Infections ostéo-articulaires à Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis : épidémiologie moléculaire et corrélation entre expression clinique et interactions hôte – bactérie

Florent Valour

▶ **To cite this version:**

Florent Valour. Infections ostéo-articulaires à Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis : épidémiologie moléculaire et corrélation entre expression clinique et interactions hôte – bactérie. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10287 . tel-01315665

HAL Id: tel-01315665
https://theses.hal.science/tel-01315665

Submitted on 13 May 2016

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

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

N° d'ordre 287-2014 Année 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole doctorale Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ET *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Epidémiologie moléculaire et corrélation entre expression clinique et interactions hôte - bactérie

Soutenue publiquement le 15 décembre 2014

par

Florent VALOUR

JURY

Pr. Jérôme ETIENNE	Université Claude Bernard Lyon 1	Président du jury
Pr. Eric SENNEVILLE	Université Lille Nord de France	Rapporteur
Pr. Vincent CATTOIR	Université de Caen Basse-Normandie	Rapporteur
Pr. Paul M. TULKENS	Université Catholique de Louvain	Examinateur
Pr. Vincent LE MOING	Université Montpellier 1	Examinateur
Pr. Christian CHIDIAC	Université Claude Bernard Lyon 1	Examinateur
Pr. Tristan FERRY	Université Claude Bernard Lyon 1	Co-directeur de thèse
Dr. Frédéric LAURENT	Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jérôme ETIENNE, Président du jury :

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant la présidence de cette thèse. Je suis très honoré de bénéficier de votre accompagnement depuis mon master 2. Soyez assuré de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Eric SENNEVILLE :

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail et de participer au jury de cette thèse, je vous en remercie. Votre expérience des infections ostéo-articulaires valorise grandement le jugement de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Vincent CATTOIR :

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de ce travail et de participer à ce jury, et de l'intérêt que vous portez à ce travail. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Paul M. TULKENS :

C'est un grand honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury de cette thèse. Votre expertise en pharmacologie intra-cellulaire dans le cadre des infections staphylococciques enrichit grandement le jugement de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Vincent LE MOING :

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de participer à ce jury et d'apporter votre enrichissant jugement à ce travail. Soyez assuré de ma respectueuse reconnaissance et de tout mon respect.

A Monsieur le Professeur Christian CHIDIAC :

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de participer à ce jury. Merci pour votre encadrement et votre confiance qui m'accompagnent depuis mon master 1. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de tout mon respect.

A Monsieur le Docteur Frédéric LAURENT, Directeur de thèse :

Frédéric, je te remercie sincèrement pour ton encadrement et ta confiance tout au long de ces trois années de doctorat. Merci d'avoir emporté ces manuscrits en voiture, en train, en avion, sur la terrasse de Cavalaire, à la plage … (je pense que certaines pages de cette thèse ont fait le tour du monde !) … et de les avoir ramenés remplis de petites notes, de grandes flèches, d'astérisques, de crochets et parenthèses, de phrases entourant les pages qui, si elles m'ont fait râler, ont grandement enrichi ce travail et animé nos discussions ! J'espère sincèrement que nous pourrons poursuivre ces travaux par d'autres projets (en évitant les zoos et la stratosphère s'il te plait !).

A Monsieur le Professeur Tristan FERRY, Co-directeur de thèse :

Tristan, je te remercie une nouvelle fois pour ton soutien et ton aide pendant la réalisation de ce travail, et pour tes capacités à transmettre ton expérience de la pathologie ostéo-articulaire. J'espère sincèrement pouvoir continuer à avancer à tes côtés dans cette voie encore longtemps, en profitant au quotidien de tes compétences, toujours dans la bonne humeur.

Au **Professeur Christine LASSET**, pour son soutien et sa compréhension au cours de ces trois années de tutorat à l'E2M2.

Sophie, un immense merci d'avoir accompagné mes premiers pas au laboratoire (« Tiens, transferts 1L d'eau distillée avec cette pipette de 100 µL »), de tes conseils techniques et scientifiques (« Faut faire du FACS j'te dis » … Aaarrrrg), de ton aide indispensable à chaque étape de ce travail, et surtout pour l'amitié qui s'est tissée pendant ses longues heures sous la hotte. Fous rires (Foui foui foui), engueulades (« Non mais je vais te casser la g***** Florent Valour ! »), complicité … des signes que les bases sont solides et que caillette et caillon n'ont pas fini de faire des leurs ! ;-)

A tous les membres de l'**équipe « Pathogénèse des infections à staphylocoque » du CIRI**, pour leur soutien, leur aide et leurs conseils. C'est un plaisir de travailler avec vous. En particulier, et au risque d'en oublier (vous m'excuserez …) : Merci au **Pr. François Vandenesch** pour votre confiance et votre aide depuis maintenant de nombreuses années. A **JP** pour tes conseils scientifiques toujours pertinents et pour ces longues heures passées sur R (je ne m'en suis pas remis !). A **Jason** (Meeeuuh !), **Sacha** (reviens !!!), **Patricia** (« non mais toù rigole !? ») et **Céline** pour votre soutien quotidien et votre amitié. A **Natacha** pour ton

implication et ton aide précieuse dans le projet ATB. A **Claire**, pour ton aide face au crystal violet. A **Julie**, pour l'impulsion delta-hémolysine. A **Michèle**, **Anne**, et **Olivier** pour votre aide indispensable à la collection et à la caractérisation de toutes ces souches, et vos conseils scientifiques avisés … Et à tous les autres !
Merci au laboratoire de bactériologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, et en particulier au **Dr. Sylvestre Tigaud**, **Chantal**, et **Hélène**, ainsi qu'à **Béa** et **Monique** pour m'avoir aidé à affronter le champ pulsé ... Un grand merci aux **techniciennes du CNR des staphylocoques**.

Un immense merci au **service des maladies infectieuses de la Croix-Rousse**, et à vous tous qui m'accompagnez au quotidien, pour vos précieux enseignements et votre implication auprès des patients : **Florence**, **Thomas**, **François**, **André**, **Patrick**, **Laurent**, **Evelyne**, **Marie-Paule**, et tous les autres ! Merci à **Pascale** et à toute l'équipe paramédicale. C'est pour moi un réel plaisir de travailler à vos côtés.
Un merci particulier à **Judith** et **Anissa**, pour votre aide au recueil des données cliniques utilisées dans ce travail, et surtout pour votre amitié.
Un grand merci à **Elina** pour ton amitié, ton soutien et ton immense aide au quotidien, ainsi qu'à **Nabila**, **Karine**, **Marie-Claire**, **Zaineb**, **Soifya**, **Magda**, et **Nathalie**.

A mes amis d'ici et d'ailleurs … Vous avez tous, par votre soutien sans faille, participé à l'aboutissement de ce travail. A vous qui m'accompagnez et me soutenez depuis les bancs de la fac : **Marie** et **Nico** (vivement Rodrigues !), **Amandine** et **Max**, **Nellie** et **Arnaud**.
Aux anciens de la « réa med », **Véro** et **Alex** (va falloir vite mettre Firmin à la raclette hein !), **Claire** et **Minou** (Marseille … non mais quelle idée ?!), et mes parents réanimateurs **Gaël** et **Véro**.
A « mes » premières internes, dont les compétences et le sérieux m'ont apporté la sérénité me permettant de m'éclipser de temps en temps pour écrire quelques pages de cette thèse : **Alex** (pour savoir si bien distribuer les cartes), **Sandrine**, **Gaëlle**, **Zoé**, **Emilie**, **Mathilde**, **Mélo** (tu veux du brie ?), **Julie**, et **Pascaline**.

A mes copains de vadrouille et de bulles, rencontrés bien loin d'ici : **Sandra** (merci pour ces organisations de week-ends / vacances toujours parfaites et ton attention particulière à nos manomètres !), **Mel** (une clope ?), **MC**, **Hayfa**, **Morgane**, **Serhan**, **Marine**, **Seb**, **Antoine**, **Clément** (et Joe !) et **Lorena** (côt côt !), et à mes colocs tropicaux **Louis**, **Ben**, **Alex** et **Clem**.

A mes co-internes et chefs, devenus des amis et soutien précieux : **Jean** (dis pas plus …) et **Anne**, **Sandrine** et **Fred**, **Gaude**, **Agathe**, Madame **Marie**, **Léo**, **Safia**, **Stéphane**, **Laure**, **Erwan** (Ia orana chef !) et **Isa** (vous me manquez !).

A ma famille, pour votre indispensable soutien, vos encouragement et votre affection : un immense merci à mes **parents**, à mon frère **Thibaut**, à **Vanille**, **Nathan** et **Arthur**, à mes grand-mères **Gigi** et **Mado**, à **Jean-Etienne**, **Christiane**, **Aurélie** et **Julien**, **Céline** et **Séverine**, **Marjo** et **Pétrus**, et **Romain**.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS 11

INTRODUCTION 13

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE 16

I. INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES : GENERALITES 17

1. DEFINITIONS ET CLASSIFICATIONS 17

a. Localisation anatomique 17

b. Mécanisme étiologique 20

c. Présence de matériel orthopédique 21

d. Chronologie de survenue 21

2. EPIDEMIOLOGIE 23

a. Données démographiques générales 23

b. Fréquence et facteurs favorisants 24

c. Morbi-mortalité 26

d. Coût 27

3. ETIOLOGIE BACTERIENNE 27

a. Généralités 27

b. Place du genre *Staphylococcus* 28

4. DIAGNOSTIC 29

a. Diagnostic clinique 29

b. Diagnostic biologique 30

c. Diagnostic radiologique 30

d. Diagnostic microbiologique 31

e. Diagnostic histologique 32

f. Particularités diagnostiques des infections ostéo-articulaires staphylococciques 32

5. PRISE EN CHARGE 33

a. Traitement chirurgical 33

b. Traitement médical 35

II. INTERACTIONS HOTE-PATHOGENE AU COURS DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES STAPHYLOCOCCIQUES **36**

1. PHYSIOLOGIE DU TISSU OSSEUX 36

a. Ostéoblastes et ostéocytes 37

b. Ostéoclastes 37

c. Régulation du remodelage osseux 37

2. INFECTION, REPONSE INFLAMMATOIRE ET RESORPTION OSSEUSE 39

3. FACTEURS DE VIRULENCE STAPHYLOCOCCIQUES 40

a. Colonisation de l'hôte 41

b. Sécrétion toxinique 42

c. Echappement au système immunitaire 42

4. INTERACTION OSTEOBLASTES – STAPHYLOCOQUES 43

5. FORMATION DE BIOFILM 51

6. SMALL COLONY VARIANTS 53

7. DE LA COLONISATION A L'INFECTION OSTEO-ARTICULAIRE 55

8. REGULATION DE L'EXPRESSION DES DETERMINANTS DE LA VIRULENCE CHEZ *S. AUREUS* 56

a. Système *agr* 57

b. Régulateur *sarA* 58

c. Régulateur *saeRS* 58

III. ANTIBIOTHERAPIE DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES STAPHYLOCOCCIQUES **60**

1. SPECIFICITE DE L'ANTIBIOTHERAPIE DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES STAPHYLOCOCCIQUES : RECOMMANDATIONS ACTUELLES 60

2. IMPLICATION DES MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DANS LE CHOIX DE L'ANTIBIOTHERAPIE 62

a. Action anti-biofilm des anti-staphylococciques 62

b. Action intra-cellulaire des anti-staphylococciques 64

c. Antibiothérapie et small colony variants 67

TRAVAIL PERSONNEL **69**

I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS **70**

II. MODELE *EX VIVO* D'INFECTION D'OSTEOBLASTES HUMAINS **72**

1. SCHEMA GENERAL DU MODELE 72

a. Culture des ostéoblastes humains 72

b. Cultures bactériennes 73

c. Infection des ostéoblastes 74
2. ADHESION BACTERIENNE AUX OSTEOBLASTES 75
3. MESURE DE L'INTERNALISATION DES STAPHYLOCOQUES PAR LES OSTEOBLASTES 75
4. CYTOTOXICITE INDUITE PAR L'INFECTION 76
5. EMERGENCE INTRA-CELLULAIRE DES SMALL COLONY VARIANTS 76
6. EVALUATION DE L'ACTIVITE INTRA-CELLULAIRE DES ANTIBIOTIQUES 76

III. ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM 78
1. ETUDE DU BIOFILM MATURE : METHODE COLORIMETRIQUE DU CRYSTAL VIOLET 78
2. CINETIQUE DE FORMATION DE BIOFILM : BIOFILM RING TEST™ 79

IV. INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* : ROLE DE L'INTERNALISATION DANS LES OSTEOBLASTES ET DE LA FORMATION DE BIOFILM 82

V. INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* : EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE 95

VI. DETECTION DE LA DELTA-TOXINE : UN NOUVEAU MARQUEUR DIAGNOSTIQUE DE LA CHRONICITE DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* LIE A L'INTERNALISATION DANS LES OSTEOBLASTES ET A LA FORMATION DE BIOFILM 101

VII. ACTION INTRA-OSTEOBLASTIQUE DES ANTIBIOTIQUES : UN NOUVEAU PARAMETRE A PRENDRE EN COMPTE DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ? 126

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 148

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 155

ANNEXES 185

ANNEXE 1 – VALORISATION SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL DE THESE 186
1. COMMUNICATIONS ORALES 186
2. COMMUNICATIONS AFFICHEES 187

ANNEXE 2 – AUTRES TRAVAUX ISSUS DE LA COHORTE DE PATIENTS PORTEURS D'UNE IOA A SASM DU CRIOAC DE LYON 189

LISTE DES ABREVIATIONS

AAP	*Accumulation-associated protein*
agr	*Accessory gene regulator*
BAP	*Biofilm-associated protein*
BBP	*Bone sialoprotein-binding protein*
BCC	Bouillon cœur-cervelle
BFI	*Biofilm forming index*
BGN	Bacille Gram négatif
CHIPS	*Chemotaxis inhibitory protein of staphylococci*
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNA	*Collagen-binding protein*
CNR	Centre national de référence
CRIOAC	Centre inter-régional de référence pour la prise en charge des IOA complexes
CRP	Protéine C réactive
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DO	Densité optique
FADD	*Fas-associated protein with death domain*
FAK	*Focal adhesion kinase*
FnBP	*Fibronectin-binding protein*
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
ica	*Intercellular adhesion*
IFN	Interféron
Il	Interleukine
ILK	*Integrin-linked kinase*
IOA	Infection ostéo-articulaire
IPA	Infection de prothèse articulaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISO	Infection du site opératoire
LDH	Lactate déshydrogénase
LPV	Leucocidine de Panton-Valentine
MCC	Milieu de culture complet
MOI	*Multiplicity of infection*
MSCRAMM	*Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule*

NFκB	*Nuclear factor kappa B*
NLR	*NOD-like receptor*
OPG	Ostéoprotégérine
OR	Odd ratio
PBS	*Phosphate-buffered saline*
PFT	*Pore-forming toxin*
PHRC	Programme hospitalier de recherche clinique
PIA	*Polysaccharide intercellular adhesin*
PLP	Protéine de liaison aux pénicillines
PMSI	Programme de médicalisation des systèmes d'information
PNAG	Poly-N-acétyl-glucosamine
PRR	*Pattern recognition receptors*
PSM	*Phenol-soluble modulin*
PTG	Prothèse totale de genou
PTH	Prothèse totale de hanche
RAISIN	Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales
RANK	*Receptor activator for nuclear factor κB*
RANKL	*Receptor activator for nuclear factor κB ligand*
RBI	*Relative bead immobilisation*
*sae*RS	*S. aureus exoprotein expression*
sarA	S*taphylococcal accessory regulator* A
SARM	*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SASM	*Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
SCV	*Small colony variants*
SVF	Sérum de veau fœtal
TGF	*Transforming growth factor β*
TLR	*Toll-like receptor*
TNF	*Tumor necrosis factor α*
TRAF	*TNF receptor-associated factors*
TRAIL	*Tumour necrosis factor apoptosis inducing ligand*
TSA	Gélose tryptophane-soja
TSST	*Toxic shock syndrome toxin*

INTRODUCTION

Les infections ostéo-articulaires (IOA) sont des infections polymorphes, potentiellement graves et coûteuses. Leurs diagnostic et prise en charge sont très hétérogènes, du fait des spécificités apportées par la diversité des sites infectés, de leurs délais d'évolution, de leurs mécanismes physiopathologiques, et de la présence ou non de matériel orthopédique [1–5]. Atteignant plus de 50 patients pour 100 000 habitants par an en France, elles sont associées à un risque d'échec thérapeutique élevé, à un taux de mortalité de près de 5%, et engendrent des séquelles impactant la qualité de vie des patients dans 40% des cas, malgré une prise en charge médico-chirurgicale longue et coûteuse [6,7]. Elles constituent ainsi un enjeu majeur de santé publique, et ont motivé la création en 2008 de 9 centres inter-régionaux de référence pour la prise en charge des IOA complexes (CRIOAC) répondant à la nécessité de faciliter la recherche clinique et fondamentale dans ce domaine, afin d'améliorer la qualité de prise en charge des personnes concernées.

Le genre *Staphylococcus*, impliqué dans plus de 50% des IOA, en représente ainsi la première étiologie. Il comprend *S. aureus*, considéré comme le principal agent pathogène, et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), dont le principal représentant est *S. epidermidis*. Longtemps considérés comme un simple commensal de la peau et des muqueuses, *S. epidermidis* est désormais reconnu comme un pathogène opportuniste majeur, notamment responsable d'infections nosocomiales et/ou sur matériel étranger [8,9]. Moins étudiés que *S. aureus*, ces SCN, et en particulier *S. epidermidis*, sont pourtant responsables de 30 à 43% des IOA sur matériel orthopédique, devançant même *S. aureus* en terme de fréquence dans certaines séries [5,10].

Les staphylocoques sont associés à des formes d'IOA particulièrement difficiles à traiter, grevées d'un fort taux de chronicité et de rechutes, notamment lorsqu'elles impliquent du matériel orthopédique. Le délai d'évolution représente alors l'un des principaux déterminants de la prise en charge, impactant le type de chirurgie et la durée de l'antibiothérapie. Un simple lavage articulaire est ainsi proposé en cas d'infection de prothèse articulaire (IPA) aiguë, alors que les formes chroniques imposent une ablation complète du matériel orthopédique [11–13]. La reconnaissance initiale du caractère chronique d'une IOA est donc un élément essentiel, actuellement arbitrairement basé sur un délai d'évolution de plus de 3 à 4 semaines au moment du diagnostic, sans qu'aucun marqueur biologique ou bactériologique objectif ne soit disponible. La chronicité des IOA staphylococciques a cependant été rattachée à trois mécanismes de virulence phénotypiques, permettant l'adaptation bactérienne à l'environnement particulier représenté par le tissu osseux (associé ou non à du matériel orthopédique), et un échappement au système immunitaire de l'hôte et à l'action des

antibiotiques [14] : i) la formation de biofilm, organisation hétérogène de bactéries entourées d'une matrice extra-cellulaire qu'elles ont elles-mêmes produite, et permettant d'implanter, de promouvoir, de structurer et de réguler la survie bactérienne dans un environnement hostile [15] ; ii) l'internalisation et la persistance des staphylocoques au sein des cellules osseuses non phagocytaires, et notamment des ostéoblastes, ce sanctuaire bactérien intra-cellulaire pouvant constituer un réservoir à l'origine de rechutes [16] ; et iii) l'évolution vers le morphotype de *small colony variant* (SCV), caractérisé par un métabolisme ralenti et une sensibilité moindre à certains antibiotiques [17].

Après une revue bibliographique sur les IOA et l'implication des relations hôte-pathogène dans la chronicité des infections staphylococciques, nous présenterons les résultats de nos travaux réalisés au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, INSERM U1111), évaluant l'impact de la formation de biofilm, de l'interaction avec les cellules osseuses et de l'évolution vers le phénotype SCV dans les IOA staphylococciques. Ces travaux fondamentaux ont été réalisés à partir des larges collections de souches cliniques de *S. epidermidis* et *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) isolées d'IOA au centre hospitalo-universitaire (CHU) de Lyon, hébergeant le CRIOAC de l'inter-région Sud-Est et le Centre National de Référence (CNR) des staphylocoques. Nous discuterons enfin des implications potentielles de ces résultats dans la compréhension de la physiopathologie des IOA staphylococciques, ainsi que dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients.

