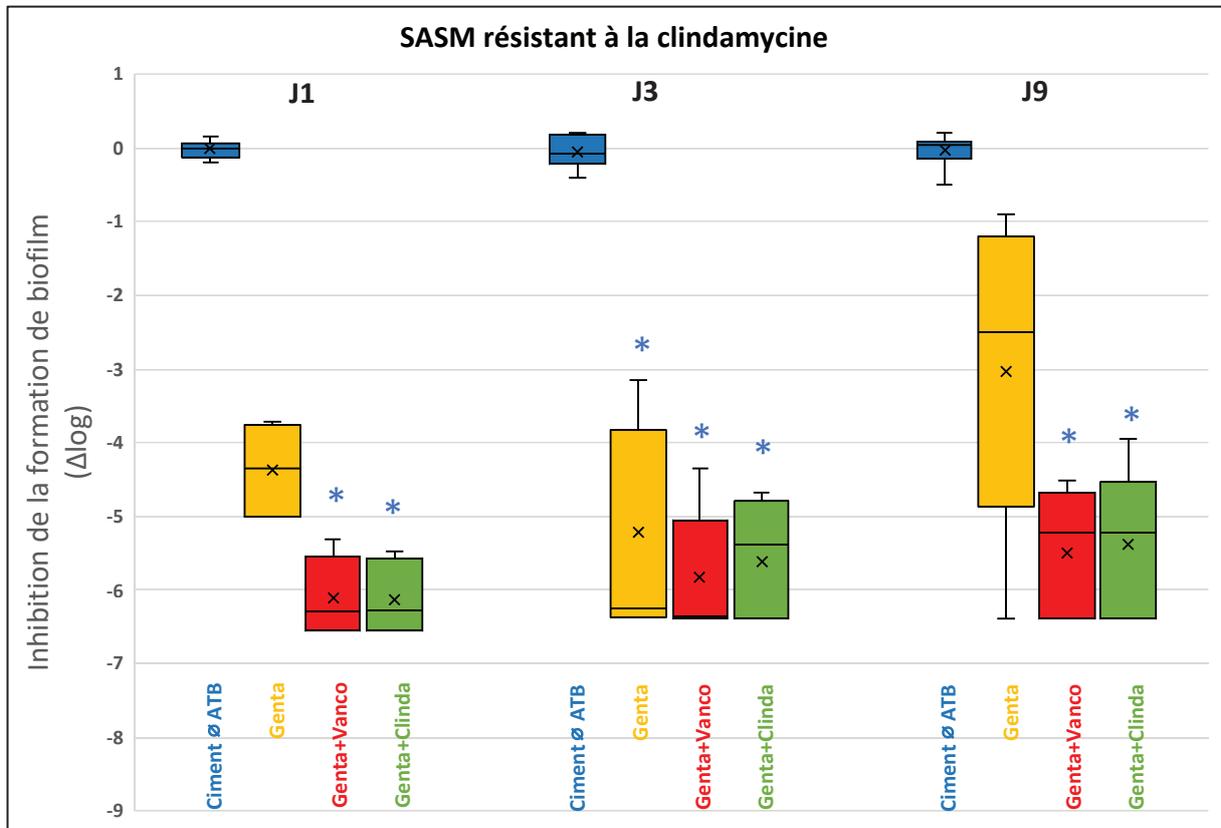


Figure 21 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur une souche SASM résistante à la clindamycine

Le ciment chargé en gentamicine entraîne une perte du nombre de colonies contenues dans le biofilm de cette souche SASM résistante à la clindamycine (voir Figure 21). Néanmoins, cette diminution est statistiquement significative seulement à J3. En effet, à J1, on observe une tendance à l'inhibition, la formation de biofilm est affectée mais non significative, la variation de concentration médiane se situant autour de -4,5 log. A J3, la médiane est une réduction d'au moins 6 log avec ce ciment. Pour J9, l'effet d'inhibition est atténué, la variation médiane est de seulement -2,5 log, cette différence constatée n'est donc pas significative.

L'ajout d'un deuxième antibiotique induit une réduction plus importante de la concentration de *S. aureus* dans la solution finale. Ainsi, à J1, un ajout de vancomycine ou de clindamycine amène une atténuation comparable du biofilm (il n'y a pas de différence significative à 5 % entre les deux résultats). Cette diminution est significative, contrairement à la gentamicine seule, la valeur médiane étant de plus de -6 log pour ces deux ciments. A J3, l'inhibition en

comparaison au ciment PMMA seul est également significative, mais elle n'est pas plus importante que le ciment avec gentamicine. Une diminution médiane comprise entre 5,2 et 6,4 log est observée avec ces ciments sur les jours testés par rapport au ciment PMMA. Au neuvième jour, une diminution statistiquement significative est logiquement remarquable avec ces deux associations de traitement par rapport au ciment PMMA sans antibiotique, toutefois pas par rapport au ciment contenant un seul antibiotique. Sur les jours observés, les concentrations bactériennes obtenues dans les solutions d'éluion sont en réalité très proches entre le ciment contenant de la vancomycine et celui contenant de la clindamycine. L'effet induit est alors considéré comme similaire et aucune différence significative n'est constatée.

Cependant, il n'y a que 6 résultats obtenus à J1, alors qu'il y en a 9 pour tous les autres jours. En effet, la souche SARM résistante à la clindamycine s'est avérée peu sensible à la gentamicine contenue dans le ciment, cette souche a été rajoutée en cours d'expérience pour observer les différences possibles de comportement.

2.9 Résultats sur l'ensemble des souches regroupées

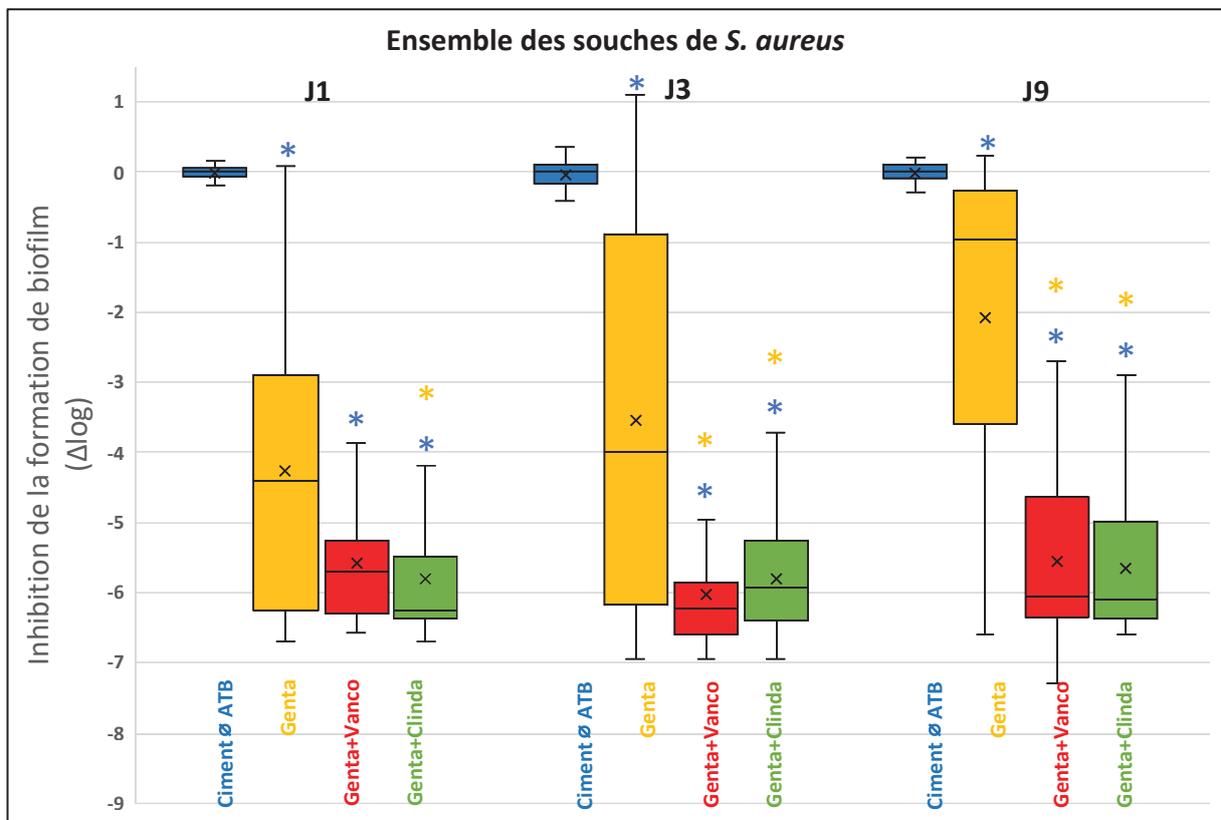


Figure 22 – Variation de formation de biofilm pour des ciments supplémentés ou non en antibiotiques sur l'ensemble des souches étudiées

Sur ce graphe sont regroupés les résultats pour toutes les souches de *S. aureus* étudiées ici. L'ajout de gentamicine au ciment PMMA permet, pour l'ensemble regroupé des souches, une diminution significative de la concentration en bactéries dans le biofilm, sur l'ensemble des jours testés. L'écart-type observé pour ce ciment est très important pour J1, J3 et J9 ; il est respectivement de 2, 2,7 et 2,3 alors qu'il est compris entre 0,1 et 1 pour toutes les autres conditions. Ces résultats dispersés démontrent des sensibilités très diverses à la gentamicine pour les souches sélectionnées.

L'ajout d'un deuxième antibiotique permet une inhibition de la formation de biofilm, la différence en comparaison avec le ciment sans antibiotique est significative. Cette observation est valable en ajoutant de la vancomycine ou de la clindamycine à la gentamicine pour tous les jours testés. Toutefois, il n'existe pas de différence entre les deux ciments comprenant des associations d'antibiotiques, ceux-ci permettent une diminution comparable du nombre de colonies dans le biofilm. Cette valeur médiane est comprise entre -5,7 et -6,2 log. La différence avec le ciment Genta est également significative, dans le sens d'une réduction du nombre de colonies contenues dans le biofilm, sauf pour J1 avec le ciment Genta + Vanco.

3 Discussion

Dans un contexte d'IPA, il est parfois nécessaire d'accompagner le traitement chirurgical avec la mise en place de ciment orthopédique au sein de l'articulation. Il est utilisé en première intention pour fixer le matériel prothétique, ou comme espaceur lors d'une chirurgie en deux temps pour supporter l'articulation. L'ajout d'un antibiotique parmi ses composants est courant, mais il est aussi possible d'en ajouter plusieurs, pour élargir le spectre d'activité et ainsi obtenir une meilleure efficacité antibactérienne. Pour la fixation de prothèse, les antibiotiques, bien que présents en faible dose dans le PMMA, diffusent localement et en quantité importante, ce qui permet de prévenir la formation de biofilm. En effet, il s'agit d'un mécanisme majeur intervenant dans le développement d'infections ostéoarticulaires et sur matériel, et qui complique l'éradication de cette dernière en protégeant les bactéries.

Les antibiotiques présents dans les ciments utilisés lors de cette étude, qui sont donc dispersés ensuite dans les solutions d'élution, possèdent des effets bactéricides ou bactériostatiques. Ils vont alors agir sur les souches bactériennes déposées dans les puits de la microplaque et inhiber leur croissance et leur multiplication ou les tuer. Les bactéries seront donc mortes, ou tout au moins présentes en plus faibles quantités. Il sera donc plus compliqué de s'agréger entre elles dans le but de créer un biofilm. Les antibiotiques ajoutés permettent ainsi d'obtenir un effet prophylactique anti-biofilm. Ils doivent présenter un spectre d'action large, et contenir les micro-organismes fortement impliqués dans les IPA. Ces expériences ont été menées sur diverses souches de *Staphylococcus aureus*, impliqué dans 12 à 23 % des IPA (12). De plus, cette bactérie possède un génome très variable, elle acquiert facilement des résistances ; des souches staphylococciques présentant des profils de résistance différents aux antibiotiques sont donc employés au cours de cette expérimentation.