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

I. Infections ostéo-articulaires : généralités

1. Définitions et classifications

Les IOA regroupent un ensemble d'entités cliniques ayant en commun l'invasion et la destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par des microorganismes, le plus souvent bactériens. Ces infections constituent un groupe très hétérogène de situations cliniques, classées selon leur localisation anatomique, leur délai d'évolution, le mécanisme conduisant à l'infection, et la présence ou non de matériel orthopédique [1–5].

a. Localisation anatomique

L'**arthrite septique** est une infection de la cavité articulaire, le genou étant le siège le plus fréquemment impliqué [1,2,18]. Le développement bactérien dans la synovie engendre une réponse inflammatoire et le recrutement de leucocytes dans le liquide articulaire [2]. La production locale de radicaux libres, et la libération d'enzymes protéolytiques (métalloprotéases, enzymes lysosomales) et de toxines bactériennes aboutissent à la destruction du cartilage. Du fait de l'inextensibilité de la capsule limitant la cavité articulaire, l'inflammation locale provoque une augmentation de la pression intra-articulaire responsable d'une exacerbation de la destruction du cartilage et de la synovie par des phénomènes mécaniques et ischémiques. En l'absence de prise en charge rapide, une extension de l'infection à la synovie, au tissu cartilagineux, puis à l'os sous-chondral conduit à la destruction progressive de l'articulation.

L'**ostéite** se définit par l'infection du tissu osseux médullaire et/ou cortical [3,19]. Le processus infectieux initial aboutit à une réaction inflammatoire locale qui, associée à la multiplication bactérienne, entraîne des micro-thromboses vasculaires osseuses localisées. L'évolution se fait vers la formation de séquestres, zones de tissu osseux infecté et nécrotique, caractéristique de la chronicisation des ostéites (Figures 1 et 2). Ces fragments dévascularisés et détachés du tissu avoisinant sont peu accessibles aux cellules immunitaires et aux antibiotiques et se comportent comme un corps étranger inerte vis-à-vis de l'adhésion, de la colonisation bactérienne et de la formation de biofilm. Dans les formes non traitées d'ostéomyélite chronique, devenues rares dans les pays industrialisés, les séquestres osseux peuvent avoir deux destins déterminés par leur taille. Les séquestres de petite taille sont

progressivement résorbés par un tissu de granulation recruté par les signaux inflammatoires issus de la zone nécrotique. Lorsque l'étendue des séquestres est trop importante ou que la réponse inflammatoire de l'hôte est compromise, leur extension est progressivement confinée par une néoformation osseuse issue du périoste, décollée de la corticale osseuse par l'accumulation de pus qui peut également se fistuliser à la peau. Cette néoformation, l'involucre, permet d'assurer la continuité de l'os et le maintien *a minima* de sa fonction pendant la phase de convalescence. Cependant, la vascularisation inadéquate des tissus ainsi circonscrits favorise le maintien des séquestres osseux sous-jacents, aboutissant à une pathologie chronique dans laquelle le débridement chirurgical est souvent la seule option.

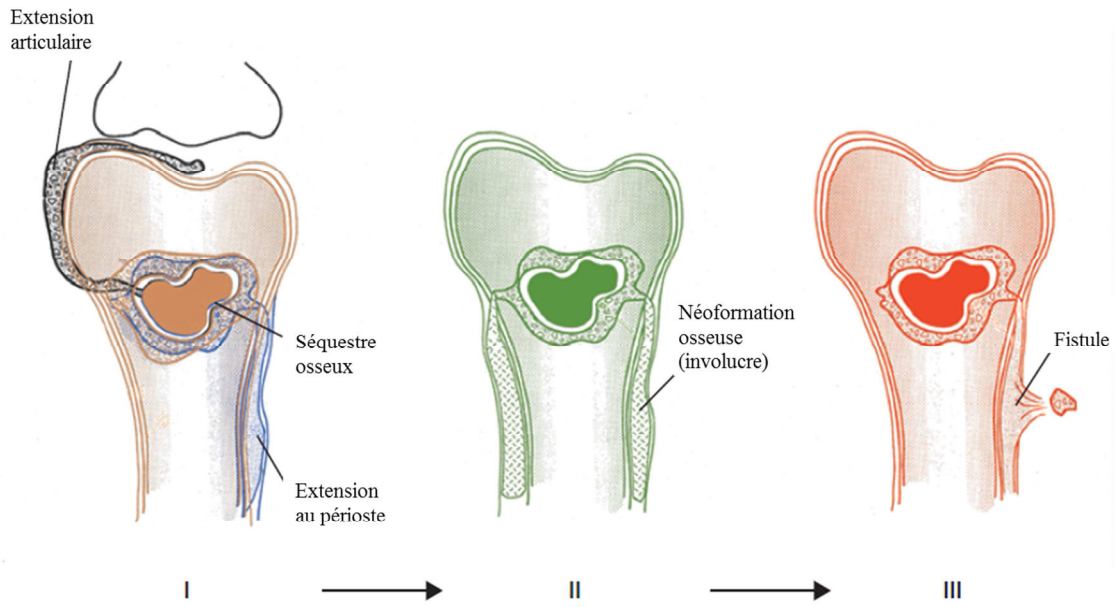


Figure 1. Evolution de l'ostéomyélite chronique, d'après [3].

Depuis un séquestre constitué, la progression de l'infection intra-médullaire vers l'intérieur de la capsule articulaire et/ou la zone périostée peut respectivement aboutir à une arthrite septique et à la constitution d'un abcès périosté (Phase I). La persistance d'un décollement du périoste conduit à la constitution d'une néoformation osseuse, l'involucre (Phase II). Enfin, l'extension de l'infection à travers l'os cortical et le périoste forme un trajet fistuleux pouvant s'aboucher à la peau (Phase III).

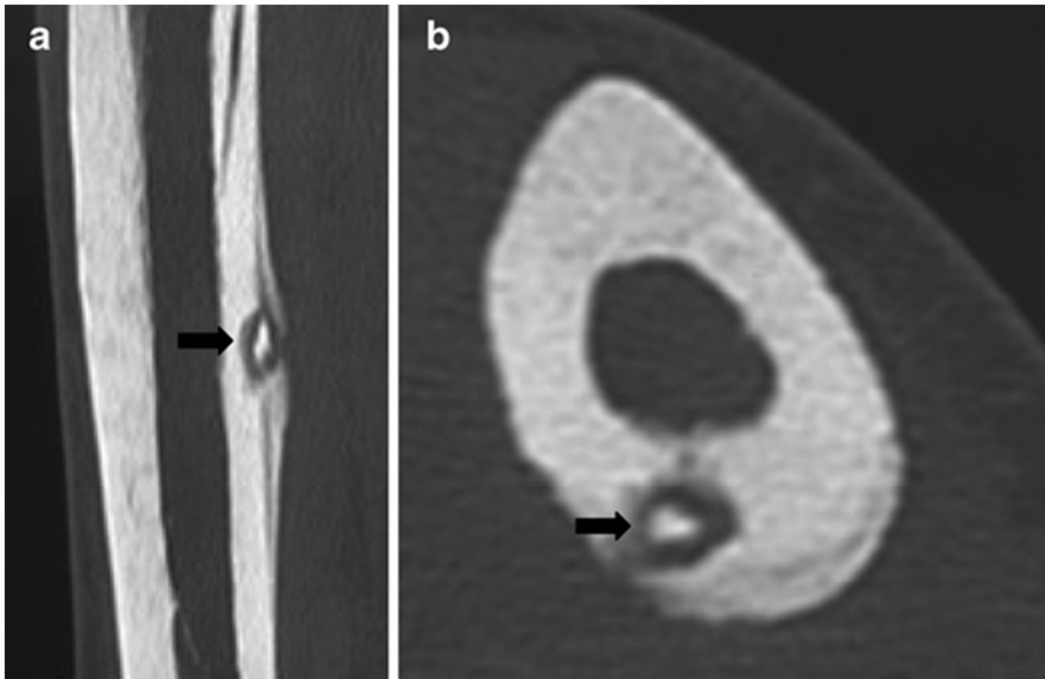


Figure 2. Scanner en coupes coronale (a) et transverse (b) montrant un séquestre intra-cortical du tibia droit chez un homme de 21 ans, d'après [20].

Le terme d'**ostéomyélite** désigne classiquement une atteinte des os longs par voie hématogène sans corps étranger, mécanisme le plus fréquent chez l'enfant. Les extrémités osseuses (métaphyses) sont alors le siège privilégié de l'infection, du fait du système de vascularisation osseuse : les artères pénétrant dans l'os au niveau diaphysaire sont distribuées jusqu'aux extrémités où elles forment des boucles vasculaires, sièges d'un ralentissement du flux sanguin favorisant la greffe bactérienne. A noter que dans la littérature anglo-saxonne, ostéite et ostéomyélite ne constituent qu'une seule entité désignée sous le terme « osteomyelitis ».
La classification de Cierny-Mader résume les différents types d'ostéomyélite en fonction du terrain, du mécanisme de survenue, et du type d'atteinte osseuse (Figure 3), et est directement liée au pronostic de ces infections [21,22].

Enfin, les **spondylodiscites** constituent une forme particulière d'ostéomyélite atteignant le disque intervertébral et les plateaux vertébraux adjacents [4,23]. Il s'agit de la localisation d'ostéomyélite la plus commune chez l'adulte. Le rachis lombaire est le plus fréquemment atteint, suivi des vertèbres thoraciques puis cervicales.

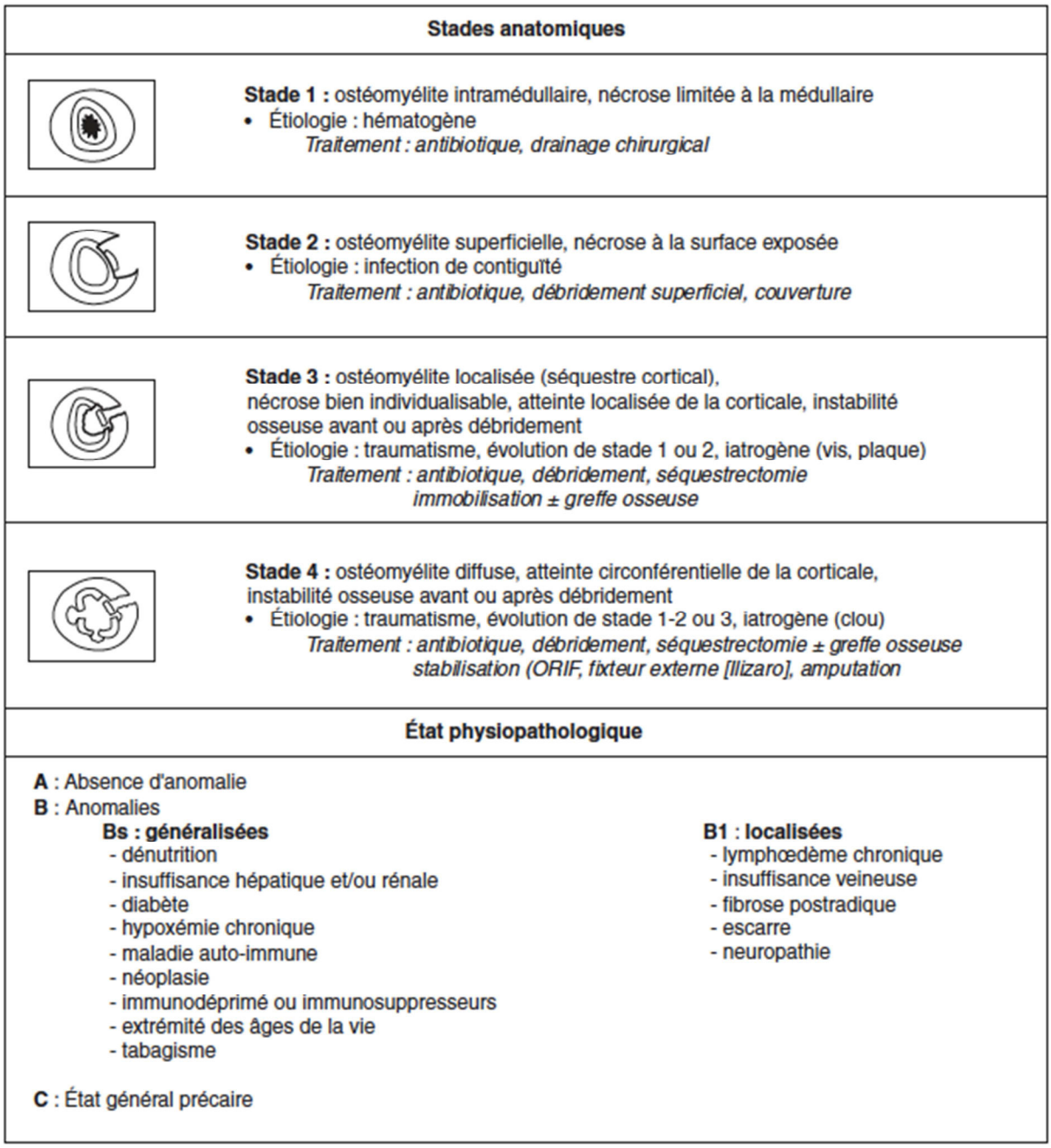


Figure 3. Classification des ostéomyélites selon Cierny-Mader, d'après [21,22].

b. Mécanisme étiologique

Les IOA peuvent résulter : i) d'un mécanisme **hématogène**, constituant alors une localisation septique secondaire au cours d'une bactériémie ; ii) d'une **inoculation** survenant lors d'un traumatisme (fracture ouverte) ou d'un geste invasif (ponction, infiltration, chirurgie) ; ou iii) de l'extension d'un foyer infectieux de **contiguïté**.

Chez l'adulte, les **IOA hématogènes** surviennent principalement chez des patients de plus de 50 ans, à l'exception des usagers de drogues intraveineuses. Les portes d'entrée cutanée,

pulmonaire, dentaire et urinaire sont les plus fréquentes. Leur survenue est liée aux facteurs de risque usuels de bactériémie, et notamment la présence d'un cathéter veineux central ou d'une sonde urinaire à demeure, l'épuration extra-rénale, l'existence d'une infection urinaire, et la drépanocytose [3]. En cas de présence d'une prothèse articulaire, le risque global de greffe septique au cours d'une bactériémie serait faible, estimé à moins de 1% [24]. Ce risque est toutefois bien plus élevé en cas de bactériémie à *S. aureus*, alors estimé à 30-40% [25–27]. Enfin, les IOA hématogènes sont généralement mono-microbiennes, alors que les autres mécanismes étiologiques engendrent plus fréquemment des infections pluri-microbiennes.

Les **ostéites sur pied diabétique** constituent une entité à part qui ne sera pas abordée dans ce travail. En effet, leur physiopathologie, associant troubles vasculaires et nerveux, phénomènes mécaniques et infection, implique une prise en charge bien particulière [28].

c. Présence de matériel orthopédique

La présence de matériel orthopédique, qu'il s'agisse de matériel d'ostéosynthèse périphérique ou rachidien ou de prothèses articulaires, augmente le risque d'IOA. Plusieurs mécanismes sont impliqués : i) l'implantation d'un matériel étranger est très rapidement suivie de sa couverture par une matrice protéique contenant notamment fibrine, fibrinogène et laminines qui favorisent l'adhésion bactérienne ; et ii) l'interaction d'un matériel étranger avec les polynucléaires neutrophiles induit un dysfonctionnement de la phagocytose, responsable d'une immunodépression locale [29]. Plusieurs modèles animaux ont ainsi démontré que l'inoculum de *S. aureus* nécessaire pour engendrer une infection est divisé par plus de 100 000 en présence d'un corps étranger [30–32].
La prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces infections sur matériel orthopédique obéit donc à des impératifs différents des IOA natives [11–13].

d. Chronologie de survenue

La durée d'évolution des IOA représente un facteur pronostic essentiel, sensé guider le type de chirurgie et la durée de l'antibiothérapie. Cependant, la définition du caractère **aigu ou chronique** des IOA n'est pas consensuelle.
Pour le clinicien, les IOA aiguës se présentent le plus souvent avec des signes inflammatoires locaux et généraux importants, alors que les IOA chroniques ne génèrent qu'un faible

syndrome inflammatoire biologique, l'absence de fièvre étant alors fréquente. Les éléments associés à la chronicité au moment du diagnostic sont l'existence d'une fistule, l'importance des lésions radiologiques et la présence de séquestres osseux rendant l'éradication bactérienne difficile du fait de l'absence de diffusion des antibiotiques dans ces portions d'os avasculaires. Pour le microbiologiste, la formation de biofilm, entité dynamique constituée d'une matrice extra-cellulaire sécrétée par les bactéries et leur permettant d'adhérer fortement aux tissus de l'hôte et au matériel, et la morphologie des colonies isolées des prélèvements profonds définissent la chronicité. Enfin, pour le chirurgien orthopédique, l'infection aiguë est celle qui serait susceptible de guérir sans ablation du matériel prothétique.

L'ambiguïté de cette classification tient à l'imprécision de l'expression clinique et paraclinique qui ne traduit pas l'aspect histologique des lésions, si bien qu'en pratique, il n'y a pas de démarcation précise entre IOA aiguës et chroniques. Le délai au-delà duquel une IOA devient chronique est très discuté et probablement très variable en fonction des situations. Toutefois, en l'absence de définition objective de la chronicité, un délai arbitraire de 3 à 4 semaines entre le début des signes cliniques et le diagnostic microbiologique est habituellement retenu pour distinguer les IOA aiguës et chroniques [11,12,33].

En cas d'infection sur matériel orthopédique, et notamment d'IPA, le délai entre la pose du matériel et l'infection permet d'orienter sur le mécanisme et l'étiologie bactérienne. En plus du caractère aigu ou chronique, se distinguent ainsi : i) les infections **précoces** survenant dans les 1 à 3 mois suivant la chirurgie, et où le mécanisme prédominant est l'inoculation *per* opératoire de germes virulents de type *S. aureus* ou bacilles à Gram négatif (BGN) ; ii) les infections du site opératoire (ISO) **retardées** (entre 1-3 mois et 1-2 ans suivant la chirurgie) généralement liées à des pathogènes moins virulents tels que les SCN (dont *S. epidermidis*) ou encore *Propionibacterium acnes* ; et iii) les infections **tardives**, survenant au-delà de 1 à 2 ans, le plus souvent d'origine hématogènes et sans lien avec la chirurgie [5,11,12].

D'autres classifications existent, dont celle de Tsukayama qui distingue les IPA post-opératoires précoces (< 1 mois), tardives (> 1 mois), hématogènes, et celles diagnostiquées devant la positivité de prélèvements bactériologiques lors d'un remplacement de prothèse présumée aseptique [34]. Enfin, la classification de MacPherson prend en compte le type d'infection, les comorbidités et le statut immunitaire du patient, et l'état de la plaie, et est directement corrélée au pronostic des IPA (Figure 4) [35,36].

Type d'infection

Type 1 : IOA post-opératoire précoce évoluant depuis moins de 4 semaines

Type 2 : IOA hématogène sur prothèse fonctionnelle indolore évoluant depuis moins de 4 semaines

Type 3 : Infection chronique évoluant depuis plus de 4 semaines

Etat de santé et immunité du patient

Type A : sans facteur de risque* et immunocompétent

Type B : compromis par 1 ou 2 facteur(s) de risque*

Type C : compromis par plus de 2 facteurs de risque* et au moins un des facteurs suivants : neutrophiles < 1000/mm^3, CD4 < 100/mm^3, toxicomanie intraveineuse, infection chronique active dans un autre site, hémopathie ou néoplasie

Etat local de la plaie associée

Type 1 : pas de facteur de risque local**

Type 2 : compromis par 1 ou 2 facteur(s) de risque local (locaux)**

Type 3 : compromis par plus de 2 facteurs de risque locaux**

Figure 4. Classification des infections sur prothèse articulaires selon MacPherson, d'après[35,36].