Toutefois, le milieu utilisé (PBS + 1 % glucose) est très riche et donc peu représentatif d'un modèle *in vivo*. De plus, ce modèle *in vitro* est stagnant, et ne subit pas d'attaques extérieures comme l'action du système immunitaire. Avant l'ajout d'antibiotiques, la croissance des bactéries dans le milieu est recherchée et donc facilitée. Celui-ci permet alors une culture des bactéries plus rapide qu'un milieu plus proche du milieu biologique, et facilite les manipulations. La formation de biofilm est favorisée donc plus importante dans ce modèle que dans le milieu biologique. Ainsi, il est difficile au cours de ces expériences d'obtenir une inhibition totale de la formation de biofilm, celle-ci reste donc partielle. Néanmoins, le biofilm étudié est celui qui est attaché au fond du puit de la microplaque, un biofilm formé dans la

solution mais non adhérent est éliminé lors du rinçage et ne sera pas pris en compte. Il serait aussi intéressant d'observer la formation de biofilm sur un matériau comparable à une prothèse : métal, acier, céramique, ...

Le protocole implique toutefois la dépose du ciment dans des tubes pour incubation. Les diamètres du ciment et du tube étant similaires (voir Figure 13), peu de milieu est présent et peut circuler sur les côtés. Les molécules anti-infectieuses peuvent seulement diffuser dans le milieu en haut et en bas, sur les bases du cylindre. Ce mécanisme peut alors limiter la diffusion des antibiotiques dans la solution d'élution, à la fois par l'exiguïté mais également par l'absence de milieu fluide mouvant. Le renouvellement du milieu chaque jour tente toutefois de mimer ce déplacement, ainsi que l'élimination de l'antibiotique. Il s'agit d'une étude *in vitro* intéressante pour déterminer les atouts de l'ajout d'antibiotiques dans les ciments osseux, toutefois les résultats sont seulement indicatifs, et non représentatifs pour un modèle *in vivo*.

L'impact de ces solutions d'élution est étudié au bout de 1, 3 et 9 jours pour observer leur évolution selon la quantité de traitement relarguée. Certaines observations sont communes pour l'ensemble des souches testées. Ainsi l'effet constaté des antibiotiques diminue au cours du temps. Comme remarqué pour les cinétiques d'élution des antibiotiques dans la partie bibliographique précédente (paragraphe 3.1.3), la cinétique de libération est biphasique. La quantité initiale d'antibiotique relarguée est très importante et atteint rapidement, en quelques heures, un pic de concentration dans le milieu. En effet, il s'agit de molécules principalement situées à la surface du ciment, facilement dispersibles dès leur introduction dans le milieu. L'effet observé pour les solutions d'élution est donc optimal à J1, l'inhibition de formation du biofilm est majeure. Cependant, ce pic de diffusion d'antibiotique va décroître progressivement pour atteindre une valeur plus faible mais stable dans le temps, ce constat est surtout remarquable pour le ciment à la gentamicine. Les antibiotiques contenus dans la solution d'élution prélevée à J3 sont donc présents à une concentration plus faible, et ont un effet moins notable pour prévenir la formation de biofilm par les souches *S. aureus* que ceux de la solution à J1. Ce constat est d'autant plus valable pour la solution d'élution de J9, moins efficace que celle de J3 et de J1. Cet effet de diminution d'activité est communément observé mais propre à chaque antibiotique, chaque ciment et chaque forme, chaque milieu, il peut être difficile à apprécier et quantifier. De plus, les souches bactériennes présentent toutes une CMI différente, elles ne sont pas sensibles à une même concentration d'antibiotiques. A la fin de l'expérience, l'effet des antibiotiques est donc beaucoup moins marqué et devient insuffisant pour inhiber la constitution de biofilm si le ciment contient une seule molécule (ici la gentamicine).

Cependant, le risque d'infection est le plus élevé au cours de l'opération chirurgicale de pose de matériel. Il est donc nécessaire que les ciments chargés en antibiotiques aient un effet anti-biofilm optimal dès le premier jour, ce qui est en effet observé au cours de ces manipulations. Il est néanmoins important de conserver un effet stable et constant dans la durée tout en n'entraînant pas de résistance par les faibles doses de traitement dispensées. Une adaptation du ciment, des antibiotiques qu'il contient ainsi que de leur dosage présente donc un intérêt thérapeutique. Cet ajustement doit être réalisé selon la souche incriminée mais également selon l'état physiologique du patient, celui-ci impliquant une possible variation de la concentration du traitement.

Toutefois, la cinétique de libération des antibiotiques dans le milieu au cours de l'expérience, soit sur les neuf jours, présenterait également un intérêt à être étudiée. Elle pourrait être déterminée par exemple grâce à des mesures spectrophotométriques. Il serait profitable d'estimer les moments du « pic » et de la « stagnation » du relargage des antibiotiques (soit plusieurs jours après), ainsi que les quantités délivrées. Ainsi, la corrélation directe entre la quantité d'antibiotiques libérés au cours du temps et l'effet prophylactique sur la formation du biofilm par les souches de *S. aureus* pourrait être évaluée.

Des souches qui ne présentent pas de résistance aux antibiotiques étudiés, selon leurs antibiogrammes respectifs (voir Tableau 2), ont été utilisées : SASM et SARM. Pour ces souches, une réduction de la formation de biofilm en présence de tous les ciments contenant au moins un antibiotique est attendue. Si la présence de gentamicine seule n'est pas suffisante pour inhiber totalement la formation de biofilm, l'ajout d'un deuxième antibiotique doit permettre d'améliorer cet effet. Au cours des expériences, il a été constaté que tous les ciments avec des antibiotiques entraînent une inhibition de la formation de biofilm à J1 et J3. Cependant, à J9, il y a une quantité plus importante de biofilm formé en présence de gentamicine seule, son action prophylactique est plus limitée et elle perd de son activité anti-biofilm. En effet, la CMI est rapidement atteinte au cours de l'expérience lorsque la concentration en traitement dans les solutions diminue, celui-ci n'est donc plus efficace. L'action de la gentamicine est alors amoindrie et les colonies de *S. aureus* peuvent facilement s'assembler entre elles et constituer un biofilm. Toutefois l'ajout d'un deuxième antibiotique au PMMA permet de conserver cette action prophylactique stable tout au long de l'expérience, son intérêt est alors particulièrement démontré à J9. Les combinaisons d'antibiotique présentent une action prolongée par rapport au ciment Genta. Les résultats attendus sont donc confirmés. Les résultats obtenus sont toutefois

comparables entre l'addition de clindamycine ou de vancomycine, la souche est sensible à l'action de ces 2 antibiotiques.