** Facteurs de risque liés à l'hôte : âge ≥ 80 ans, dermatose chronique, lymphœdème, sonde urinaire à demeure, dénutrition (albumine < 30 g/L), addiction nicotinique, diabète, cirrhose, traitement immunosuppresseur, néoplasie (évolutive avec chimiothérapie aplasiante), insuffisance respiratoire avec SpO_2 en air ambiant < 60%, insuffisance rénale nécessitant hémodialyse, pathologie inflammatoire systémique (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé), immunodépression (VIH, syndrome d'immunodépression acquise).*

*** Facteurs de risque liés à la plaie : cicatrices multiples, perte de substance cutanée nécessitant un lambeau, existence d'une fistule, d'un abcès sous-cutané > 8 cm^2, insuffisance vasculaire, antécédents de fracture péri-articulaire, de radiothérapie locale, d'infection active depuis plus de 3-4 mois, de dystrophie sympathique réflexe.*

2. Epidémiologie

a. Données démographiques générales

Les IOA touchent majoritairement les hommes (*sex ratio* à 1.5) d'âge moyen légèrement supérieur à 60 ans. Les patients présentent des comorbidités associées dans environ 50% des cas, représentées principalement par le diabète, les ulcères cutanés chroniques artériels ou

veineux, et l'obésité [6]. Pour les infections sur matériel orthopédique, le *sex ratio* est plus équilibré, et l'âge moyen plus élevé.

b. Fréquence et facteurs favorisants

En France, l'analyse des données du programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI) a permis d'évaluer l'incidence globale des IOA à 54.6 pour 100 000 habitants en 2008, avec une fréquence augmentant avec l'âge (Figure 5) [6]. Un tiers des cas concernait une infection sur matériel orthopédique.

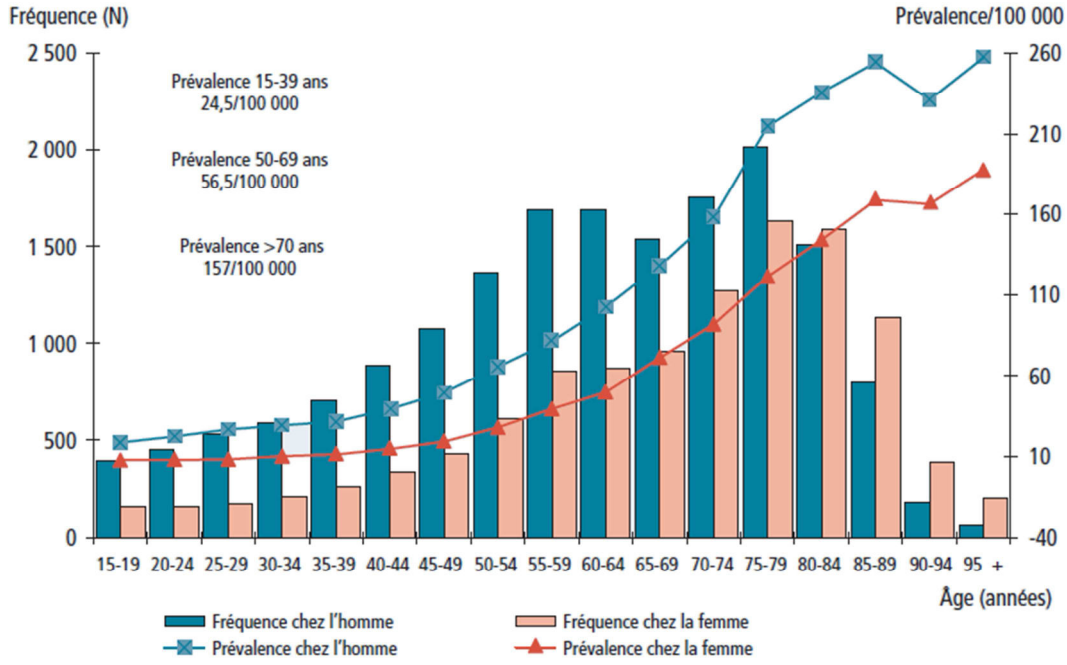


Figure 5. Fréquence et prévalence des infections ostéo-articulaires en France en 2008, d'après [6].

L'**arthrite septique** apparaît comme l'IOA la plus fréquente (53% des cas en France en 2008), avec une incidence annuelle estimée à 4-10 / 100 000 habitants [1,2,6]. Les facteurs de risque généraux d'arthrite septique comprennent un âge supérieur à 65 ans, l'existence d'une pathologie articulaire sous-jacente (notamment la polyarthrite rhumatoïde qui multiplie par 10 le risque d'arthrite septique), la présence d'une prothèse articulaire, un statut socio-économique défavorisé, la dialyse, l'utilisation de drogues intraveineuses, l'alcoolisme, le diabète, les injections intra-articulaires de corticoïdes, une chirurgie articulaire, et les pathologies cutanées (ulcères, dermatoses chroniques …) [2,37–41].

Les **IPA** représentent un problème croissant de santé publique lié à l'augmentation constante du nombre de remplacements prothétiques du fait du vieillissement de la population et de l'augmentation de la pratique des sports à haut risque traumatologique [42]. En France, plus de 100 000 prothèses totales de hanche (PTH) et 50 000 prothèses totales de genou (PTG) sont ainsi mises en place chaque année. Le nombre de prothèses articulaires mises en place a presque doublé ces dix dernières années aux Etats-Unis et au Danemark [43]. Les projections nord-américaines prévoient une augmentation de 174% du nombre de poses de prothèses articulaires d'ici 2030 [44]. D'après le réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) français, le taux global d'ISO pour les chirurgies de prothèses articulaires était de 0.8% (intervalle de confiance à 95% (IC95%) 0.5-1.1) pour la période 2006-2010. Il était évalué à 0.4% (IC95% 0.3-0.4) pour les prothèses de genou, 0.5% (IC95% 0.5-0.6) pour les PTH, et 1.1% (IC95% 1.0-1.2) pour les prothèses partielles de hanche. Ces taux sont toutefois dépendants du contexte de mise en place du matériel, les poses de prothèse articulaire en situation de chirurgie traumatologique ayant par exemple un risque d'ISO bien plus important. En plus des facteurs de risque généraux d'arthrite septique, les IPA sont également favorisées par un antécédent d'infection locale, la présence de comorbidités et notamment l'immunodépression (corticothérapie systémique, infection évoluée par le VIH, néoplasie), la dénutrition et l'obésité, la survenue d'une ISO superficielle, un temps opératoire prolongé lors de la pose de prothèse (> 2h30), et une infection récente à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) [45–50]. Une chirurgie de reprise de prothèse est associée à un risque plus élevé d'IPA qu'une arthroplastie primaire, évalué à 1.5% pour la période 2006-2011 par le RAISIN. D'une façon plus générale, l'ensemble des éléments de la classification de McPherson peuvent être considérés comme facteurs de risque d'IPA (Figure 4) [35,36].

Les **ostéomyélites** (34% des IOA) touchent préférentiellement l'enfant, avec une incidence annuelle de 10 / 100 000 [3,6]. Dans le cas particulier des poses de matériel d'ostéosynthèse, le taux d'ISO est estimé à 0.6% (IC95% 0.6-0.7) (données RAISIN 2006-2010). Les facteurs favorisants des ostéomyélites ont été regroupés dans la classification de Cierny-Mader (Figure 3) [21,22].

Enfin, les **spondylodiscites** sont plus rares (2 à 9% des IOA), avec une incidence évaluée entre 0.5 et 2.4 pour 100 000 habitants par an [4,6,51,52].

c. *Morbi-mortalité*

En France, le taux de mortalité des patients hospitalisés pour IOA a été estimé à 4.6% en 2008, représentant plus de 1 300 décès selon les données du PMSI (Figure 6) [6]. Dans cette même étude, les facteurs de risque indépendants de mortalité étaient représentés par un âge avancé (Odd ratio (OR) 5.1), la présence d'ulcères vasculaires (OR 1.9), et l'implication d'un staphylocoque (OR 1.3). Le taux global de mortalité des IPA a été estimé entre 1 et 2.7%. Dans le cas des spondylodiscites, une étude basée sur l'analyse des données du système médical informatisé japonais incluant 7 118 patients sur la période 2007-2010 a retrouvé un taux de mortalité de 6%, augmentant avec l'âge. Les facteurs de risque de mortalité mis en évidence étaient l'hémodialyse (OR 10.5), le diabète (OR 2.4), la cirrhose (OR 2.6), une néoplasie (OR 2.7), et l'association à une endocardite infectieuse (OR 3.2) [53].

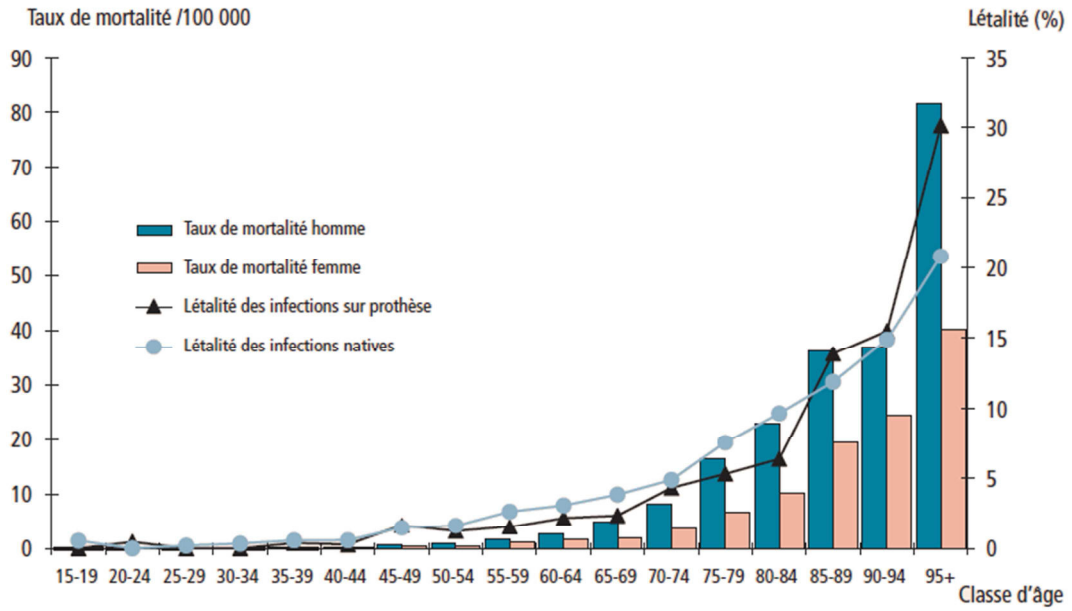


Figure 6. Taux de mortalité et de létalité des infections ostéo-articulaires par âge et sexe en France en 2008, d'après [6].

Les IOA sont grevées d'une morbidité majeure, avec un risque de séquelles fonctionnelles évalué à 30% pour les spondylodiscites, et 40% pour les arthrites septiques [1,7,54,55]. Leur impact sur la qualité de vie des patients a peu été évalué dans la littérature. Pour les prothèses articulaires, une étude australienne menée en 2008 a montré un taux global de satisfaction et de qualité de vie largement inférieur en cas d'IPA (23% de patients satisfaits du résultat) par rapport aux poses de prothèse non compliquées (80%) [56].

d. Coût

La gestion des IOA nécessite le plus souvent une approche pluridisciplinaire complexe, associant une prise en charge chirurgicale parfois lourde à une antibiothérapie prolongée initialement intraveineuse. En conséquence, ces infections nécessitent des hospitalisations prolongées (durée moyenne de chaque hospitalisation de 17.5 jours, avec nécessité d'hospitalisations multiples dans 20% des cas), notamment en cas d'infection sur matériel orthopédique et/ou de patient avec comorbidité(s) [6]. Le coût global de prise en charge d'une IPA a été évalué entre 45 000 et 80 000 euros [57,58]. En France, le coût total de la prise en charge des IOA est ainsi estimé à plus de 250 millions d'euros par an [6].

3. Etiologie bactérienne

a. Généralités

Les principales étiologies bactériennes des IOA sont résumées dans le Tableau 1 [1–6,18,19,23,40,52,59,60].

Microorganismes	**Arthrite**	**Ostéomyélite**	**Spondylodiscite**	**IPA**
Staphylocoques				50%
S. aureus	37-67%	38-67%	15-84%	34-59%
SARM	2-8%		3%	
SCN	3-16%	5-15%	10%	6-20%
Bacilles Gram négatif	7-10%		4-30%	3-6%
Streptocoques, entérocoques	10-20%		5-30%	15%
Non documenté			40%	5-15%

Tableau 1. Estimation de la répartition des agents étiologiques selon le type d'infection ostéo-articulaire.

La répartition des agents infectieux responsables d'IOA est très variable selon les études, puisque dépendante des facteurs favorisants, de la zone géographique, du type d'infection et de l'âge. Ainsi, les étiologies des IOA post-opératoires sont dominées par *S. aureus*, les SCN, et les BGN non fermentants de type *Pseudomonas aeruginosa*. Si les staphylocoques restent la première cause d'IPA, la fréquence relative de *S. aureus* et des SCN varie beaucoup selon

les études. En cas de toxicomanie intraveineuse, *S. aureus* reste le germe le plus fréquemment isolé, suivi par les SCN et *Pseudomonas*. Chez l'immunodéprimé, le diabétique, et au décours de procédures ou infections concernant les tractus digestif ou urinaire, les BGN doivent être pris en compte. Enfin, les streptocoques et entérocoques sont respectivement associés à des portes d'entrée dentaire et digestive.

b. Place du genre Staphylococcus

Staphylococcus aureus est le principal agent pathogène responsable d'IOA. Il est ainsi isolé dans environ 35 à 65% des IOA natives, dans des populations d'origines géographiques diverses, même si des variations importantes sont observées en fonction du recrutement des services. Au Royaume-Uni, les rapports de la Health Protection Agency sur la surveillance des ISO entre 1997 et 2005 ont déterminé que *S. aureus* était responsable de 41.4% des infections sur PTH, 59.1% des infections sur prothèse partielle de hanche, 33.5% des infections sur prothèse de genou, et 53% des infections après réduction chirurgicale de fracture ouverte.

Les facteurs de risque de survenue des IOA à *S. aureus* combinent les facteurs généraux de survenue d'IOA et ceux plus spécifiques d'infection à *S. aureus* incluant l'hémodialyse, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète, et les néoplasies [61]. Il faut mentionner deux spécificités supplémentaires. Tout d'abord, en présence de matériel orthopédique, le risque de greffe septique ostéo-articulaire lors d'une bactériémie à *S. aureus* est bien plus élevé (30-40%) que pour les autres agents étiologiques (< 1%), possiblement du fait des nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*, et notamment de ses multiples protéines d'adhérence [24–27]. Ceci explique probablement en partie la prédominance du mécanisme hématogène dans la survenue des IOA à *S. aureus*, et notamment des IPA [62]. Ensuite, le portage nasal permanant de *S. aureus*, détecté dans environ 20% de la population générale, représente un facteur de risque d'infection staphylococcique. En revanche, les porteurs intermittents (30% de la population) ont un risque infectieux équivalent à celui des sujets non colonisés [63,64]. S'il n'est pas clairement associé au risque général de survenu d'une IOA, le portage nasal de *S. aureus* représente un facteur de risque bien identifié d'ISO en chirurgie orthopédique, une étude récente ayant démontré la similarité des clones isolés d'ISO et de portage [65,66].

Si les **SCN** ne sont responsables que de 5 à 15% des IOA natives, leur fréquence augmente en cas d'infection sur matériel. *Staphylococcus epidermidis* est le SCN le plus fréquemment isolé, même si d'autres espèces sont parfois incriminées.

4. Diagnostic

a. Diagnostic clinique

Les IOA se manifestent classiquement par l'association de fièvre, de douleurs ostéo-articulaires d'horaire inflammatoire avec raideur et impotence fonctionnelle, et de signes inflammatoires locaux [1–5]. Dans les suites de la mise en place d'une prothèse articulaire, un écoulement par la cicatrice et/ou une anomalie de cicatrisation doivent faire suspecter une IPA précoce. Dans le cas des spondylodiscites, le syndrome rachidien (douleur, raideur et contracture des muscles para-vertébraux) est présent dans plus de 90% des cas [4,7,23]. Des déficits neurologiques médullaires ou radiculaires sont rapportés jusque dans 38% des cas. Ils sont le plus souvent en lien avec un abcès épidural ou para-vertébral, présents chez 17% et 26% des patients respectivement.

La suspicion clinique d'IOA est difficile dans de nombreuses situations.
En cas d'infection chronique, la fièvre et les signes inflammatoires locaux sont absents ou limités dans près de 40% des cas. Cependant, une fistulisation du foyer infecté à la peau peut alors exister, signant la chronicité de l'IOA. L'évolution peut alors se faire par des épisodes répétés d'abcès s'évacuant par le trajet fistuleux.
A l'inverse, dans les suites immédiates d'une mise en place de prothèse, la présence de fièvre est peu spécifique, un pic fébrile secondaire à l'intervention pouvant survenir. En revanche, l'apparition de fièvre au-delà de 5 à 7 jours après la chirurgie devient discriminante pour la suspicion clinique d'infection précoce sur matériel orthopédique [67–69].
Enfin, l'atteinte de sites « profonds » (hanche, pelvis, rachis …) conduit fréquemment à un retard diagnostic du fait de l'absence possible de signes inflammatoires locaux et de la difficulté à mesurer cliniquement l'épanchement articulaire.

b. Diagnostic biologique

Un **syndrome inflammatoire biologique**, associant hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles et élévation de la protéine C-réactive (CRP), doit être systématiquement recherché [1–5,11,12,33,70]. L'absence de syndrome inflammatoire est toutefois possible, notamment dans les IOA chroniques. A l'inverse, l'hyperleucocytose et l'élévation de la CRP sont peu contributifs en cas de suspicion d'IPA précoce, une élévation post-opératoire de CRP se normalisant en un mois pouvant être observée en l'absence de toute ISO [71]. Leur cinétique pourrait en revanche être intéressante, une réascension de la CRP ou de la leucocytose devant faire évoquer une IPA [5,11,12].

L'**examen cytologique et biochimique du liquide articulaire** obtenu par ponction apporte une aide diagnostique importante, retrouvant habituellement un liquide « inflammatoire », exsudatif, riche en protéines (> 30 g/L) et en polynucléaires neutrophiles. La numération leucocytaire a permis l'établissement de différents seuils diagnostiques, variables selon la situation clinique, de sensibilité et spécificité correctes [72–77].

c. Diagnostic radiologique

Les examens radiologiques, incluant radiographie conventionnelle, scanner et imagerie par résonnance magnétique (IRM) sont d'une aide précieuse pour le diagnostic d'IOA [78,79]. Ils recherchent des images d'ostéolyse, une réaction périostée, un épanchement articulaire, un abcès local, et d'éventuels séquestres. La place de l'imagerie fonctionnelle (scintigraphie osseuse au technétium 99m, scintigraphie aux polynucléaires marqués à l'indium 111 et tomographie à émission de positons au ^{18}F-fluorodésoxyglucose) n'est pas encore bien définie [80–82]. La sensibilité de ces examens est excellente, mais leur accessibilité est encore limitée et ils peuvent être pris en défaut pour le diagnostic des IPA précoces, du fait de l'inflammation tissulaire post-opératoire induite par le matériel et la chirurgie.

Enfin, une recherche d'endocardite infectieuse doit être envisagée par échographie cardiaque trans-thoracique et éventuellement trans-œsophagienne devant l'existence d'une cardiopathie à risque ou d'une insuffisance cardiaque, la positivité des hémocultures, et les infections à cocci Gram positif, notamment dans le cadre des spondylodiscites [83].

d. Diagnostic microbiologique

Les **hémocultures** représentent le premier moyen du diagnostic étiologique, positives dans environ 50% des IOA aiguës, permettant alors de ne pas réaliser de prélèvement profond si le(s) germe(s) isolé(s) est (sont) susceptible(s) d'engendrer une IOA. La positivité des hémocultures est bien sûr plus fréquente en cas de mécanisme hématogène, ainsi que dans certaines localisations telles que la clavicule, le pubis, et le rachis avec une sensibilité atteignant plus de 70% dans les spondylodiscites [84,85].

En l'absence hémoculture positive, les **prélèvements bactériologiques ostéo-articulaires** doivent être réalisés, dans la mesure du possible au moins 15 jours après l'arrêt de toute antibiothérapie [72,86]. Ils doivent être ensemencés sur divers milieux enrichis solides et liquides, et conservés en culture de manière prolongée (14 jours) afin de ne pas méconnaître des germes à croissance lente [87]. En cas de procédure diagnostique chirurgicale, 5 à 6 prélèvements *per* opératoires doivent être réalisés afin d'optimiser la sensibilité de l'analyse microbiologique [72]. Les cultures standard de liquide articulaire et des biopsies synoviales ou osseuses ont ainsi une sensibilité de 60 à 80% [88–90].
En cas d'ablation de matériel orthopédique, la **sonication** de la prothèse ou du matériel d'ostéosynthèse permettrait une meilleure détection des SCV et des bactéries adhérant fortement au matériel, notamment en présence de biofilm, mais n'est actuellement pas disponible dans l'ensemble des laboratoires de bactériologie [91]. Cette technique semble également améliorer la sensibilité des cultures de prélèvements réalisés sous antibiothérapie ou après une fenêtre thérapeutique inférieure à 14 jours.
L'écouvillonnage d'ulcération ou le prélèvement de fistule ne devraient plus être utilisés du fait de leur non-corrélation avec les prélèvements ostéo-articulaires profonds dans plus de 50% des cas, à l'exception de la positivité du prélèvement à *S. aureus* [92–94]. Ce point reste débattu puisqu'une étude récente a montré que la positivité de deux prélèvements de fistule successifs positifs au même germe avait une sensibilité de 94% comparée à la biopsie chirurgicale chez 77 patients porteurs d'ostéomyélite chronique mono-microbienne [95]. Ce chiffre diminuait à 79% en cas d'IOA poly-microbienne.

Enfin, les **méthodes moléculaires** (PCR universelle ou spécifiques) peuvent aider au diagnostic étiologique en cas de cultures négatives, notamment lors d'antibiothérapie préalable [96].

Au total, le diagnostic d'IOA peut être considéré si, en cas de suspicion clinique, au moins un prélèvement est positif à une bactérie n'appartenant pas à la flore commensale cutanée et pour lequel la question d'une contamination du prélèvement ne se pose pas, comme *S. aureus*, une entérobactérie ou *Pseudomonas aeruginosa*. En cas de culture positive à un germe appartenant à la flore commensale comme les SCN, *Propionibacterium acnes*, ou encore une corynébactérie, la positivité de plusieurs prélèvements concordants est exigée [11,12,33].

e. Diagnostic histologique

Les méthodes bactériologiques doivent être complétées par une analyse histologique des biopsies. La présence de signes d'inflammation tissulaire, et notamment de polynucléaires neutrophiles, a une sensibilité de 43 à 100% et une spécificité de 81 à 98% pour le diagnostic d'IOA [97,98].

f. Particularités diagnostiques des infections ostéo-articulaires staphylococciques

La présentation clinique, biologique et radiologique des **IOA à *S. aureus*** ne diffère pas des autres étiologies et ne pose généralement pas de problème, en l'absence d'antibiothérapie préalable. Il faut toutefois noter que la fréquente implication du biofilm et des SCV peut rendre difficile l'isolement bactérien, ces variants phénotypiques présentant une croissance lente en culture. Dans le cas des infections sur matériel, la sonication prendrait ici tout son intérêt [91]. La positivité d'un prélèvement de fistule à *S. aureus* pourrait constituer la seule situation où cet examen serait rentable [92]. De nombreuses méthodes moléculaires sont maintenant évaluées dans le diagnostic des IOA à *S. aureus*. Des PCR « maison » spécifiques ont été mises au point pour la détection de *S. aureus* dans les prélèvements ostéo-articulaires [99]. Des kits commerciaux tels que le GeneXpert MRSA/SA SSTI sont actuellement disponibles, pouvant détecter simultanément la présence de *S. aureus* et la résistance à la méticilline directement sur les prélèvements, et ce en moins d'une heure [100].

Le diagnostic des **IOA à *S. epidermidis*** est plus délicat. En effet, ce germe constitue une source fréquente de contamination des prélèvements, à partir des souches de portage du patient, du préleveur, et des agents de laboratoire en charge du prélèvement. Ainsi, la positivité d'au moins deux prélèvements concordants est exigée [11,12,33].

5. Prise en charge

Le traitement des IOA est particulièrement complexe, devant prendre en compte les problématiques d'efficacité, de diffusion intra-osseuse et de tolérance de l'antibiothérapie, en préservant le pronostic fonctionnel et la qualité de vie du patient. Il impose une prise en charge multidisciplinaire médico-chirurgicale longue et coûteuse.
La grande hétérogénéité des situations cliniques et l'absence d'étude contrôlée randomisée de puissance suffisante ne permettent pas de proposer un traitement standardisé des IOA. La prise en charge de ces patients se base donc sur les recommandations des sociétés françaises et internationales de maladies infectieuses visant à harmoniser les pratiques malgré le peu de données disponibles [11–13,33].

a. Traitement chirurgical

La diminution de l'inoculum bactérien est un prérequis indispensable au succès de l'antibiothérapie dans les IOA. La question de l'indication chirurgicale doit donc être systématiquement posée.

La technique à utiliser dans l'**arthrite septique sur articulation native** n'est pas clairement établie. Bien que n'étant validée par aucune étude prospective et discutable selon de nombreuses équipes, l'évacuation itérative de pus à l'aiguille par ponction a été proposée pour les arthrites périphériques atteignant des articulations superficielles (genou, épaule, coude, cheville, poignet) et pourrait donner les mêmes résultats qu'un lavage chirurgical [101]. Un lavage chirurgical est à proposer en cas d'échec des ponctions itératives, ou d'emblée en présence de facteurs de mauvais pronostic : infection chronique et/ou compliquée (abcès, ostéite associée), âges extrêmes, présence de nombreuses comorbidités, pathologie articulaire sous-jacente, et immunodépression [40,102].

Un geste chirurgical doit être systématique en cas d'**IPA**.
Pour les IPA aiguës, définies arbitrairement par un délai d'évolution inférieur à 3-4 semaines, il convient de réaliser systématiquement une arthrotomie-lavage [13]. Le succès de ce traitement dépend directement de la précocité de l'intervention par rapport au diagnostic, le taux de guérison étant d'environ 90% en cas de chirurgie dans les 10 jours suivant le début des symptômes, alors qu'il n'est plus que de 50% à 3 semaines d'évolution. Les autres

facteurs prédictifs de succès thérapeutique sont l'absence de fistule, la bonne sensibilité du germe aux antibiotiques, et une CRP pré-opératoire basse (< 15 mg/L) [103–105]. Un traitement conservateur (lavage chirurgical avec débridement de l'ensemble des tissus infectés, et conservation du matériel) est donc actuellement recommandé en cas d'IPA aiguë en l'absence de fistule, si l'intégrité des tissus mous est confirmée en *per* opératoire, et si une antibiothérapie adaptée à bonnes biodisponibilité et diffusion osseuse est disponible [13].
Dans les autres cas, l'attitude optimale consisterait en une ablation de la prothèse infectée. Selon Zimmerli et al., un changement en un temps est possible en cas d'IPA documentée en pré-opératoire à un germe sur lequel on dispose d'une antibiothérapie biodisponible et à bonne diffusion osseuse (excluant les IPA à SASM sans utilisation possible de rifampicine, à SARM, à entérocoque, à BGN non fermentant, et à levure) [5]. De plus, l'état osseux et des tissus mous ne doit pas nécessiter de greffe osseuse ou de geste de couverture. En l'absence de ces critères et si le patient peut subir deux interventions chirurgicales, les recommandations françaises et nord-américaines préconisent un changement en deux temps [11,12]. En cas d'IPA de genou, un espaceur imprégné d'antibiotique est alors généralement mis en place pour limiter les rétractions tissulaires et faciliter la repose. L'utilisation de ces espaceurs est encore sujette à débat pour deux raisons : i) le risque de persistance de l'infection sur ce matériel, notamment en cas d'infection impliquant un SARM, des SCV, ou des levures ; et ii) le risque lié à la diffusion de l'antibiotique créant un gradient de concentration pouvant favoriser l'émergence de SCV et/ou de souches résistantes [106,107]. Le délai entre les deux temps opératoires est également discuté. Une réimplantation dans les 4 à 6 semaines sous couvert de l'antibiothérapie peut être envisagée, notamment si le germe impliqué n'est pas un SARM, un entérocoque ou un BGN multi-résistant. Une alternative consiste à une réimplantation 2 semaines après l'arrêt d'une antibiothérapie de 4 à 6 semaines.
Les alternatives consistent en l'ablation définitive de la prothèse avec ou sans arthrodèse, ou à l'amputation, à réserver aux situations les plus complexes et à risque d'échec élevé.

En cas d'**ostéite**, un débridement chirurgical doit toujours être envisagé afin de mettre à plat les lésions et de retirer les tissus nécrotiques, et notamment en présence de séquestres osseux, ou d'un abcès des parties molles ou périosté. En présence de matériel d'ostéosynthèse, celui-ci doit être retiré en intégralité dès que possible, ce qui peut nécessiter, en cas d'ISO précoce, la mise en place d'un fixateur externe pour stabiliser des lésions osseuses encore non consolidées [12]. En cas de mise à plat entraînant une perte osseuse importante, le comblement se fait généralement par greffe osseuse en un ou deux temps.

Dans le cadre des **spondylodiscites**, la chirurgie est réservée aux cas de complications locales graves comme les compressions médullaires, aux abcès épiduraux ou para-vertébraux, et aux infections non contrôlées malgré une antibiothérapie adaptée [4,33]. En cas d'infection rachidienne sur matériel d'ostéosynthèse, ce dernier doit être retiré dès que possible, notamment en cas d'infection retardée (> 1 mois après la pose du matériel) [4,12]. Au total, plus de 40% des patients atteints de spondylodiscite doivent bénéficier d'une chirurgie vertébrale [23].

b. Traitement médical

A l'inverse de la majorité des infections, la sensibilité aux antibiotiques des germes impliqués ne suffit pas à prédire l'efficacité du traitement dans les IOA. En effet, de nombreux autres paramètres entrent en jeux, tels que la diffusion des antibiotiques dans le tissu osseux, et leur capacité à pénétrer et à rester actifs dans le biofilm bactérien [108].

A ce jour, le choix de l'antibiothérapie dans le traitement des IOA n'a été évalué que par un seul essai clinique randomisé, justifiant l'importance de la rifampicine dans la prise en charge des IPA staphylococciques, notamment en cas de traitement conservateur [109]. Le choix de la nature et de la durée du traitement des IOA repose donc principalement sur des études de faible niveau de preuve, regroupées dans deux méta-analyses n'ayant pu mettre en évidence d'option thérapeutique préférentielle pour ces infections [110,111].

L'antibiothérapie des IOA est généralement double, initialement intraveineuse, et prolongée. Elle repose si possible sur l'utilisation de fortes doses de molécules ayant une bonne diffusion osseuse [112]. La durée de l'antibiothérapie parentérale initiale n'est validée par aucune étude. Un relais *per os* peut être envisagé, généralement après deux semaines de traitement intraveineux, mais nécessite de disposer de molécules à bonnes biodisponibilité et diffusion osseuse, et parfaitement actives sur le germe isolé. Le développement de l'antibiothérapie parentérale à domicile reste une option de plus en plus utilisée dans les cas où un traitement *per os* n'est pas possible [75,113–115].

La durée totale optimale du traitement des IOA reste très débattue. Les durées habituellement rapportées dans la littérature sont de 6 à 12 semaines [116]. Les recommandations actuelles préconisent un traitement de 6 mois pour les IPA de genou, et de 3 mois dans les autres cas, en se basant principalement sur les résultats d'un unique essai clinique randomisé incluant 33 patients porteurs d'une IPA à *S. aureus* [11,13,109].

II. Interactions hôte-pathogène au cours des infections ostéo-articulaires staphylococciques

1. Physiologie du tissu osseux

L'os mature est constitué d'os cortical en périphérie, composé de lamelles denses de matrice minéralisée, entourant un réseau de travées osseuses ou os trabéculaire (Figure 7). Ces deux formes de tissu osseux sont constituées des mêmes éléments cellulaires, matriciels et minéraux, mais présentent des différences de structure et de fonction. L'os cortical compact joue un rôle de résistance aux forces de cisaillement, alors que l'os trabéculaire, dont les travées sont orientées le long des lignes de charge, joue un rôle de résistance à la pression.

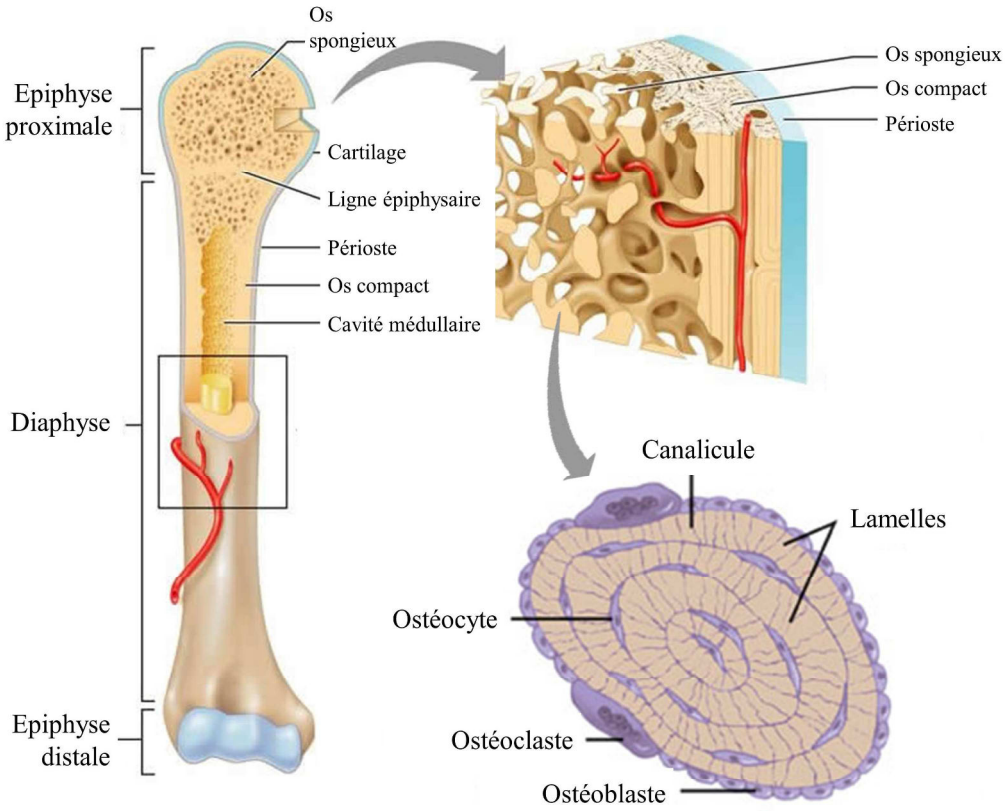


Figure 7. Structure anatomique et histologique du tissu osseux.

Le squelette dans son ensemble est un système dynamique, dans un état de renouvellement continu assuré par l'action coordonnée de deux types cellulaires, les ostéoblastes et les ostéoclastes [117]. La vitesse de renouvellement du tissu osseux est de 3 à 4 ans pour l'os trabéculaire, et d'environ 10 ans pour l'os cortical.

a. Ostéoblastes et ostéocytes

Les **ostéoblastes** sont des cellules spécialisées dans les deux composantes de l'apposition osseuse que sont la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse [118]. Ils produisent en effet les protéines matricielles usuelles des tissus conjonctifs, comprenant le collagène de type I (90%), des peptidoglycanes, des glycoprotéines telles que la fibronectine, ainsi que des protéines spécifiques du tissu osseux comme l'ostéonectine, l'ostéopontine, ou encore l'ostéocalcine. Les ostéoblastes synthétisent également une phosphatase alcaline capable de cliver les esters de phosphate, ce qui libère le phosphate libre inorganique nécessaire au processus de minéralisation, participant au dépôt d'hydroxyapatite [119].
Les ostéoblastes s'incluent progressivement dans la matrice osseuse qu'ils ont eux-mêmes produite. Les ostéoblastes n'entrant alors pas en apoptose se différencient en **ostéocytes**, jouant un rôle de coordination du remodelage osseux [120]. Ces cellules détectent le stress mécanique et entrent en apoptose, avec pour conséquence le recrutement local et la différentiation d'ostéoclastes, probablement médiés par la modification des concentrations en facteurs diffusibles sécrétés par l'ostéocyte. Un de ces facteurs pourrait être le *transforming growth factor β* (TGF-β), qui inhiberait l'ostéoclastogenèse lorsqu'il est sécrété par des ostéocytes viables [121–123].

b. Ostéoclastes

A l'inverse, les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse [124]. La fixation de ces cellules multi-nucléées à la matrice osseuse forme un compartiment fermé, la lacune de résorption, dans lequel ils libèrent de l'acide chlorhydrique permettant la déminéralisation de la matrice et l'accès des enzymes protéolytiques à ses constituants protéiques.

c. Régulation du remodelage osseux

L'équilibre de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes est indispensable au maintien de l'homéostasie osseuse et à son renouvellement. Il existe une interaction permanente entre ostéoblastes et ostéoclastes, les premiers étant capables d'interpréter différents signaux de danger et de moduler en retour la différentiation et l'activité des seconds [121]. Une des principales voies de régulation du remodelage osseux est représentée par l'interaction entre le *receptor activator for nuclear factor κB* (RANK), exprimé par les précurseurs

ostéoclastiques, et son ligand RANKL exprimé par les ostéoblastes (Figure 8) [125]. La liaison RANK-RANKL provoque le recrutement des protéines de signalisation de la classe des *tumor necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factors* (TRAF), en particulier TRAF6. La signalisation médiée par RANK et TRAF6 active plusieurs facteurs de transcription dont le *nuclear factor kappa B* (NFκB), aboutissant à la différentiation ostéoclastique. Un autre acteur majeur de la relation RANK-RANKL est l'ostéoprotégérine (OPG). Cet inhibiteur endogène du signal RANKL est synthétisé par les ostéoblastes et fonctionne comme un récepteur antagoniste, capable de fixer RANKL et d'empêcher sa liaison avec RANK. Au final, les ostéoblastes assurent la modulation de l'activité ostéoclastique via la balance d'expression de RANKL et OPG.

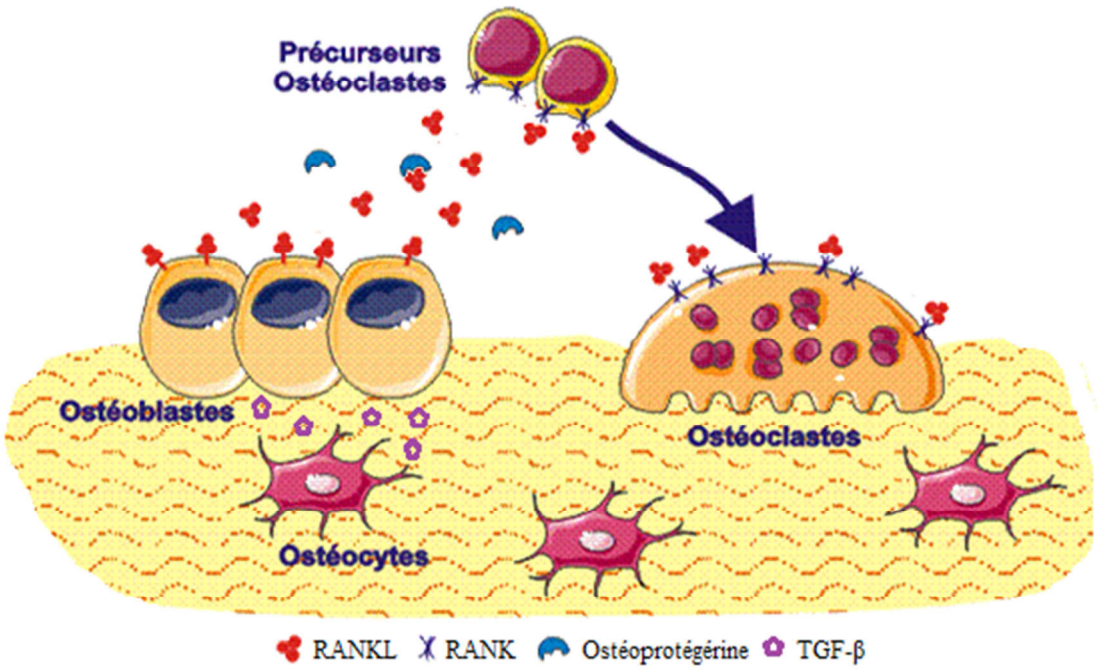


Figure 8. Régulation de l'ostéoclastogenèse par le receptor activor of NFκB ligand (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), d'après [125].

RANKL, sécrété sous formes membranaire et soluble par les ostéoblastes, stimule le recrutement et l'activation des ostéoclastes. La forme membranaire interagit avec le récepteur RANK des ostéoclastes lors d'un contact inter-cellulaire direct. La forme soluble diffuse dans la matrice extra-cellulaire et interagit avec les ostéoclastes de manière paracrine. L'OPG, également sécrétée par les ostéoblastes, peut fixer RANKL, empêchant son interaction avec RANK. Le ratio entre RANKL et OPG permet ainsi aux ostéoblastes de contrôler l'ostéoclastogenèse.