Cependant, les souches de *S. aureus* présentent un pouvoir d'adaptation important et sont ainsi capables de développer facilement des résistances aux traitements. La fréquence de résistance aux aminoglycosides pour les *cocci* à Gram positif impliqués dans les IPA n'est pas précisément connue, mais elle varie de 12 à 75 % selon les études et les espèces (109). Ainsi, le taux de résistance à la gentamicine n'est pas insignifiant, il est donc nécessaire de tester l'impact de ces ciments sur une souche résistante à la gentamicine, dans cette expérience une souche SARM est utilisée. Une absence d'effet du ciment Genta est alors attendue. Cependant, la souche est sensible à la fois à la vancomycine et à la clindamycine, les ciments Genta + Vanco et Genta + Clinda doivent donc présenter une meilleure efficacité pour la prévention de la constitution de biofilm. Comme supposé, l'ajout de gentamicine seule ne permet effectivement pas une prévention de la formation de biofilm, à aucun des jours testés. A J1, une faible diminution non-significative est constatée mais peut être expliquée par la concentration très importante en antibiotiques libérés. En ajoutant un deuxième antibiotique (clindamycine ou vancomycine), les quantités de bactéries contenues dans le biofilm diminuent, ces associations possèdent donc une action préventive anti-biofilm. En effet, l'antibiotique ajouté présente un mécanisme d'action différent de la gentamicine, la souche n'a donc pas acquis de résistance pour celui-ci. La clindamycine ou la vancomycine contenues dans ces combinaisons sont alors efficaces sur cette souche bactérienne et permettent ainsi, à cette concentration, une inhibition partielle de la génération de biofilm. Le choix d'une association d'antibiotiques est donc à privilégier pour cette souche staphylococcique.

Enfin, des souches résistantes à la vancomycine ou à la clindamycine ont été étudiées. En effet, bien que ces résistances de *S. aureus* à ces molécules soient plus rarement évoquées, elles ne restent pas négligeables. Deux souches SARM et SASM résistantes à la clindamycine, et une souche SASM résistante à la vancomycine ont donc été utilisées. Les résultats espérés sont donc une inhibition de la formation de biofilm avec l'ensemble des ciments contenant un antibiotique, les souches présentant une sensibilité pour la gentamicine. Un effet supérieur est attendu avec le ciment Genta + Clinda lorsque la souche est résistante à la vancomycine et avec le ciment Genta + Vanco pour les deux souches résistantes à la clindamycine. Pour ces trois souches, le ciment Genta ne permet toutefois pas d'inhibition de la formation de biofilm à J9. A J1 et J3, son effet varie selon les souches, mais n'est significatif sur l'ensemble de ces deux jours pour aucune des trois souches. De plus, la souche SARM résistante à la clindamycine

présente une sensibilité diminuée à la gentamicine. Son action anti-biofilm est donc très limitée sur ces souches bactériennes. L'ajout d'un deuxième antibiotique permet une inhibition plus conséquente, efficace pour tous les jours testés (J1, J3 et J9). La combinaison de deux molécules permet de conserver une activité anti-biofilm sur toute la durée de l'expérience, l'impact est ainsi supérieur à la gentamicine seule et leur utilisation est à privilégier. Cependant, l'addition de vancomycine ou de clindamycine semble présenter des effets similaires, bien que les souches soient résistantes à l'un des deux antibiotiques. Ce résultat peut être expliqué par la quantité importante d'antibiotiques libérés dans les premiers jours, mais également par une action synergique des deux traitements. L'action de la combinaison des antibiotiques est alors supérieure à la somme des effets des deux médicaments pris séparément. Pour autant, il aurait été intéressant de comparer également l'action de ces combinaisons à des ciments contenant seulement de la vancomycine ou de la clindamycine. Ces résultats pourraient amener à déterminer si l'amélioration de l'effet d'inhibition du biofilm bactérien est due à l'effet synergique de la combinaison des antibiotiques ou si elle résulte de l'action séparée des traitements. Ainsi, un ciment Genta + Clinda pourrait être comparé à un ciment à la gentamicine et à un ciment contenant de la clindamycine, et de faire de même pour la vancomycine, afin de démontrer un possible effet synergique. Cependant, la clindamycine et la vancomycine ne contiennent pas les bactéries Gram négatif dans leur spectre d'activité, qui sont également incriminés dans les IPA, ces ciments ne sont donc pas développés par le fabricant, ni disponibles sur le marché.

En regroupant l'ensemble des souches testées, le ciment comprenant de la gentamicine seule possède une action anti-biofilm significative sur toute la durée de l'expérience. Les différences importantes de sensibilité des souches staphylococciques à ce ciment justifient cependant l'ajout d'un second antibiotique, pour obtenir un spectre d'action plus large. Les autres ciments Genta + Clinda et Genta + Vanco présentent également une diminution significative du nombre de colonies dans le biofilm. Ces résultats attestent de l'efficacité des antibiotiques contenus dans les ciments orthopédiques sur la prévention du biofilm.

Toutefois, l'ajout d'un deuxième antibiotique permet une inhibition supérieure de la formation de biofilm. La diminution du nombre de colonies qui sont comprises dans le biofilm est plus importante en comparaison avec la gentamicine seule, sauf à J1 pour le ciment Genta + Vanco. Ces ciments sont donc à privilégier pour une action anti-biofilm plus efficace. Les antibiotiques présentent en effet des mécanismes d'action différents, et leur association est alors

efficace même en cas de résistance à l'un ou l'autre des composants. Ces résultats rejoignent ceux exposés par Ensing *et al.* qui démontrent une efficacité supérieure du ciment COPAL G+C (gentamicine + clindamycine) au ciment PALACOS R+G (gentamicine seule). Selon cette étude, l'effet anti-biofilm supérieur du ciment COPAL G+C est expliqué par une quantité plus importante d'antibiotique relarguée, et sur une durée plus importante. En outre, lors de l'utilisation de PALACOS R+G, les auteurs ont décrit la formation de SCV par les souches de *S. aureus* employées, présentant alors une sensibilité diminuée à la gentamicine (103). De plus, les résultats exposés par Bertazzoni Minelli *et al.* indiquent également une meilleure élution d'antibiotiques en ajoutant de la vancomycine à un ciment PMMA à la gentamicine (104). Cependant, selon notre étude, les associations contenant de la vancomycine ou de la clindamycine entraînent un effet anti-biofilm similaire sur les souches staphylococciques. Cette observation est valable même pour les souches présentant une résistance à l'un ou l'autre des antibiotiques.