2. Infection, réponse inflammatoire et résorption osseuse

L'infection staphylococcique induit la production de nombreuses cytokines qui jouent un rôle important dans la physiopathologie des IOA en contribuant directement à la destruction osseuse (Figure 9). Les principales cytokines impliquées sont le TNF-α, l'interleukine (Il) 1β (forme sécrétée de l'Il-1) et l'Il-6 [126]. Plusieurs études observationnelles ont ainsi montré que ces cytokines pro-inflammatoires étaient présentes à de forts taux plasmatiques et intra-articulaires chez des patients atteints d'IOA staphylococciques aiguës [127,128], confirmant les données observées dans plusieurs modèles animaux [129,130]. Les mécanismes de cette augmentation locale de sécrétion cytokinique sont moins connus. Les cellules de l'immunité primaire (monocytes, macrophages) attirées au site infecté sont probablement la source principale de ce climat pro-inflammatoire. Toutefois, certaines études ont montré que les ostéoblastes pouvaient être à l'origine d'une sécrétion d'Il-1 et d'Il-6 après divers stimuli, dont l'infection par *S. aureus* [131,132]. Il a été démontré que cette sécrétion pouvait être induite par des extraits de protéines de surface de *S. aureus* et de *S. epidermidis* [133,134], via leur interaction avec des récepteurs cellulaires reconnaissant des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRRs) de la famille des récepteurs de type Toll (TLRs) et Nodd (NLRs).

Ces cytokines pro-inflammatoires déséquilibrent l'homéostasie du tissu osseux en faveur d'un excès de résorption par plusieurs mécanismes : i) elles stimulent la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques [135,136] ; ii) elles augmentent l'activité résorptive des ostéoclastes matures [137] ; iii) elles inhibent la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes [138] ; et iv) elles inhibent la synthèse des protéines de la matrice osseuse par les ostéoblastes matures, ainsi que leur activité de minéralisation [139]. Ces mécanismes passent par l'activation d'une cascade de signalisation intra-cellulaire dont certaines voies sont communes avec le système RANK-RANKL-OPG. Par exemple, le TNF-α potentialise l'activité ostéoclastogénique de RANKL. La production de TNF-α par les progéniteurs ostéoclastiques est induite par RANKL, et stimule à son tour la différentiation ostéoclastique à la manière d'une boucle autocrine [140].

Le rôle de ces médiateurs de l'inflammation a également été mis en avant par l'association de certains polymorphismes des gènes de l'Il-1 et de l'Il-6 avec un sur-risque d'IOA [141].

En plus du rôle indirect de *S. aureus* sur l'ostéoclasie via la sécrétion de cytokine induite par l'infection des ostéoblastes, *S. aureus* a également un impact direct sur les ostéoclastes, en stimulant la maturation des précurseurs ostéoclastiques en cellules matures, et en augmentant l'activité résorptive de ces ostéoclastes matures [142].

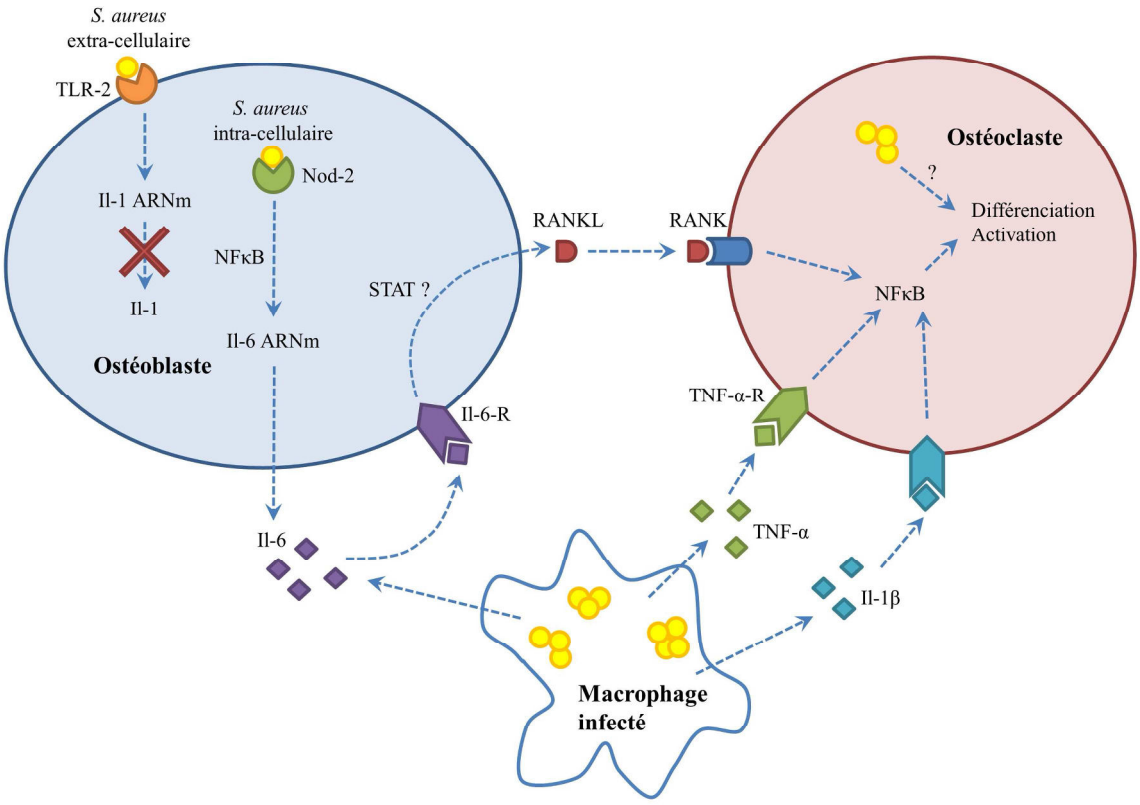


Figure 9. Voies d'activation de l'ostéoclastogenèse par les cytokines pro-inflammatoires induites par l'infection osseuse à S. aureus (source personnelle).

S. aureus est détecté par le TLR-2 exprimé à la surface des ostéoblastes. Bien que l'activation du TLR-2 s'accompagne d'une augmentation de transcription du gène de l'Il-1, la maturation vers la forme active Il-1β n'est pas détectée chez les ostéoblastes. Les bactéries intracellulaires sont détectées par Nod-2, dont l'activation conduit via NFκB à la sécrétion d'Il-6, qui stimule l'expression de RANKL. En aval, l'expression de RANKL active le récepteur RANK exprimé par les ostéoclastes et les précurseurs ostéoclastiques, stimulant ainsi la différentiation et l'activité ostéoclastique via NFκB. Cette activité est également stimulée par la sécrétion de TNF-α et d'Il-1β par les macrophages recrutés par la réponse inflammatoire locale. La différenciation et l'activité résorptive des ostéoclastes serait également stimulée directement par leur infection par S. aureus.

3. Facteurs de virulence staphylococciques

La pathogénicité des infections à staphylocoques est liée à leur capacité à coloniser les tissus de l'hôte, à proliférer et à contourner le système de défense immunitaire [143,144]. Ces mécanismes passent par de nombreux facteurs de virulence spécifiques, associés à la paroi ou excrétés, ainsi que par des facteurs phénotypiques de persistance résumés sur la Figure 10.

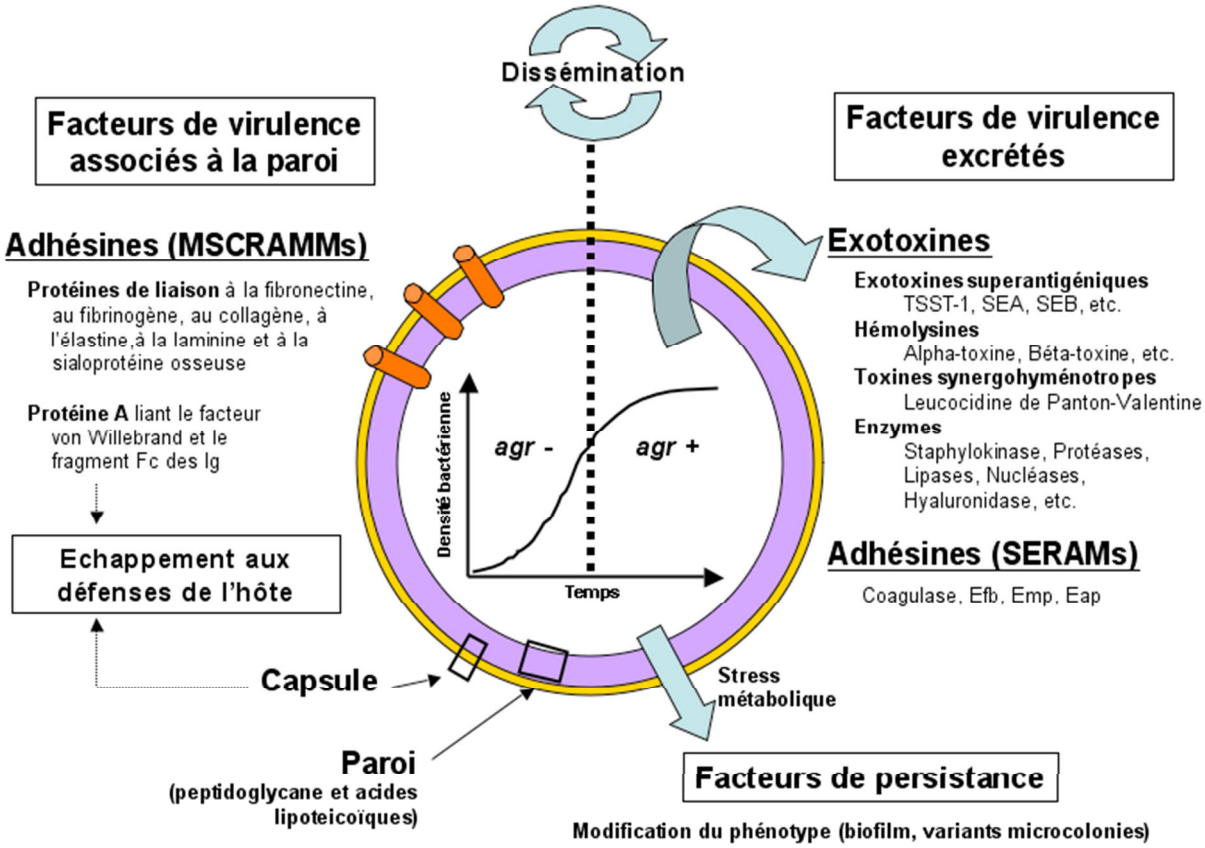


Figure 10. Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par S. aureus en fonction de la densité bactérienne, d'après [143].

a. Colonisation de l'hôte

Dans les phases précoces des IOA à *S. aureus*, l'adhérence bactérienne joue un rôle central dans la colonisation des tissus et/ou du matériel étranger. *Staphylococcus aureus* possède de nombreuses adhésines de surfaces appelées *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) liant spécifiquement de nombreux composants de la matrice extra-cellulaire incluant le fibrinogène, la fibronectine, le collagène, les laminines, les sialoglycoprotéines osseuses, et le facteur de von Willebrand [143]. Parmi ces adhésines, celle liant le collagène (*collagen-binding protein*, CNA) semble jouer un rôle primordial dans les IOA [145,146]. De même, les protéines liant la fibronectine (*fibronectin-binding proteins*, FnBP) paraissent impliquées dans les infections sur matériel orthopédique [147]. Une vaccination dirigée contre certaines de ces protéines d'adhérence pourrait même constituer un moyen de protection contre les IOA [148]. Enfin, l'adhésion bactérienne aux tissus ou au matériel étranger constitue la première étape de formation de biofilm.

b. Sécrétion toxinique

L'infection articulaire par *S. aureus* pourrait entraîner la production d'enzymes protéolytiques par les chondrocytes telles que les collagénases ou les gélatinases, libérant une activité de lyse cartilagineuse, normalement inhibée en l'absence d'infection [143,149].
Staphylococcus aureus peut par ailleurs sécréter de nombreuses toxines, dont les hémolysines alpha et gamma, et des toxines « super-antigéniques ». Leur rôle dans la physiopathologie des IOA, et notamment dans l'échappement au système immunitaire, a été démontré par plusieurs travaux de recherche fondamentale [150,151].

c. Echappement au système immunitaire

La capacité de *S. aureus* à échapper aux défenses immunitaires de l'hôte participe à la difficulté d'éradication bactérienne au cours des IOA. De nombreux mécanismes bactériens moléculaires et phénotypiques sont impliqués [152].

La **protéine A** sécrétée par *S. aureus* lie la portion Fc des immunoglobulines G à la surface des polynucléaires neutrophiles, interférant ainsi avec la phagocytose. Il a été montré que la perte d'expression de cette protéine réduisait de manière significative la virulence des souches staphylococciques [153,154]. Les **antigènes capsulaires polysaccharidiques** auraient également une activité d'inhibition de la phagocytose. Enfin, environ 60% des souches de *S. aureus* produisent des **protéines CHIPS** (*CHemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci*) se liant à certains récepteurs leucocytaires, empêchant leur recrutement vers le site de l'infection.

Certaines toxines telles que les entérotoxines ou la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) possèdent une activité dite « **super-antigénique** », induisant une puissante activation lymphocytaire T en se fixant directement aux récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II et aux récepteurs T, entraînant une libération importante de cytokines pro-inflammatoires (Il-2, interféron (IFN)-γ, et TNF-α). Il en résulte une réaction inflammatoire systémique inappropriée, responsable d'une inhibition de la réponse immunitaire adaptative (Figure 11) [155,156].

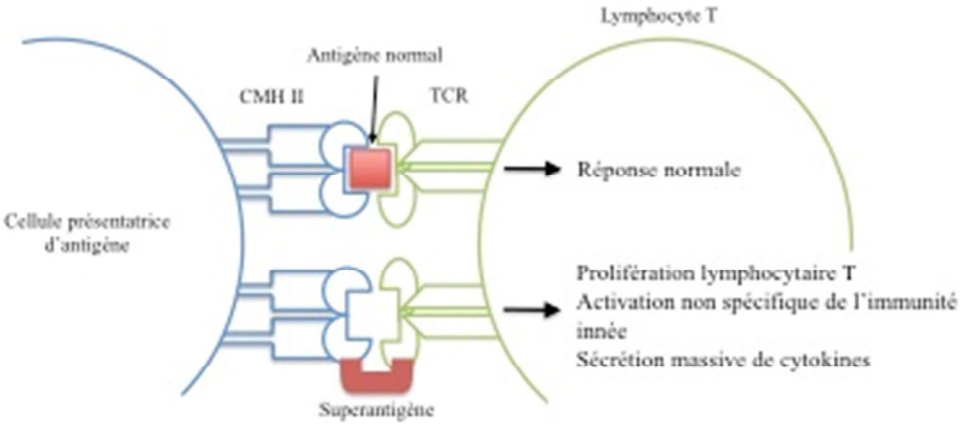


Figure 11. Schématisation du mécanisme d'action des toxines super-antigéniques (source personnelle).

Enfin, la **leucocidine de Panton-Valentine** (LPV), connue pour son implication dans des formes sévères de pneumonies nécrosantes et des infections cutanées récidivantes, semble également constituer un facteur associé à la gravité des IOA [157]. En se fixant au récepteur de la portion C5a du complément, la LPV agit en formant des pores à la surface des cellules mono-macrophagiques et des polynucléaires neutrophiles. Ces pores permettent la libération d'enzymes et de médiateurs inflammatoires responsables d'une nécrose tissulaire locale, et réduisent la capacité phagocytaire de ces cellules [158,159]. Les souches sécrétrices de LPV ont ainsi été associées à des formes particulièrement sévères d'IOA [160,161].

En dehors de ces phénomènes moléculaires, trois mécanismes phénotypiques ont été impliqués dans l'échappement au système immunitaire et la physiopathologie des IOA à *S. aureus* : la formation de biofilm, l'internalisation par les cellules non phagocytaires, et le phénotype SCV.

4. Interaction ostéoblastes – staphylocoques

L'invasion et la persistance intra-cellulaire de *S. aureus* a été décrite chez de nombreux type de cellules hôtes qualifiées de « phagocytes non professionnels » telles que les cellules épithéliales, endothéliales, ou encore les kératinocytes [162–164]. La capacité d'invasion des ostéoblastes a été démontrée par plusieurs modèles *ex vivo* utilisant des cellules osseuses de différentes espèces comme la souris, la poule et l'homme [165–168]. Une photographie en microscopie électronique de *S. aureus* intra-cellulaire est présentée en Figure 12, obtenue dans notre laboratoire en utilisant notre modèle *ex vivo* d'infection d'ostéoblastes humains.

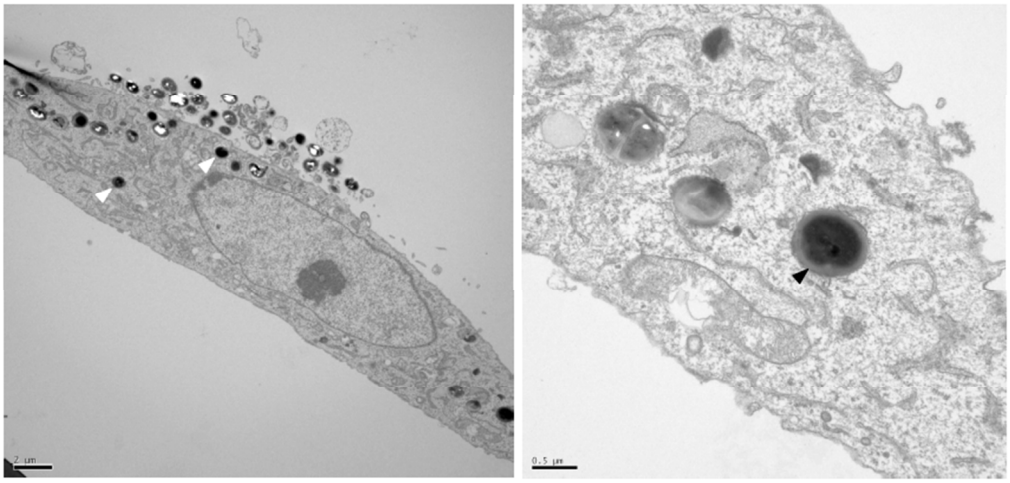


Figure 12. Photographie en microscopie électronique de S. aureus intra-cellulaires (flèches) après infection d'ostéoblastes humains de lignée MG63. Photographie Dr. Céline Dupieux.

En dehors de ces constatations *in vitro*, Bosse *et al.* ont objectivé la présence de bactéries à l'intérieur d'ostéoblastes et d'ostéocytes chez un patient souffrant d'une ostéite fibulaire chronique et récurrente (Figure 13) [169]. Bien que non formellement identifiés, la morphologie de ces cocci Gram positif était très évocatrice de *S. aureus*.

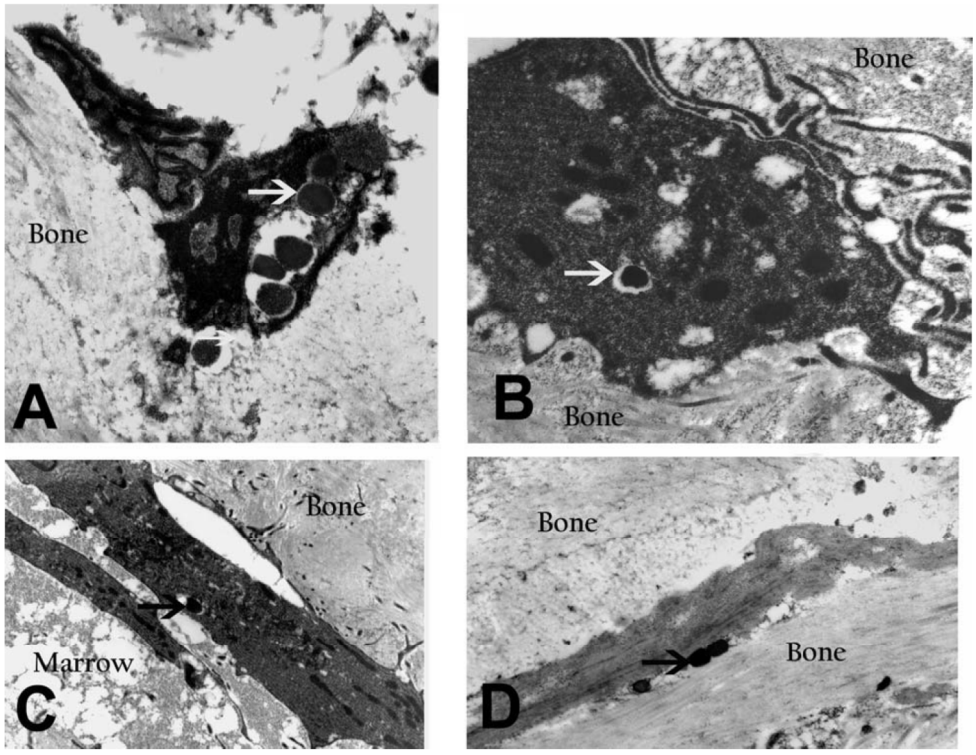


Figure 13. Visualisation en microscopie électronique à transmission de cocci intra-cellulaires au sein d'ostéocytes (A et B, x15,000) et d'ostéoblastes (C, x5,000), ou libres dans la matrice osseuse (D, grossissement x15,000, chez un patient présentant une ostéite fibulaire chronique, d'après [169].

Dans ce contexte, l'hypothèse selon laquelle le caractère intra-cellulaire facultatif de *S. aureus* fournirait à la bactérie une niche de protection, à l'abri de l'action du système immunitaire de l'hôte et de la plupart des antibiotiques, a progressivement été acceptée par une majorité d'auteurs. Elle est de plus considérée comme un phénomène explicatif plausible du caractère chronique, récurrent et indolent de certaines infections osseuses d'une part, et d'autre part du taux élevé d'échec de l'antibiothérapie [170,171].

Dans une étude récente, Kalinka et al. ont étudié 41 souches de SASM (n=27) et de SARM (n=14, dont 7 appartenant au même clone de *spa type* t149) responsables d'ostéites aiguës (évoluant depuis moins de 2 mois ; n=11) ou chroniques (évoluant depuis plus de 1 an ; n=10), de bactériémies (n=10) et de portage nasal (n=10) dans un modèle *ex vivo* d'infection d'ostéoblastes humains primaires [172]. Si l'ensemble de ces souches adhéraient à la matrice osseuse de manière équivalente, celles issues d'IOA présentaient une capacité d'internalisation par les ostéoblastes augmentée. De plus, les souches d'ostéomyélite chronique étaient moins cytotoxiques que les autres, et notamment que celles responsables d'IOA aiguës. Toutefois, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les souches d'IOA aiguës et chroniques en termes d'internalisation et de persistance intra-ostéoblastique.

Les étapes impliquées lors de l'interaction entre staphylocoques et ostéoblastes sont détaillés ci-après.

● *Adhésion de S. aureus à la cellule hôte*

L'internalisation de *S. aureus* par différents types cellulaires, dont les ostéoblastes, nécessite l'expression à la surface bactérienne de FnBP, adhésines appartenant aux MSCRAMMs [162,173,174], interagissant avec la fibronectine et l'intégrine α5β1 de l'hôte [174–176]. *S. aureus* fixe la fibronectine via les FnBP exprimées à sa surface. La fibronectine joue alors un rôle de pont entre les FnBP et l'intégrine α5β1, cette dernière agissant comme un déclencheur de la phagocytose [165,174]. Cependant, bien que la présence de FnBP soit nécessaire à une internalisation efficace, cette molécule ne rend pas compte à elle seule de l'importante variabilité des taux d'internalisation observés selon les souches de *S. aureus* [173]. Des mécanismes d'invasion indépendants de la fibronectine semblent en effet exister, puisqu'un mutant Δ*fnb*A/B de *S. aureus* est toujours capable d'envahir des kératinocytes, et cette invasion n'est pas abolie par l'inactivation de la liaison entre la fibronectine et

l'intégrine α5β1 [163]. Toutefois, Kalinka et al. retrouvent un taux plus important de souches positives pour le gène *fnb*B parmi les souches issues d'ostéites aiguës (81.8%) et chroniques (100%) que pour les souches de portage ou de bactériémies (40%) [172].

● *Internalisation de S. aureus dans la cellule hôte*

La liaison entre fibronectine et intégrine α5β1 est impliquée dans l'adhésion entre cellules eucaryotes. Ce pontage engendre une force de traction centripète du cytosquelette exercée sous la surface cellulaire par le cortex d'actine, nécessaire à la cohésion et à l'adhésion inter-cellulaire [177]. Cependant, lorsque la fibronectine n'est pas présentée de façon diffuse à la surface d'une cellule eucaryote, mais de façon très concentrée à la surface d'une bactérie, ces forces de traction centripètes sont également concentrées sur une surface réduite. En conséquence, après l'étape d'adhésion bactérienne à la surface cellulaire, apparaissent des protrusions membranaires venant recouvrir la surface bactérienne, ainsi qu'une invagination attirant la bactérie vers le cytoplasme cellulaire. La poursuite de ce phénomène aboutit à la séquestration de la bactérie dans une vacuole de membrane plasmique, désignée sous le terme de phagosome par analogie avec le phénomène de phagocytose observé chez les phagocytes professionnels, comme montré sur la Figure 14 [178].

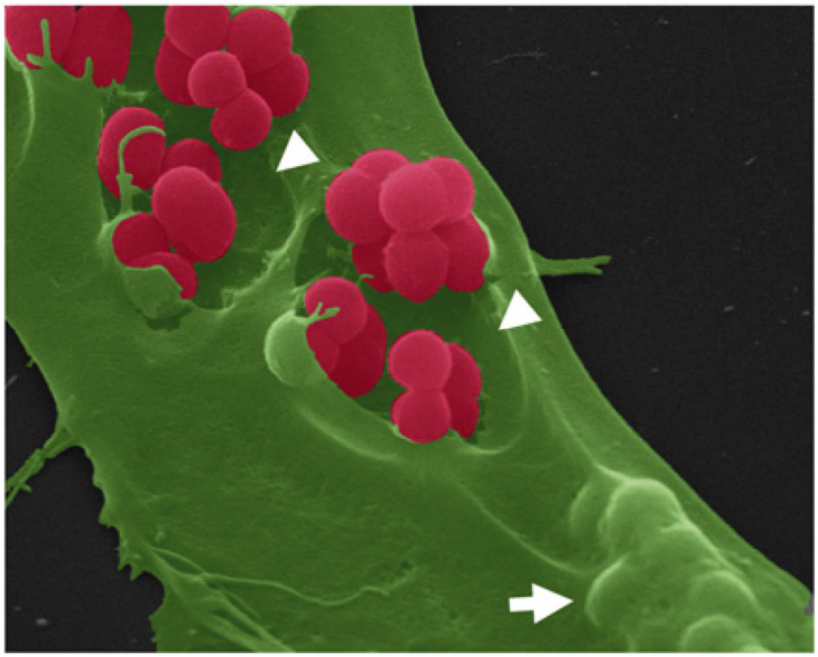


Figure 14. Visualisation par microscopie électronique à balayage de l'invasion cellulaire (vert) par S. aureus (rouge) passant par la formation de protrusions membranaires (têtes de flèche), aboutissant à l'internalisation bactérienne (flèche), d'après [178].

L'internalisation de *S. aureus* médiée par l'intégrine α5β1 est donc associée à un remodelage du cytosquelette d'actine [179]. La protéine *integrin-linked kinase* (ILK) joue un rôle de premier intermédiaire entre l'α5β1 et le cytosquelette. L'ILK interagit avec le domaine cytoplasmique des intégrines β et est activée par la liaison de l'α5β1 à la fibronectine. Cette protéine ILK est nécessaire à l'internalisation de *S. aureus* par les cellules épithéliales [180]. Son activation déclenche le recrutement de la *focal adhesion kinase* (FAK), ainsi que d'autres protéines d'adhésion focale dont la tensine, la zyxine et la vinculine [181]. FAK est ensuite activée par phosphorylation. Son action, combinée à celle des tyrosine-kinases de la famille Src, semble essentielle car des cellules inactivées pour FAK internalisent *S. aureus* de façon peu efficace. La suite du phénomène d'invasion fait intervenir la phosphorylation de substrats de FAK dont la cortactine, dont le blocage réduit également le niveau d'internalisation. Les voies de signalisation de l'intégrine α5β1, qui font intervenir l'ILK, FAK et la cortactine, jouent donc un rôle important dans l'invasion des cellules eucaryotes par *S. aureus*, tout au moins chez certains types cellulaires, et sont présentées par la Figure 15 [179,180].

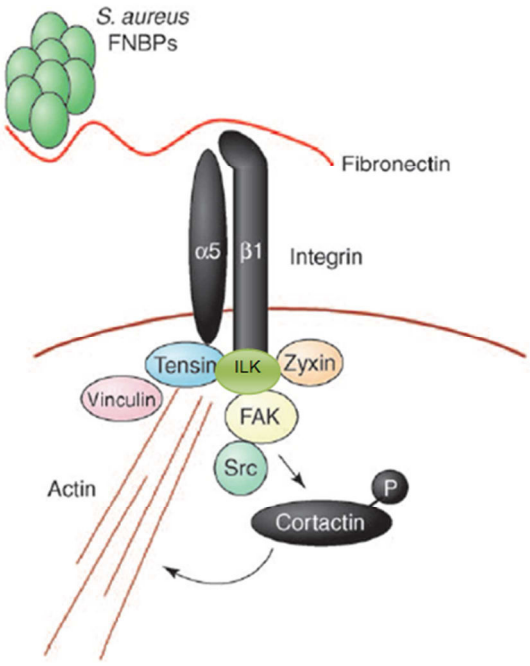


Figure 15. Mécanismes impliqué par le pontage S. aureus – fibronectine – intégrine α5β1, d'après [182].
S. aureus se fixe à la fibronectine par ses protéines de surface FnBP. La fibronectine est ensuite reconnue par l'intégrine α5β1 de la cellule hôte. La liaison de multiples molécules de fibronectine induit le regroupement des intégrines et le recrutement local, via ILK, de protéines de structure dont la tensine, la vinculine et la zyxine, ainsi que des enzymes de signalisation FAK et les tyrosine-kinases de la famille Src. L'activité combinée de FAK et Src aboutit à la phosphorylation de différents effecteurs d'aval dont la cortactine. L'impact de cette dernière sur l'invasion bactérienne est très probablement lié à l'induction de réarrangements du cytosquelette d'actine.

● *Induction de la mort cellulaire par S. aureus internalisé*

La survenue de la mort chez les cellules infectées par *S. aureus* est dépendante du type de cellule hôte, de la souche infectante et de l'inoculum bactérien utilisé. Il en va de même pour la voie de mort, apoptotique ou nécrotique, et pour les mécanismes moléculaires et surtout les facteurs de virulence de *S. aureus* impliqués dans la mort cellulaire.
Le contact direct entre *S. aureus* et les ostéoblastes déclenche l'expression chez ces derniers du *tumour necrosis factor apoptosis inducing ligand* (TRAIL) [183]. TRAIL fait partie des cytokines de la famille du TNF et se lie à deux récepteurs à domaine de mort, les TRAIL-*receptors* de type 1 et 2. L'activation de ces récepteurs déclenche le recrutement de la protéine adaptatrice *Fas-associated protein with death domain* (FADD) qui active à son tour les caspases 8 et 10. Cette activation déclenche l'engagement de la cellule sur la voie apoptotique [184]. Le facteur TRAIL sécrété par des ostéoblastes infectés par *S. aureus* déclenche aussi l'apoptose des ostéoblastes non infectés par la voie de la caspase 8 [183]. Ces observations suggèrent que l'apoptose des ostéoblastes infectés, ainsi que celle des cellules avoisinantes non infectées, participent à la perte osseuse au cours des ostéomyélites [185].
L'induction de la mort cellulaire par *S. aureus* semble dépendante de l'expression du régulateur staphylococcique majeur *accessory gene regulator* (*agr*), qui module schématiquement la balance d'expression entre les exotoxines bactériennes et les protéines de surface. En effet, les mutants Δ*agr* de *S. aureus* sont incapables de déclencher la mort des cellules infectées [186]. A l'inverse, des mutants inactivés pour le gène *staphylococcal accessory regulator* A (*sarA*), un autre régulateur de virulence de *S. aureus*, sont toujours capables de déclencher l'apoptose [186].

Enfin, chez les monocytes et polynucléaires neutrophiles humains, l'α-toxine et la LPV peuvent déclencher à elles seules la mort cellulaire [187,188].

● *Survie de S. aureus en intra-cellulaire : résistance à l'oxydation, détournement de l'autophagie et échappement phagosomal*

Une fois internalisé au sein du phagosome, *S. aureus* a développé plusieurs mécanismes visant à assurer sa survie dans la cellule-hôte, résumés sur la Figure 16.

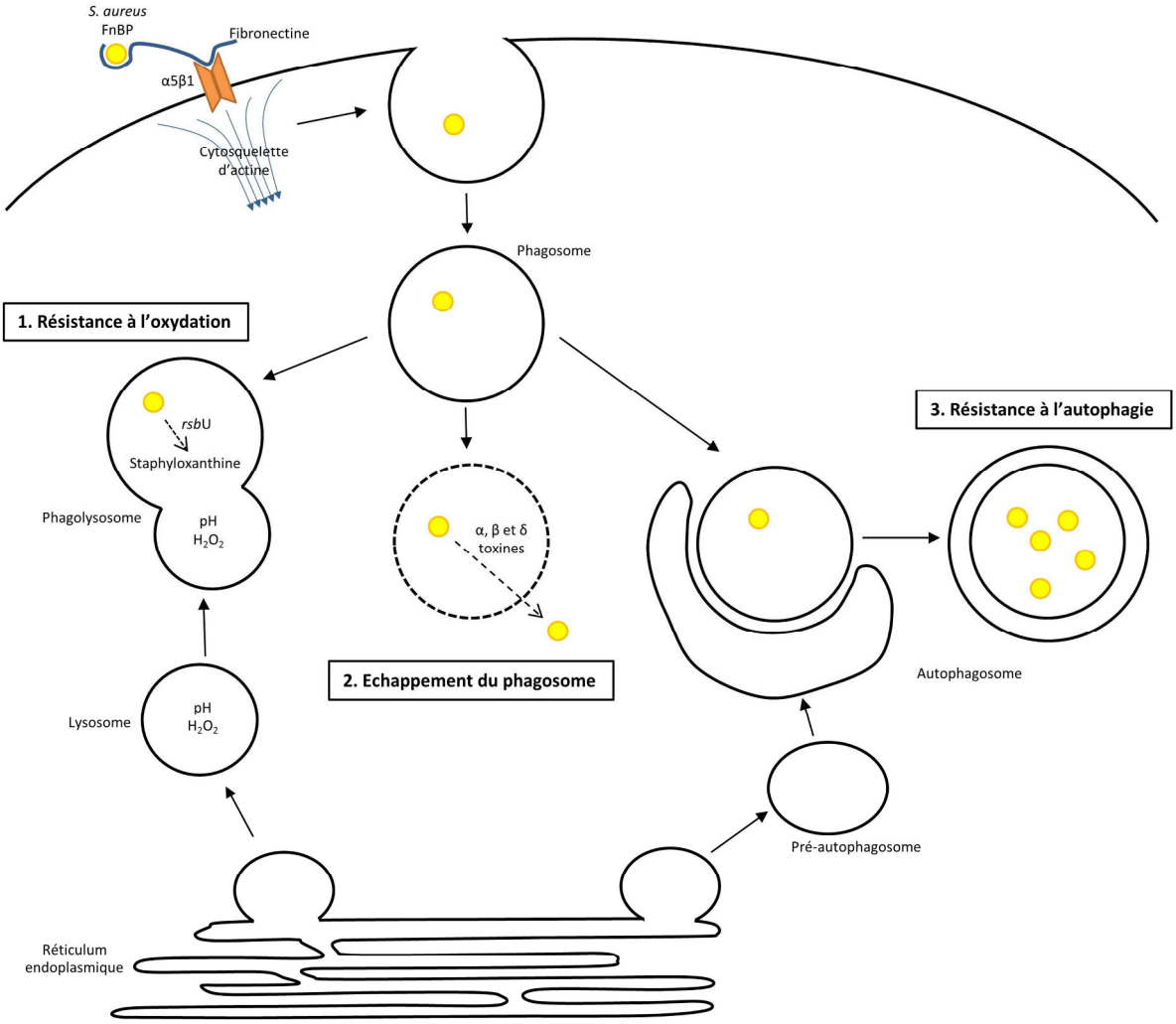


Figure 16. Mécanismes de survie intra-cellulaire de S. aureus (source personelle).

Lors de la fusion phagosome-lysosome, les premiers changements environnementaux auxquels *S. aureus* est confronté sont la diminution du pH et l'augmentation du potentiel oxydant apportée par les radicaux libres issus d'H_2O_2. Un des régulateurs de *S. aureus* impliqués dans les voies de réponse au stress, *rsb*U, a pour rôle de stimuler la production d'un anti-oxydant, la staphyloxanthine, facilitant la survie bactérienne en neutralisant l'H_2O_2 [189].

Le second mécanisme bactérien de survie intra-cellulaire est l'échappement du phagosome, initialement associé à l'expression d'α-toxine, toxine induisant des pores (*pore-forming toxin*, PFT) codée par le gène *hla* sous le contrôle des régulateurs *agr*, *sar*A et le locus *S. aureus exoprotein expression* (*sae*RS) [186]. Des travaux plus récents ont montré que d'autres toxines pourraient être impliquées, dont la β-toxine, exotoxine à activité sphingomyélinase

codée par *hlb*, et la δ-toxine, petit peptide dont le gène *hld* est porté par un des effecteurs du régulateur *agr*, l'ARNIII [190,191].

Enfin, l'autophagie constitue un mécanisme cellulaire de défense contre la survie intra-cellulaire de *S. aureus*. Ce processus, servant physiologiquement à réguler la biomasse cellulaire, peut également jouer un rôle de défense contre les pathogènes intra-cellulaires, prenant dans ce contexte le nom de xénophagie [192]. Schématiquement, ce phénomène correspond au recrutement d'une vésicule issue du réticulum endoplasmique (pré-auto-phagosome) circonscrivant la bactérie ou le phagosome contenant la bactérie pour former un auto-phagosome, siège de la destruction bactérienne avant fusion avec un lysosome. Une particularité de l'interaction auto-phagosome-*S. aureus* est l'incapacité du processus d'autophagie à tuer la bactérie. *S. aureus* n'est pas lysé par l'auto-phagosome et peut même se multiplier à l'intérieur de façon plus efficace qu'en l'absence d'autophagie, à condition de posséder un système *agr* fonctionnel [192,193].

● *Interaction de S. epidermidis avec les cellules non phagocytaires*

L'interaction de *S. epidermidis* avec les cellules-hôtes non phagocytaires a été beaucoup moins étudiée que pour *S. aureus*.

Chez l'animal, l'internalisation de *S. epidermidis* dans les cellules épithéliales a été impliquée dans la physiopathologie des mastites bovines [194,195].
Chez l'homme, l'internalisation de *S. epidermidis* dans des cellules endothéliales a également été étudiée, permettant de mettre en avant un mécanisme d'interaction basé sur une autre famille d'adhésine, les autolysines, et notamment l'autolysine Atl, qui ciblerait la protéine de choc thermique Hsc70 [196]. En effet, *S. epidermidis* n'étant pas porteur de FnBP, son adhésion et internalisation par des cellules non phagocytaires passent par des mécanismes différents de *S. aureus*, peu connus. D'autres études n'ont pu mettre en évidence d'internalisation de *S. epidermidis*, comme par exemple dans les cellules épithéliales cornéennes [197].

L'interaction de *S. epidermidis* avec les cellules osseuses n'a été évaluée que dans une seule étude utilisant un modèle cellulaire d'infection d'ostéoblastes humains de lignée MG63 [198].

Dans ce modèle, Khalil et al. ont ainsi étudié 6 souches de *S. epidermidis*, dont 2 souches de référence et 4 souches cliniques responsables d'une infection de voie veineuse centrale, d'une bactériémie, d'une péritonite, et d'une seule ostéite. Seule la souche isolée de la péritonite était significativement internalisée par les ostéoblastes. De plus, pour obtenir la même quantité de bactéries intra-cellulaires qu'avec une souche de référence de *S. aureus*, un inoculum 6 fois plus important devait être utilisé.
Enfin, alors qu'il empêchait l'internalisation de *S. aureus*, le blocage des FnBP ou de l'intégrine α5β1 par des anticorps monoclonaux n'avait aucun effet sur l'invasion des ostéoblastes par *S. epidermidis*, suggérant un mécanisme d'interaction différent.