Conclusion

Staphylococcus aureus est responsable de nombreuses infections ostéoarticulaires (IOA), dont des infections sur prothèse articulaire (IPA). Cette bactérie possède de nombreux mécanismes de virulence et de persistance, qui rendent sa présence difficile à éradiquer. Ainsi, sa capacité à produire un biofilm bactérien, favorisée par l'implantation d'un matériel étranger, accroît sa résistance aux attaques du système immunitaire et sa tolérance aux antibiotiques. Une stratégie thérapeutique adaptée doit donc être mise en œuvre dès la chirurgie de pose pour prévenir tout développement d'une infection. En plus du traitement oral ou intraveineux, des antibiotiques peuvent alors être ajoutés aux ciments orthopédiques utilisés pour fixer la prothèse, afin d'obtenir une concentration locale importante pour une prophylaxie efficace.

Les antibiotiques contenus dans ces ciments sont relargués en deux temps. On observe tout d'abord un pic de concentration dès les premières heures après leur introduction dans le milieu, puis cette concentration diminue et se stabilise pour atteindre une valeur plus faible correspondant à une diffusion lente dans le milieu. Grâce à leur action bactéricide ou bactériostatique, les antibiotiques vont alors entraîner une diminution du nombre de bactéries viables et ainsi empêcher la formation de biofilm, dans les expériences menées ici par *Staphylococcus aureus*. La prévention de biofilm est plus importante avec les solutions d'élutions contenant des antibiotiques prélevées à J1 que pour celles prélevées à J3 ou J9, comme il a été démontré au cours de l'expérience menée. Cependant, le risque d'infection étant prépondérant dans les suites précoces de la chirurgie, une prophylaxie très efficace, donc une quantité plus importante d'antibiotiques, est nécessaire dans les premiers jours.

Le choix des antibiotiques présents dans les ciments doit être basé sur les résultats de l'antibiogramme de la souche incriminée dans l'infection. En effet, il n'est pas judicieux d'utiliser des antibiotiques auxquels la souche est résistante car ceux-ci n'auront pas ou peu d'effet sur la constitution du biofilm sur les tissus ou matériels avoisinants. Cependant, un effet synergique peut être constaté en incorporant plusieurs molécules actives. Une combinaison d'antibiotiques est donc à privilégier si la bactérie présente de nombreuses résistances. Celle-ci permet d'élargir son spectre d'activité mais également d'améliorer la vitesse de bactéricidie, de restreindre l'émergence de nouvelles résistances, tout en limitant les doses d'antibiotiques nécessaires. Au cours des expérimentations réalisées, un effet inhibiteur supérieur et prolongé sur la constitution de biofilm bactérien a été démontré lors de l'ajout d'un antibiotique

(clindamycine ou vancomycine) à un ciment contenant déjà de la gentamicine. Cette observation est également valable pour les souches résistantes à un des deux antibiotiques de la combinaison, en raison d'un effet synergique. L'ajout d'un seul antibiotique au PMMA, dans notre cas la gentamicine, assure une prophylaxie efficace les premiers jours pour les bactéries qui y sont sensibles, même si l'effet anti-biofilm devient très limité à J9. Les données que nous avons générées démontrent la supériorité des ciments composés d'association de molécules.

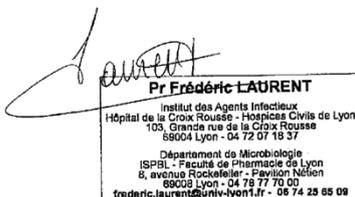
Le paramètre critique à contrôler lors de l'usage de ces dispositifs de ciments aux antibiotiques est la concentration de l'antibiotique dans le milieu biologique. Celui-ci doit être assez important pour entraîner un effet prophylactique antibactérien et anti-biofilm mais ne doit être ni trop élevé ni trop faible au risque de provoquer respectivement une toxicité ou la sélection de résistances bactériennes aux antibiotiques. L'utilisation de ce type de ciments orthopédiques pourrait ainsi permettre de prévenir les infections à la suite de la pose de matériel prothétique. Cette action prophylactique locale est cruciale car il est ensuite plus compliqué d'éradiquer un biofilm bactérien qui s'est installé et qui va assurer une protection aux bactéries. Leur effet d'inhibition sur la formation du biofilm de *S. aureus* a effectivement été démontré au cours de ces expériences. Si la gentamicine seule n'est pas toujours efficace pour prévenir cette constitution de biofilm, son association avec la vancomycine ou la clindamycine permet de renforcer cet effet.

Des études complémentaires sont actuellement conduites au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI). En effet, les expériences décrites sont étendues à d'autres souches bactériennes pouvant être à l'origine d'IPA, telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que des entérobactéries : *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. De nouveaux modèles sont également en cours de développement afin de se rapprocher au maximum des conditions *in vivo*, notamment en prolongeant les expériences sur plusieurs semaines, en développant un milieu synovial artificiel ou encore en évaluant l'impact de ces ciments sur les staphylocoques intracellulaires.