5. Formation de biofilm

Le biofilm est défini comme une organisation hétérogène de microorganismes entourés d'une matrice extra-cellulaire qu'ils ont eux-mêmes produite, adhérant à un support vivant ou inerte. Il permet d'implanter, de promouvoir, de structurer et de réguler la survie bactérienne dans un environnement hostile [199].

La transition de l'état de croissance planctonique à la croissance en communautés sessiles est un processus dynamique qui comporte une première étape d'adhésion cellulaire au cours de laquelle on distingue une phase précoce réversible, suivie d'une phase tardive irréversible.
Il s'ensuit une étape de colonisation où les bactéries adhérées se multiplient et produisent une matrice extracellulaire qui renforce leur adhésion et leur cohésion. Chez les staphylocoques, un des composants essentiels de cette matrice est le poly-β(1,6)-N-acétyl-D-glucosamine (PNAG) ou *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA), synthétisé par des enzymes codées par l'opéron *ica* présent dans la plupart des souches cliniques issues d'infection sur matériel, et notamment sur prothèse articulaire [200,201]. Toutefois, comme discuté ci-dessus, ce polymère n'est pas indispensable à la formation de biofilm qui peut également faire intervenir des éléments protéiques tels que la protéine A, FnBPA et B ou SasG, ainsi que de l'ADN extra-cellulaire [202–205].
Une étape de développement spatial et de maturation du biofilm fait suite à la synthèse de la matrice extracellulaire. Une fois le biofilm formé, certaines cellules s'en détachent pour coloniser d'autres surfaces (Figure 17).

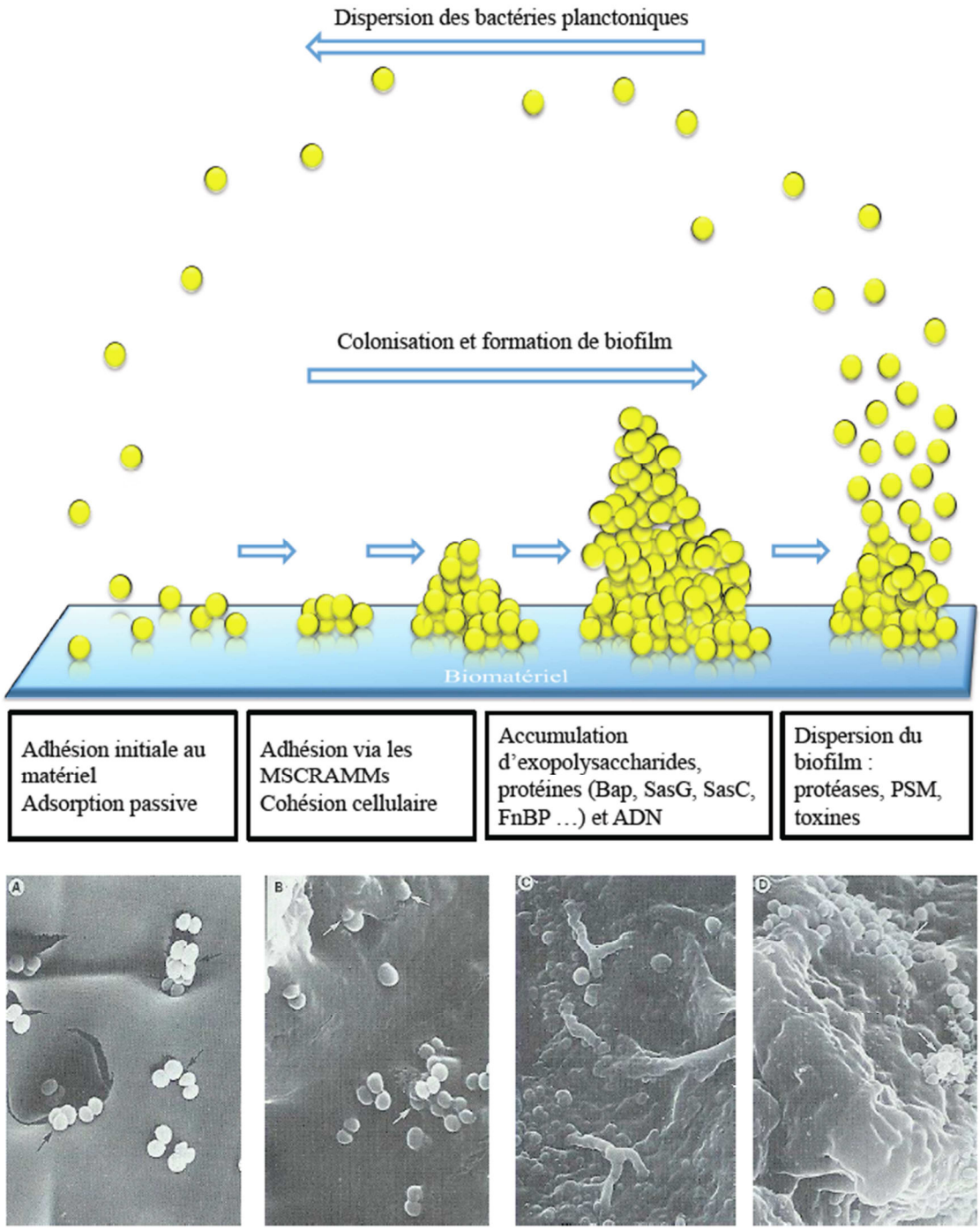


Figure 17. Schéma et photographies en microscopie électronique de la formation de biofilm sur matériel, d'après [206,207].

La communauté bactérienne constituée par le biofilm possède un système de signalisation cellulaire spécifique appelé *quorum sensing*, permettant de concentrer les nutriments dans son environnement, de favoriser leur résistance au système immunitaire et à l'action des antibiotiques, et de diffuser au sein du tissu infecté et à distance.

La capacité à former un biofilm est considérée comme un facteur de virulence majeur de nombreux micro-organismes, et notamment des staphylocoques, et serait en partie responsable de la chronicisation des IOA, en particulier des infections sur matériel orthopédique [15,208–210].

6. Small colony variants

Les SCV représentent un phénotype le plus souvent réversible caractérisé par des colonies non pigmentées, non hémolytiques et de taille environ 10 fois inférieure à celles formées par le phénotype initial. Ces caractéristiques résultent d'altérations de voies métaboliques bactériennes, dont la nature permet de distinguer deux types de SCV. Tout d'abord, les SCV déficients dans la chaine de transport des électrons sont caractérisés par un besoin de supplémentation en hémine ou en ménadione (auxotrophisme), conduisant à une diminution de production d'ATP et donc de l'activité métabolique bactérienne globale [17,211]. Un deuxième mécanisme, plus rarement identifié en pathologie humaine, est dépendant de la thymidine [212].
L'émergence de SCV résulte d'une adaptation des populations bactériennes à la pression de sélection spécifique de l'infection chronique, comme la baisse des ressources et le stress provoqué par la réponse cellulaire et/ou immunitaire. Plus spécifiquement, le phénotype SCV est particulièrement adapté à la survie intracellulaire prolongée [213]. Les SCV peuvent émerger dans diverses conditions de stress, incluant température, variations de pH ou de pression osmotique, et présence de certains antibiotiques [214]. Les bactéries présentant ce phénotype sont capables de persister dans le milieu intra-cellulaire en minimisant la réponse de défense de la cellule-hôte. Elles possèdent également une capacité accrue à envahir de nouvelles cellules par rapport aux bactéries présentant un phénotype sauvage. Dans une étude récente, Kalinka et al. ont ainsi montré à partir de 21 souches cliniques que les isolats responsables d'ostéites chroniques présentaient une capacité de survie intra-cellulaire sous forme de SCV augmentée en comparaison aux souches issues d'IOA aiguës [172]. En dehors de la persistance intra-cellulaire, un autre mécanisme supposé de l'émergence des SCV est la vie au sein du biofilm bactérien.

L'implication des SCV a été décrite dans de nombreuses situations cliniques associées à la chronicité, comme les infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose, ou encore les sinusites chroniques [17,215,216]. Concernant les IOA, des SCV ont été isolés à

partir de biofilms de *S. aureus* provenant de prélèvements de patients atteints d'ostéite et d'IPA chroniques [106,217,218]. Du fait de leur petite taille et de la nécessité de cultures prolongées sur des milieux enrichis spécifiques, le diagnostic de SCV est difficile, et leur prévalence pourrait être très largement sous-estimée.

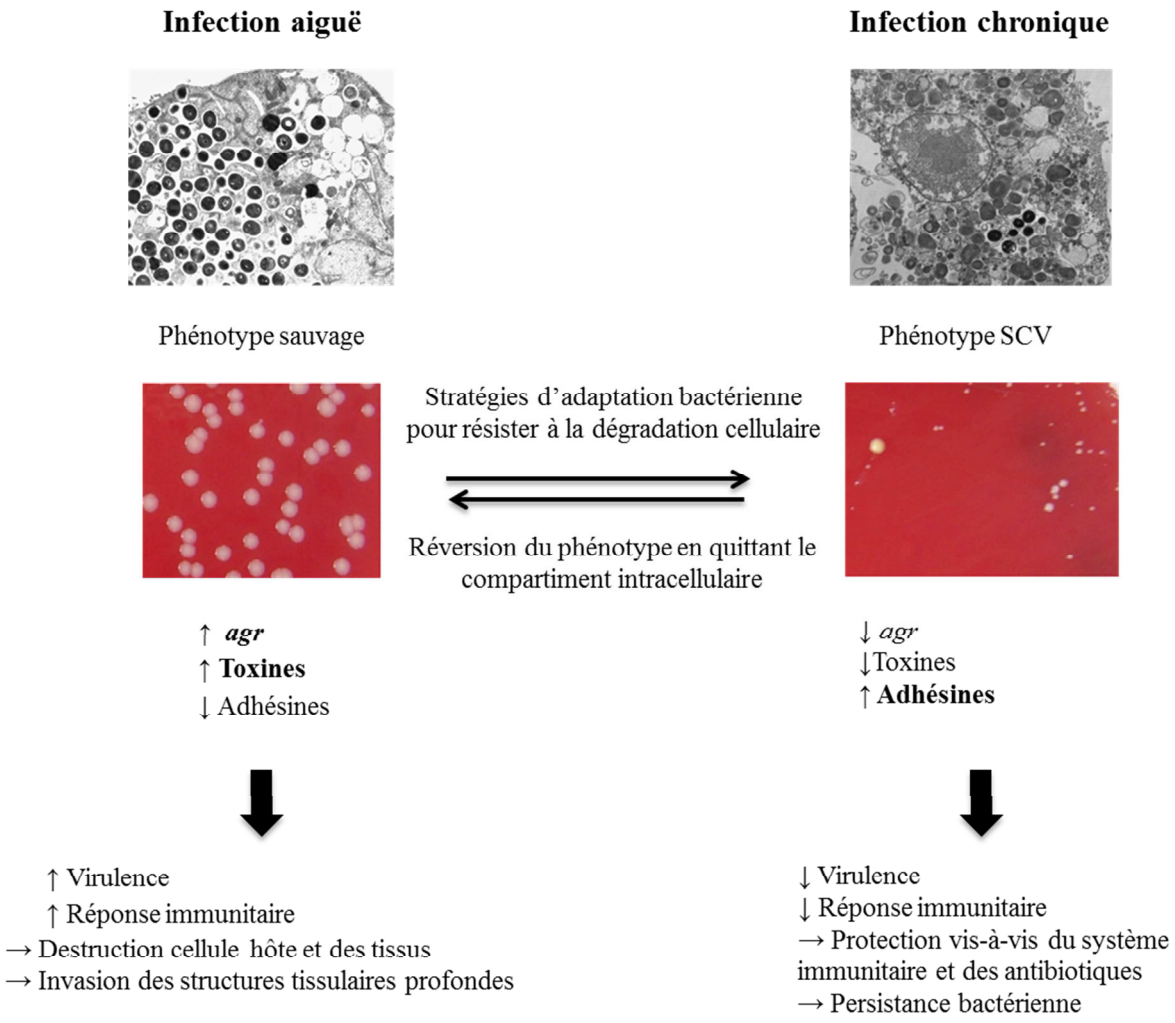


Figure 18. Mécanismes d'adaptation bactérienne au cours de la persistance intra-cellulaire, d'après [219].
Directement après l'infection, les cellules hôtes contiennent un grand nombre de staphylocoques exprimant fortement agr et les toxines qu'il régule, à l'origine de fortes réactions inflammatoires et cytotoxiques. Lors de l'infection chronique, un certain nombre de bactéries va résister à la dégradation cellulaire via des stratégies adaptatives impliquant la formation de phénotypes SCV, la régulation négative du système agr et la régulation positive d'adhésines. En quittant le compartiment intra-cellulaire, les phénotypes SCV peuvent rapidement revenir au phénotype sauvage agressif et provoquer alors une nouvelle infection.

7. De la colonisation à l'infection ostéo-articulaire

Les staphylocoques font partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses. *Staphylococcus epidermidis* est ainsi l'agent bactérien le plus fréquemment retrouvé dans les études de portage cutané, considéré comme colonisant l'épiderme de l'ensemble de la population. Le portage de *S. aureus* est moins fréquent, retrouvé de façon permanente chez environ 20% (12-30%) de la population, auxquels viennent s'ajouter environ 30% (16-69%) de porteurs intermittents [64]. En comparaison à ces taux élevés de colonisation, l'incidence des infections staphylococciques invasives apparaît faible. De nombreuses études se sont donc intéressées au rôle du portage dans la survenue d'infections invasives à staphylocoques.

Plusieurs équipes ont tenté d'identifier une association entre la présence de certains facteurs de virulence et les infections invasives à ***S. aureus***. Les études comparant les fonds génétiques des souches invasives et commensales n'ont pas pu mettre en évidence de clones de *S. aureus* plus invasifs, et notamment associés aux IOA [220,221]. En comparant les gènes de virulence de 179 souches de portage à 94 souches d'infections nosocomiales et 61 d'infections communautaires, Peacock et al. ont suggéré que certaines combinaisons de facteurs de virulence avaient un rôle dans la survenue des infections à *S. aureus* et dans leur sévérité, et notamment les gènes des adhésines *fnbA* et *cna*, des toxines *sej*, *eta* et *hlg*, et le gène *ica*, codant le PNAG, polysaccharide extracellulaire impliqué dans la formation de biofilm [222]. Deux études ont également suggéré l'importance des gènes des FnBP dans le caractère invasif des souches responsables d'IOA [223,224]. Enfin, dans une autre étude comparant les facteurs de virulence de souches de portage à des souches responsables d'ISO après chirurgie orthopédique, seul le gène de la protéine liant sialoprotéine osseuse (*bone sialoprotein-binding protein* (bbp)) était plus représenté dans les souches invasives (95.0 versus 82.5%) [225].

Le portage de ***S. epidermidis*** étant universel, la mise en évidence d'éléments permettant de distinguer les souches pouvant être invasives et pathogènes parmi celles colonisant la peau et les muqueuses apparait encore plus important que pour *S. aureus*. Des études se sont focalisées sur certains facteurs de virulences potentiellement candidats, alors que d'autres ont utilisé des approches pan-génomiques [226,227]. Les deux principaux facteurs ainsi identifiés sont l'élément mobile IS256 et le gène *ica*. Il a été proposé qu'IS256 puisse contribuer à l'adaptation génétique de *S. epidermidis* et jouer un rôle dans l'infection, par insertion au sein

de certains locus en bloquant leur expression, comme le locus *agr* (régulateur global de la virulence). L'opéron *ica* a quant à lui été mis en évidence dans 81.5% de 54 souches de *S. epidermidis* isolées chez 14 patients atteints d'infections de prothèses articulaires, alors que seulement 17.4% de 23 souches commensales en étaient porteuses ($p < 0.01$) [228]. Cependant, il a été montré que les souches ne possédant pas *ica* peuvent former du biofilm via d'autres protéines d'adhésion telles que BAP (*biofilm-associated protein*) ou AAP (*accumulation-associated protein*) [229]. Il a finalement été montré par des approches pan-génomiques que les souches invasives et commensales de *S. epidermidis* ne pouvaient être distinguées sur la base de leurs facteurs de virulence [230]. En effet, la plupart de ces facteurs de "virulence" jouent avant tout un rôle dans le maintien de l'espèce à l'état de commensal. Par exemple, on peut facilement imaginer l'importance de PNAG et des autres protéines impliquées dans la formation de biofilm dans l'environnement cutanéo-muqueux où les bactéries sont soumises à des forces mécaniques importantes. De la même manière, aucune différence n'a été observée entre les souches de portage et les souches invasives quant aux adhésines, reflétant là encore probablement leur importance aussi bien dans la colonisation que dans l'infection [8]. Toutefois, une étude récente comparant des souches de SCN issues de bactériémies et d'IOA a suggéré que si la capacité formation de biofilm serait une caractéristique importante des souches issues de bactériémies, certaines adhésines telles que Bap ou Aap pourraient être associées aux souches invasives ostéo-articulaires [231].

Enfin, aucune étude n'a évalué le caractère discriminant entre souches commensales et invasives des caractéristiques phénotypiques associées aux IOA, et notamment de la capacité de formation de biofilm, d'interaction avec les cellules osseuses, et de switch vers le phénotype SCV.

8. Régulation de l'expression des déterminants de la virulence chez *S. aureus*

La virulence chez *S. aureus* repose sur l'expression de protéines membranaires et d'exotoxines dont certains représentants majeurs ont été décrits au cours des chapitres précédents (Figure 10). Les niveaux d'expression de ces déterminants de virulence sont contrôlés par un réseau complexe et interconnecté de régulateurs [232]. Ces régulateurs permettent à la bactérie d'adapter sa virulence en fonction des conditions environnementales et de sa phase de croissance.

Bien qu'il existe plus de vingt régulateurs décrits chez *S. aureus*, nous ne présenterons ici que les régulateurs d'importance majeure pour l'expression des exotoxines et des FnBP : *agr*, *sar*A et *sae*RS.

a. Système agr

Le système *agr* est le principal régulateur de *S. aureus*, représentant un système de *quorum sensing* à deux composants (senseur membranaire et effecteur) codant son propre facteur d'activation, le peptide auto-inducteur.

Lors de la phase exponentielle de croissance, la faible densité bactérienne s'accompagne d'une faible concentration en peptide auto-inducteur et donc un bas niveau d'activité *agr*. Lorsque la densité bactérienne augmente, *agr* est activé via l'augmentation de la concentration en peptide auto-inducteur, marquant le passage en phase stationnaire au cours de laquelle les ressources disponibles peuvent venir à manquer [232]. Le système *agr* réprime la transcription de différentes protéines membranaires, et notamment des FnBP et de la protéine A, et active l'expression d'exotoxines telles que l'α-toxine et la β-toxine. Ainsi, l'expression d'adhésines de surface est importante lors de la phase initiale de croissance pour permettre la colonisation. L'activation d'*agr* stimule ensuite l'expression de toxines associées à la destruction tissulaire et à la libération de nouvelles ressources pour la bactérie.

Le locus *agr* comprend cinq gènes, *agr*A, *agr*B, *agr*C, *agr*D, et *hld*, portés par deux produits de transcription, les ARNII et III, chacun sous le contrôle de leur propre promoteur, respectivement P2 et P3 [233]. L'ARNII porte les cadres de lecture des protéines AgrA à D. AgrD est le précurseur du peptide auto-inducteur, excrété par le transporteur membranaire AgrB. AgrC est un senseur membranaire activé par le peptide auto-inducteur. AgrC active AgrA par phosphorylation, alors que ce dernier active alors le promoteur P3 et la transcription de l'ARNIII. Cet ARN régulateur est l'effecteur final du système *agr*. Bien que majoritairement non traduit, il porte cependant un court cadre de lecture codant la δ-toxine ou δ-hémolysine, laquelle n'est pas impliquée dans la régulation. Bien que la majorité des effets transcriptionnels et post-transcriptionnels du système *agr* soient imputables à l'action de l'ARNIII, la protéine AgrA possède également une cible en dehors du promoteur P2, activant la transcription d'exotoxines protéiques analogues à la δ-toxine, les *phenol-soluble modulins* (PSM) [232]. Une vue d'ensemble du système *agr* est représenté en Figure 19.