Le Président de la thèse,

Nom : Frédéric Laurent

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 12/06/2020

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeure C. VINCIGUERRA

Bibliographie

1. ATIH - Agence Technique de l'information sur l'hospitalisation. Hospitalisation Chiffres clés [Internet]. 2018. Disponible sur: https://www.atih.sante.fr/sites/default/files/public/content/2554/atih_chiffres_cles_2017.pdf
2. ANSM. Surveillance des dispositifs médicaux à risque : Prothèses totales de genou (PTG) [Internet]. 2015 juill p. 16. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/3798f4f2a1e239b28ddf80c8b675ee86.pdf
3. Fabre T. La chirurgie de la gonarthrose. 2018 nov 23; Université de Bordeaux.
4. Martínez-Moreno J, Merino V, Náchter A, Rodrigo JL, Climente M, Merino-Sanjuán M. Antibiotic-loaded Bone Cement as Prophylaxis in Total Joint Replacement: Antibiotic Loaded Bone Cement. *Orthop Surg.* nov 2017;9(4):331-41.
5. Bernard L. Infections de prothèse articulaire. *Médecine Mal Infect.* mai 2003;33(5):231-9.
6. S. El Banna et J. Chappuis. Le rôle du ciment en orthopédie. *Rev Med Brux.* 2008;29:546-51.
7. Trouillet S. Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol Parasitol.* 2011;
8. Pavese P. Infections ostéo-articulaires chirurgicales. DIU infection ostéo-articulaire; 2014 nov; Lyon.
9. Ministère des Solidarités et de la Santé. Infections ostéo-articulaire : questions réponses [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2019. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/infections-osteo-articulaires/infections-osteo-articulaire-questions-reponses/>
10. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev.* 1 avr 2014;27(2):302-45.
11. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *The Lancet.* 24 juill 2004;364(9431):369-79.
12. Zimmerli W. OPE. Infections ostéo-articulaires - Fondements, prophylaxie, diagnostic

et traitement. groupe d'experts Infections ostéo-articulaires (IOA) de la Société Suisse d'Orthopédie et de Traumatologie et de la Société Suisse d'Infectiologie; 2015.

13. Laurent E, Gras G, Druon J, Rosset P, Baron S, Le-Louarn A, et al. Key features of bone and joint infections following the implementation of reference centers in France. *Médecine Mal Infect.* juin 2018;48(4):256-62.
14. Haute Autorité de Santé. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation - Recommandations pour la pratique clinique [Internet]. 2014 mars. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-03/rbp_recommandations_protheses_infectees_vd.pdf
15. Lenguerrand E, Whitehouse MR, Beswick AD, Kunutsor SK, Burston B, Porter M, et al. Risk factors associated with revision for prosthetic joint infection after hip replacement: a prospective observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 1 sept 2018;18(9):1004-14.
16. Isnard C Guérin F. Infections ostéoarticulaires. In: *Bactériologie médicale*. 3^e éd. 2016. p. 199-206.
17. CMIT. ECN PILLY: maladies infectieuses et et tropicales. MED-LINE EDITIONS - EDUC; 2017.
18. Ziza J-M, Zeller V, Desplaces N, Mamoudy P. Infections sur prothèses articulaires : conditions du diagnostic et traitement. *Rev Rhum.* avr 2006;73(4):337-44.
19. Valour F. Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*: épidémiologie moléculaire et corrélation entre expression clinique et interactions hôte – bactérie. :207.
20. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS.* avr 2017;125(4):353-64.
21. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 1 janv 2013;56(1):e1-25.
22. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Recommandations de pratique clinique - Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéosynthèse). 2009.
23. Figueiredo S. Infections de prothèses ostéo-articulaires. MAPAR; 2017.

24. Palestro CJ, Love C, Miller TT. Imaging of musculoskeletal infections. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. déc 2006;20(6):1197-218.
25. Cyteval C, Bourdon A. Imagerie des infections sur matériel orthopédique. *J Radiol Diagn Interv*. 21 juin 2012;93(6):578-89.
26. Dutronc H, Bocquentin F, Dupon M. Apport de l'imagerie au diagnostic de l'infection ostéoarticulaire. *Médecine Mal Infect*. juin 2004;34(6):257-63.
27. Alijanipour P, Bakhshi H, Parvizi J. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Threshold for Serological Markers. *Clin Orthop Relat Res*. oct 2013;471(10):3186-95.
28. Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de langue française. Item 112 : Réaction inflammatoire : aspects biologiques et cliniques, conduite à tenir [Internet]. 2011 oct. Disponible sur:
http://campus.cerimes.fr/immunologie/enseignement/immuno_112/site/html/3_2.html
29. Saleh A, George J, Faour M, Klika AK, Higuera CA. Serum biomarkers in periprosthetic joint infections. *Bone Jt Res*. 8 févr 2018;7(1):85-93.
30. Goswami K, Parvizi J, Maxwell Courtney P. Current Recommendations for the Diagnosis of Acute and Chronic PJI for Hip and Knee—Cell Counts, Alpha-Defensin, Leukocyte Esterase, Next-generation Sequencing. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 31 juill 2018;11(3):428-38.
31. Xie K, Dai K, Qu X, Yan M. Serum and Synovial Fluid Interleukin-6 for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *Sci Rep*. déc 2017;7(1):1496.
32. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Combined Measurement of Synovial Fluid α -Defensin and C-Reactive Protein Levels: Highly Accurate for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection: *J Bone Jt Surg-Am Vol*. sept 2014;96(17):1439-45.
33. Shahi A, Kheir MM, Tarabichi M, Hosseinzadeh HRS, Tan TL, Parvizi J. Serum D-Dimer Test Is Promising for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection and Timing of Reimplantation: *J Bone Jt Surg*. sept 2017;99(17):1419-27.
34. Laurent F Rottman M. Infections osseuses et articulaires. *Référentiel en microbiologie médicale*. 5^e éd. 2015.

35. Li C, Renz N, Trampuz A. Management of Periprosthetic Joint Infection. *Hip Pelvis*. sept 2018;30(3):138-46.
36. Leonard HAC, Liddle AD, Burke Ó, Murray DW, Pandit H. Single- or Two-stage Revision for Infected Total Hip Arthroplasty? A Systematic Review of the Literature. *Clin Orthop*. mars 2014;472(3):1036-42.
37. Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezèque H, Beltrand E, et al. Outcome and Predictors of Treatment Failure in Total Hip/Knee Prosthetic Joint Infections Due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 août 2011;53(4):334-40.
38. Pilly E, Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France). *Maladies infectieuses et tropicales*. Paris: Alinéa Plus; 2015.
39. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;13.
40. Staphylocoque [Internet]. Institut Pasteur. 2016. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>
41. Infections nosocomiales [Internet]. Inserm - La science pour la santé. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales>
42. A.Tristan, JP.Rasigade. *Staphylococcus spp* [Internet]. SFM - Société Française de Microbiologie. Disponible sur: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_Staphylococcus.pdf
43. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis*. juin 2008;46(S5):S350-9.
44. Foster TJ, Geoghegan JA. *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier; 2015. p. 655-74.
45. Kane TL, Carothers KE, Lee SW. Virulence Factor Targeting of the Bacterial Pathogen *Staphylococcus aureus* for Vaccine and Therapeutics. *Curr Drug Targets*. 18 janv 2018;19(2):111-27.
46. I. Verdier, G. Lina, Y. Gillet, F. Vandenesch. *Staphylococcus* [Internet]. Campus de Microbiologie Médicale. Disponible sur: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/staph.html>
47. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*. 1 févr 2014;17:32-7.

48. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : the role of Panton–Valentine leukocidin. *Lab Invest.* janv 2007;87(1):3-9.
49. ANSES. *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques [Internet]. 2011. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0117Fi.pdf>
50. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Lab.* déc 2008;2008(407):61-9.
51. Costa AR, Batistão DWF, Ribas RM, Sousa AM, Pereira O, Botelho CM. *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. 2013;9.
52. O’Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 1 janv 2004;17(1):218-34.
53. Shi S, Zhang X. Interaction of *Staphylococcus aureus* with osteoblasts (Review). *Exp Ther Med.* mars 2012;3(3):367-70.
54. Sinha B, Fraunholz M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol.* févr 2010;300(2-3):170-5.
55. Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 26 nov 2015;5.
56. Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* févr 2009;17(2):59-65.
57. Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, Tasse J, Flammier S, Rasigade J-P, et al. Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2015;59(4):2029-36.
58. Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev.* 1 avr 2016;29(2):401-27.
59. Kahl BC. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* – A bacterial survival strategy. 2014;8.
60. von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept—the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury.* mai 2006;37(2):S26-33.
61. Tuscherr L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, et al.

Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med.* 1 mars 2011;3(3):129-41.

62. Sendi P, Proctor RA. Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* févr 2009;17(2):54-8.

63. Tande AJ, Osmon DR, Greenwood-Quaintance KE, Mabry TM, Hanssen AD, Patel R. Clinical Characteristics and Outcomes of Prosthetic Joint Infection Caused by Small Colony Variant Staphylococci. 2014;5(5):9.

64. Dastgheyb S, Parvizi J, Shapiro IM, Hickok NJ, Otto M. Effect of Biofilms on Recalcitrance of Staphylococcal Joint Infection to Antibiotic Treatment. *J Infect Dis.* 15 févr 2015;211(4):641-50.

65. Haaber J, Cohn MT, Frees D, Andersen TJ, Ingmer H. Planktonic Aggregates of Staphylococcus aureus Protect against Common Antibiotics. Otto M, éditeur. *PLoS ONE.* 18 juill 2012;7(7).

66. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah T-F, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon.* 28 déc 2018;4(12).

67. Roux A, Ghigo J-M. Les biofilms bactériens. *Bull Académie Vét Fr.* 2006;(1):261.

68. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Staphylococcus aureus biofilms. *Virulence.* 2011;2(5):445-59.

69. Costerton JW, Stewart Philip S., Greenberg E.P. Bacterial Biofilms : a Common Cause of Persistent Infections. *SCIENCE.* 1999;284:1318-22.

70. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 avr 2013;3(4):a010306-a010306.

71. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *J Anti-Infect.* sept 2014;16(3):112-21.

72. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol.* 2014;9(8):987-1007.

73. 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.* 14 juin 2013;5(2).
74. Otto M. MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol.* oct 2012;14(10):1513-21.
75. Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy M-É, Tristan A, Vandenesch F. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : Les points-clés en 2010. *médecine/sciences.* nov 2010;26(11):943-9.
76. Wright GD. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* déc 2010;8(1):123.
77. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* 1 mai 2017;41(3):430-49.
78. Mesaros N. L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne : état de la question et implications - Active antibiotic efflux: state of the art and implications. *Lett Infect.* 2005;XX(4):8.
79. Leclercq R. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann Fr Anesth Réanimation.* mai 2002;21(5):375-83.
80. Daurel C, Leclercq R. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Lab.* déc 2008;2008(407):81-90.
81. Arora M. Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature. *World J Orthop.* 2013;4(2):67.
82. Seyyed Hosseinzadeh HR, Emami M, Lahiji F, Sina A, Masoudi A, Emami S. The Acrylic Bone Cement in Arthroplasty. In: Kinov P, éditeur. *Arthroplasty - Update.* InTech; 2013.
83. Vaishya R, Chauhan M, Vaish A. Bone cement. *J Clin Orthop Trauma.* déc 2013;4(4):157-63.
84. Haute Autorité de Santé. Evaluation des ciments avec ou sans antibiotiques pour la fixation des implants articulaires. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2016.
85. Règlement (UE) 2017/ 745 du PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL, relatif aux dispositifs médicaux [Internet]. avr 5, 2017 p. 175. Disponible sur: <https://eur->

lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R0745&from=FR

86. Bistolfi A, Massazza G, Verné E, Massè A, Deledda D, Ferraris S, et al. Antibiotic-Loaded Cement in Orthopedic Surgery: A Review. *ISRN Orthop.* 2011;2011:1-8.
87. Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and Bone Cements: Experimental and Clinical Long-Term Observations. *Acta Orthop Scand.* janv 1980;51(1-6):49-56.
88. Gálvez-López R, Peña-Monje A, Antelo-Lorenzo R, Guardia-Olmedo J, Moliz J, Hernández-Quero J, et al. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagn Microbiol Infect Dis.* janv 2014;78(1):70-4.
89. Frommelt L, Kühn K-D. Antibiotic-Loaded Cement. In: *The Well-Cemented Total Hip Arthroplasty.* Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. p. 86-92.
90. VIDAL : Base de données médicamenteuse pour les prescripteurs libéraux [Internet]. VIDAL. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
91. Sojo-Dorado J. R-BJ. Gentamicin. In: *Kucers' the use of antibiotics : a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs.* 7^e éd. American Society for Microbiology; 2018. p. 964-81.
92. Gyssens Inge C.; E.Holmes Natasha. Vancomycin. In: *Kucers' the use of antibiotics : a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs.* 7^e éd. American Society for Microbiology; 2018. p. 785-820.
93. VANCOMYCINE MYLAN - Vancomycine chlorhydrate - Posologie, Effets secondaires, Grossesse [Internet]. Doctissimo. Disponible sur: <https://www.doctissimo.fr/medicament-VANCOMYCINE-MYLAN.htm>
94. Clindamycine - Maladies infectieuses [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/bact%C3%A9ries-et-m%C3%A9dicaments-antibact%C3%A9riens/clindamycine>
95. Larry Danziger GSI. Clindamycin and Lincomycin. In: *Kucers' the use of antibiotics : a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs.* 7^e éd. American Society for Microbiology; 2018. p. 964-81.
96. Laredo J, Orcel P. Vertébroplastie, cyphoplastie et cimentoplastie dans les fractures

ostéoporotiques. 2016;8.

97. Huet H, Baud J, Deramond H. Vertébroplastie, cyphoplastie en pathologie tumorale. *Rev Mal Respir Actual*. sept 2010;2(3):236-41.

98. Nau C, Seebach C, Trumm A, Schaible A, Konradowitz K, Meier S, et al. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*. févr 2016;47(2):325-34.

99. Masquelet A. Le concept de membrane induite pour la reconstruction des pertes de substance des os longs. 2008;5.

100. Kim SB, Kim YJ, Yoon TL, Park SA, Cho IH, Kim EJ, et al. The characteristics of a hydroxyapatite–chitosan–PMMA bone cement. *Biomaterials*. nov 2004;25(26):5715-23.

101. van Vugt TAG, Arts JJ, Geurts JAP. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate Beads and Spacers in Treatment of Orthopedic Infections and the Role of Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 25 juill 2019;10:1626.

102. Anagnostakos K. Therapeutic Use of Antibiotic-loaded Bone Cement in the Treatment of Hip and Knee Joint Infections. *J Bone Jt Infect*. 1 janv 2017;2(1):29-37.

103. Ensing GT, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ, Neut D. Copal Bone Cement Is More Effective in Preventing Biofilm Formation than Palacos R-G. *Clin Orthop*. juin 2008;466(6):1492-8.

104. Bertazzoni Minelli E. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *J Antimicrob Chemother*. 16 janv 2004;53(2):329-34.

105. Schwarz EM, McLaren AC, Sculco TP, et al. Adjuvant antibiotic-loaded bone cement: Concerns with current use and research to make it work. *J Orthop Res*. 2020;1–13.

106. McLaren AC, McLaren SG, Smeltzer M. Xylitol and Glycine Fillers Increase Permeability of PMMA to Enhance Elution of Daptomycin: *Clin Orthop*. oct 2006;451:25-8.

107. Langlais F, Judet H, Vielpeau C, Bernard L, Chauveaux D, Beaufils P, et al. Utilisation des ciments contenant un antibiotique pour le scellement d'arthroplastie primaire - Conférence de Consensus. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot*. 94(6):215-8.

108. Josse J, Valour F, Maali Y, Diot A, Batailler C, Ferry T, et al. Interaction Between

Staphylococcal Biofilm and Bone: How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? *Front Microbiol.* 17 juill 2019;10:1602.

109. Corona PS, Espinal L, Rodríguez-Pardo D, Pigrau C, Larrosa N, Flores X. Antibiotic Susceptibility in Gram-Positive Chronic Joint Arthroplasty Infections: Increased Aminoglycoside Resistance Rate in Patients With Prior Aminoglycoside-Impregnated Cement Spacer Use. *J Arthroplasty.* août 2014;29(8):1617-21.

110. Tunney MM, Ramage G, Patrick S, Nixon JR, Murphy PG, Gorman SP. Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Orthopedic Implants following Revision Hip Surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 1998;42(11):3002-5.

111. Tasse J. Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections ostéo-articulaires à staphylocoques. [Lyon]: Université Claude Bernard Lyon 1; 2017.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,



En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

ISPB FACULTE DE PHARMACIE



L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

BALLET Mathilde

Impact de l'ajout d'antibiotiques dans les ciments orthopédiques sur la prévention de la formation de biofilm au cours d'infections sur prothèse articulaire à *Staphylococcus aureus*

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2020, 89 p.

RESUME

La pose de prothèses articulaires est en plein essor, mais n'est pas sans risque. Elle est associée à des complications sérieuses comme des infections. Afin de les prévenir, il est possible d'ajouter des antibiotiques aux ciments orthopédiques employés pour améliorer la fixation de la prothèse au tissu osseux. Ceux-ci permettent une libération prolongée des antibiotiques et donc une concentration locale importante. Ils ont ainsi une action prophylactique sur la formation de biofilm par les bactéries. En effet, les bactéries impliquées dans ces infections sur matériel, comme *Staphylococcus aureus*, peuvent s'assembler et former un biofilm, les rendant plus difficiles à éradiquer et plus tolérantes aux antibiotiques ; il est donc essentiel de prévenir sa formation.

Un ou plusieurs antibiotiques peuvent ainsi être ajoutés au ciment orthopédique. L'étude *in vitro* menée au cours de cette thèse a permis de comparer les actions prophylactiques anti-biofilm sur *S. aureus* de plusieurs antibiotiques et associations d'antibiotiques contenus dans des ciments. Les traitements sont libérés en deux temps : d'abord rapidement, permettant d'atteindre une concentration locale élevée puis plus lentement, leur action est alors plus restreinte. Les combinaisons de gentamicine avec la clindamycine ou la vancomycine sont apparues plus efficaces que la gentamicine seule, qui perd de son action anti-biofilm au cours des expériences conduites. De plus, ces associations augmentent le spectre d'activité antibiotique et permettent donc une meilleure prévention des infections sur prothèse articulaire.

MOTS CLES

Staphylococcus aureus
Biofilm
Infection sur prothèse articulaire
Ciments orthopédiques avec antibiotiques

JURY

M. LAURENT Frédéric, Professeur des universités - Praticien hospitalier
M. JOSSE Jérôme, Maître de Conférences
Mme KOLENDA Camille, Assistant Hospitalier Universitaire
M. FERRY Tristan, Professeur des universités - Praticien hospitalier

DATE DE SOUTENANCE

01/07/2020

ADRESSE DE L'AUTEUR

4 chemin de la Concorde
69130 Ecully