La dysrégulation du système *agr* a été associée à des formes récurrentes d'infections staphylococciques. Par exemple, dans une étude menée en 2004, la proportion de patients porteurs d'une souche de SARM déficiente en *agr*, détecté par l'absence de production de δ-hémolysine, était plus importante en cas de bactériémie persistante (71.4%) que ceux stérilisant rapidement leurs hémocultures (38.9%) [234]. De plus, la dysrégulation d'*agr* semble être un facteur indépendant de mortalité en cas de bactériémie à *S. aureus* [235]. Enfin, dans une étude menée en 2012 dans notre laboratoire, la mise au point d'une technique de détection de la dysrégulation du système *agr* par l'absence de détection de la δ-hémolysine en spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) a également permis de confirmer que cette dysfonction d'*agr* était associée à la chronicité de plusieurs types d'infections staphylococciques, incluant bactériémies, ISO (hors orthopédie), infections sur matériel endo-vasculaire (et notamment sur cathéter), infections respiratoires chez des patients atteints de mucoviscidose, et ostéite sur pied diabétique [236].
Un des mécanismes explicatifs pourrait être une capacité augmentée de formation de biofilm des souches *agr* déficientes [237,238]. Il a même été suggéré que des inhibiteurs de *quorum sensing* tels que RIP pourraient être utiles au traitement des infections staphylococciques associées au biofilm [239].

b. Régulateur sarA

La protéine SarA est encodée par trois produits de transcription différents situés sur l'opéron *sar*A et possédant chacun leur propre promoteur [240]. Chaque promoteur est activé par un facteur σ différent, dont σ^B, ce qui permet à SarA d'être exprimée à toutes les phases de croissance. Ce régulateur active de nombreux promoteurs en se liant à des séquences d'ADN spécifiques, désignées sous le terme de *Sar boxes*. Des *Sar boxes* sont présentent sur les promoteurs P2 et P3 d'*agr*, ainsi que sur les promoteurs de la protéine A, des FnBP, de l'α-toxine et de la β-toxine [241,242].

c. Régulateur saeRS

Le locus *sae*RS code un système à deux composants, SaeR (régulateur) et SaeS (senseur), régulant positivement la transcription de l'α-toxine, de la β-toxine, de la coagulase, de la protéine A et de la DNAse. Cette régulation est de nature directe et ne fait pas intervenir de

modification du niveau d'expression d'*agr* ou du régulateur *sar*A [243,244]. La nature du ligand de SaeS reste inconnue à ce jour.

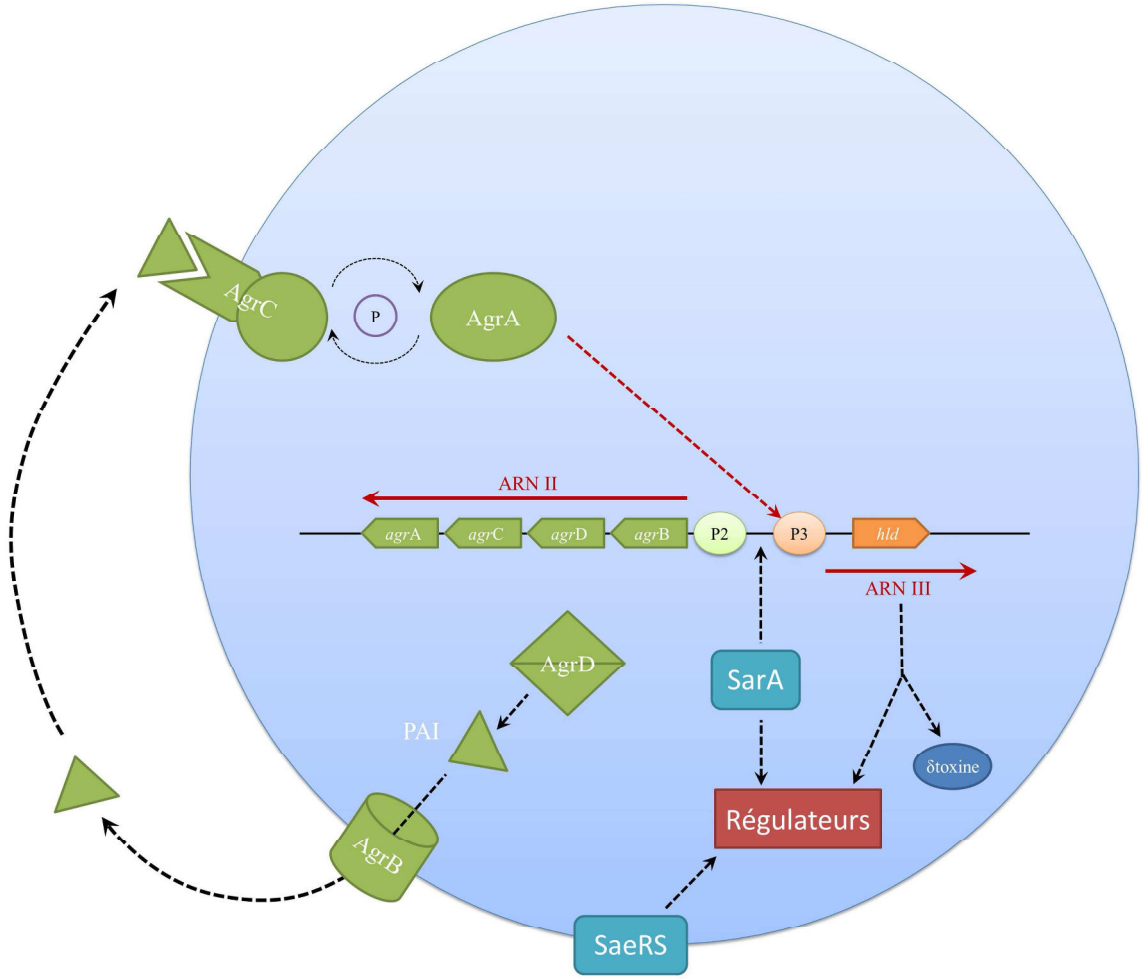


Figure 19. Vue d'ensemble des systèmes de régulation de l'expression de la virulence chez S. aureus, incluant les systèmes agr, SarA et SaeRS (source personnelle).

III. Antibiothérapie des infections ostéo-articulaires staphylococciques

1. Spécificité de l'antibiothérapie des infections ostéo-articulaires staphylococciques : recommandations actuelles

La **pénicilline G** ne fait actuellement plus partie des armes thérapeutiques contre *S. aureus*. En effet, son utilisation au début des années 1940 a conduit à l'apparition, une dizaine d'années plus tard, de souches résistantes à la pénicilline en lien avec la production d'une pénicillinase plasmidique. Cette enzyme a rapidement diffusé dans la population des staphylocoques et est actuellement portée par plus de 90% des souches. Pour faire face à la diffusion de ces souches de *S. aureus* sécrétrices de pénicillinase, les **pénicillines M** ont été introduites en Europe en 1959-1960 d'abord sous la forme de méticilline, puis d'oxacilline et de cloxacilline qui constituent encore actuellement l'antibiothérapie de référence des infections à SASM. La diffusion intra-osseuse des pénicillines est médiocre, les concentrations intra-tissulaires représentant moins de 20% des concentrations plasmatiques, rendant nécessaire l'utilisation de posologies élevées [112].

Les premières souches de SARM sont apparues un an après l'introduction des pénicillines M.

La résistance à la méticilline passe par l'acquisition du gène *mecA*, porté par la cassette chromosomique SCC*mec* qui code une protéine de liaison aux pénicillines (PLP) modifiée, la PLP2A, présentant une très faible affinité pour les béta-lactamines. Elle confère ainsi une résistance à l'ensemble des béta-lactamines, à l'exception des nouvelles céphalosporines anti-staphylococciques comme la **ceftaroline** [245,246]. Les souches de SARM représentent actuellement 20.1% des isolats de *S. aureus* en France [247].

Les **glycopeptides**, représentés par la vancomycine et la téicoplanine, constituent l'antibiothérapie parentérale de choix dans le traitement des SARM mais font preuve d'une bactéricidie lente et leur diffusion intra-osseuse est similaire à celle des pénicillines avec, semble-t-il, une meilleure diffusion de la téicoplanine [112]. Leur utilisation en cas de SASM doit donc être évitée. En effet, elle a été identifiée comme facteur de risque d'échec du traitement et de persistance des bactériémies à SASM [248,249]. L'impact de l'utilisation des glycopeptides dans d'autres infections à SASM a peu été étudié. Dans une étude incluant 246 patients porteurs d'une IOA à *S. aureus* (dont 237 SASM et 9 SARM), le taux d'échec était significativement plus élevé chez les patients traités par vancomycine (53%) que ceux recevant une pénicilline M (28.6%, p=0.03), l'utilisation d'un glycopeptide étant retenue par les auteurs comme un facteur de risque d'échec du traitement des IOA à SASM (odd ratio

(OR) 2.8 ; IC95% 0.99-7.2 ; p=0.058) [250]. Les alternatives aux glycopeptides sont représentées par le **linézolide**, la **daptomycine**, la **tigécycline** et les nouvelles céphalosporines anti-staphylococciques, dont la maîtrise de l'utilisation dans le traitement des IOA est encore limitée [246,251].

Les **associations à base de rifampicine** sont connues pour leur excellente activité sur les bactéries à croissante lente et/ou productrices de biofilm [109,252]. L'association aux **fluoroquinolones** semble particulièrement intéressante du fait de la bonne biodisponibilité de ces deux molécules et de leur bonne diffusion osseuse [70,112,109,253,254]. En cas d'impossibilité d'utiliser les fluoroquinolones, l'association de la rifampicine avec d'autres anti-staphylococciques *per os* ont montré de bons résultats, notamment avec l'acide fusidique, le cotrimoxazole, ou le linézolide [255,256]. A noter que l'intérêt de la **clindamycine** dans le traitement des IOA à *S. aureus* pourrait être limité par son interaction avec la rifampicine. Les bons résultats de cette association mentionnés dans la littérature sont contrebalancés par la constatation de concentrations plasmatiques de clindamycine basses, imposant la réalisation de dosages plasmatiques réguliers [257]. Les données d'efficacité et de bonne tolérance de la **pristinamycine** dans le traitement des IOA ne reposent que sur deux études rétrospectives incluant 21 et 27 patients, ne permettant pas de la retenir dans les recommandations thérapeutiques actuelles [258,259]. Enfin, la **fosfomycine** est caractérisée par une bonne pénétration osseuse [112]. Son utilisation dans les IOA à staphylocoque semble intéressante, notamment pour les formes pédiatriques d'ostéomyélites, et en association avec une céphalosporine de troisième génération [260].

En pratique, les recommandations françaises et internationales préconisent une double antibiothérapie initialement intraveineuse par pénicilline M ou glycopeptide, en association avec un aminoside puis avec une seconde molécule à bonne diffusion osseuse [11–13,33]. En présence de matériel, l'utilisation de rifampicine doit alors être favorisée. La durée du traitement intraveineux peut être limitée à 2 semaines, mais doit être prolongée 4 à 6 semaines en cas d'IPA à *S. aureus* si la rifampicine ne peut pas être utilisée et/ou si le matériel n'a pas été retiré en totalité. Un relais per os peut ensuite être entrepris, en associant deux molécules à bonne diffusion osseuse telles que la rifampicine et les fluoroquinolones. Les alternatives validées sont représentées par la clindamycine, l'acide fusidique, et le cotrimoxazole. Les autres molécules anti-staphylococciques ne doivent être réservées qu'aux situations les plus complexes (multi-résistance, intolérances multiples du patient).

2. Implication des mécanismes physiopathologiques dans le choix de l'antibiothérapie

a. Action anti-biofilm des anti-staphylococciques

La notion de « résistance » des biofilms aux antibiotiques est basée sur la comparaison d'efficacité des antibiotiques sur les bactéries incluses dans un biofilm avec leurs homologues planctoniques. Il est en fait plus exact de parler de « tolérance » plutôt que d'une véritable « résistance ». Les mécanismes impliqués sont en effet de nature phénotypiques (adaptation des bactéries à la vie en biofilm), non basés sur des modifications génétiques, et donc réversible.

La faible efficacité des antibiotiques au sein du biofilm ferait intervenir plusieurs mécanismes : i) le biofilm constitue une barrière physique empêchant la diffusion des antibiotiques vers les bactéries ; ii) certaines enzymes matricielles sont capables de les inactiver ; et iii) le biofilm est le siège d'une division et d'un métabolisme bactériens ralentis, pouvant aboutir à une différenciation de certaines bactéries vers le phénotype de SCV [252,261].

La structure et la composition de la matrice du biofilm staphylococcique incitent à proposer que cette biomasse pourrait jouer un rôle de barrière à la diffusion des molécules anti-bactériennes, du fait d'interactions électrostatiques entre la matrice et l'antibiotique comme démontré pour les aminosides [262], ou encore de la viscosité de la matrice limitant la diffusion des glycopeptides [263].

La stratification de l'activité métabolique bactérienne au sein des biofilms a bien été montrée pour *S. epidermidis*, les cellules plus actives se trouvant principalement à l'interface entre le biofilm et le milieu externe [264]. Le faible métabolisme des bactéries des couches plus profondes est proposé pour expliquer l'insensibilité des biofilms aux β-lactamines, agissant principalement sur des cellules en division [265,266]. Ainsi, les SCV isolés à partir de biofilms de *S. aureus* provenant de prélèvements de patients atteints d'ostéite et d'IPA chroniques sont résistants à plusieurs antibiotiques par comparaison aux souches de *S. aureus* originelles [106,215], pouvant à l'extrême aboutir à la formation d'une sous-population très minoritaire de bactéries hyper-résistantes dites « persisters » [267].

Le curetage osseux, visant à la résection d'éventuels séquestres au sein d'un foyer d'ostéite chronique, et l'ablation de l'ensemble du matériel orthopédique en cas d'IOA chronique

permettent une réduction de l'inoculum bactérien, et notamment du biofilm. Un geste chirurgical extensif est ainsi indispensable au succès thérapeutique en cas d'IOA chroniques, particulièrement associées au biofilm.

Le choix des antibiotiques utilisés pour compléter ce geste chirurgical est également essentiel [268]. De nombreuses équipes se sont ainsi attachées à évaluer la pénétration et l'action des antibiotiques dans le biofilm bactérien.
La rifampicine a ainsi gagné une place de choix dans le traitement des IOA. En effet, il a été montré que cette molécule i) limitait l'adhésion bactérienne aux surfaces inertes [252], ii) possédait une excellente capacité de diffusion dans le biofilm bactérien [269], et iii) facilitait la diffusion de certaines molécules auxquelles elle serait associée [270]. Il existe même des données cliniques et microbiologiques montrant une supériorité de la rifampicine dans le traitement des IOA sur matériel associées au biofilm. Ainsi, en cas d'infection sur matériel orthopédique à *S. aureus* avec traitement chirurgical conservateur, le taux de succès thérapeutique est évalué entre 80 et 100% en cas d'utilisation de combinaisons à base de rifampicine [109,271–273], alors qu'il n'est que de 30 à 60% en l'absence de rifampicine [104,274,275]. L'ensemble de ces données ont mené à recommander son utilisation en première intention en cas d'IOA sur matériel, et notamment lorsque ce matériel ne peut être retiré [11–13]. Une étude utilisant un modèle *ex vivo* d'infection de cathéter à SARM a par ailleurs démontré la supériorité de l'activité anti-biofilm de la daptomycine, suivi par la minocycline et la tigécycline, en comparaison au linézolide et à la vancomycine [276]. Dans cette même étude, l'utilisation de rifampicine seule permettait l'activité anti-biofilm la plus lente, et était associée à une émergence rapide de résistance. Toutefois, son utilisation en combinaison à l'une des autres molécules testées, y compris le linézolide ou la vancomycine, permettait une synergie supérieure à toute autre molécule utilisée en monothérapie. Cette synergie a également été observée avec la fosfomycine dans un modèle animal d'infection de matériel étranger à SARM [277]. La fosfomycine pourrait également améliorer l'activité anti-biofilm du linézolide, de la minocycline et des glycopeptides [278]. Ces observations ont été confirmées dans divers modèles *ex vivo* d'infection à *S. aureus* et *S. epidermidis* [279–284]. Il n'existe actuellement pas de données cliniques sur les autres antibiotiques « anti-biofilm », et notamment sur la daptomycine.

De nouveaux anti-biofilm non-antibiotiques, basés sur d'autres types de molécules ou de nouvelles technologies, ont été évalués, ou sont en cours de développement [285].

Plusieurs équipes ont ainsi testés des dizaines de milliers d'agents chimiques pour leur capacité à empêcher la formation de biofilm [286,287]. Ces approches par large « screening » ont ainsi montré un intérêt potentiel de composants inhibant l'expression de certains gènes de virulence [288], ou encore certains chélateurs interférant avec les ions métalliques nécessaires à la formation de biofilm [289].

D'autres équipes ont étudié l'intérêt d'enzymes ciblant la matrice extra-cellulaire, visant ainsi à favoriser la dispersion du biofilm, telles que la dispersine B, la trypsine, la protéinase K ou encore la DNAse I [290–292].

L'éthanol semble également très efficace contre le biofilm bactérien impliqué dans les infections sur cathéter, en utilisation topique (« verrou ») [293]. Son utilisation pratique dans les IOA est toutefois peu envisageable. La N-acétyl-cystéine pourrait également avoir un intérêt, et a été évaluée en association à la tigécycline contre le biofilm formé par des souches de *S. epidermidis* dans un modèle d'infection de cathéter [294,295].

Enfin, l'utilisation de bactériophages dans l'éradication des biofilms staphylococciques pourrait être une méthode prometteuse, actuellement à l'étude dans des modèles d'infection sur cathéter [296], de plaies chroniques [297], ou d'infection sur matériel étranger [298], seuls ou en association à la rifampicine [299].

b. Action intra-cellulaire des anti-staphylococciques

L'hypothèse selon laquelle les staphylocoques internalisés dans les cellules osseuses constituent un réservoir bactérien à l'origine de la chronicité et des rechutes des IOA rend particulièrement pertinent de s'intéresser à l'action intra-cellulaire des anti-staphylococciques. Il devient dès lors important de considérer plusieurs paramètres pouvant influencer cette activité intra-cellulaire : la diffusion de la molécule utilisée vers le milieu intra-cellulaire, l'existence d'un potentiel efflux, sa répartition au sein des compartiments cellulaires, sa métabolisation par les enzymes cellulaires, et l'impact de l'environnement cellulaire (et notamment du pH) sur son efficacité [300–302]. Ces caractéristiques sont résumées dans le Tableau 2 pour l'ensemble des anti-staphylococciques, en se basant sur les résultats obtenus avec des cellules macrophagiques.

La plupart des études ont utilisé des modèles cellulaires de type monocytes-macrophages, en testant un large panel de molécules, le plus souvent à la concentration plasmatique maximale obtenue chez l'homme. Les résultats obtenus par ces différents travaux portant sur l'activité

intra-cellulaire des anti-staphylococciques sont résumés dans la Figure 20. Toutes ces études mettent bien en évidence la complexité de la pharmacologie intra-cellulaire des antibiotiques. Ainsi, si les β-lactamines s'accumulent très peu dans les cellules, elles gardent une activité anti-staphylococcique surprenante. Il a même été montré un regain d'activité contre une souche de SARM [303,304]. Cette observation est liée au pH acide régnant dans les phagosomes, entrainant une modification conformationnelle de la PBP2a permettant son acétylation par les β-lactamines [305].

Antibiotiques	**Influx**	**Efflux**	**Cic/Cec**	**Compartiment cellulaire**	**Modulation d'activité par l'environnement cellulaire**
β-lactamines	Rapide	Variable	< 1	Cytosol	Améliorée (pH acide)
Macrolides	Rapide	Rapide	4-50	2/3 lysosomes 1/3 cytosol	Diminuée (pH acide et liaison aux constituants cellulaires)
Clindamycine	Rapide	Rapide	5-20	Inconnu	
Fluoroquinolones	Rapide à très rapide	Très rapide	4-10	Cytosol	Diminution (pH acide)
Aminosides	Très lent (jours)	Très lent	2-4	Lysosomes	Très altérée (pH acide)
Glycopeptides					
Vancomycine	Lent à très lent	Inconnu	8	Lysosomes	Inconnue
Téicoplanine	Lent à très lent	Inconnu	60	Inconnu	Inconnue
Tétracyclines	Rapide	Inconnu	1-4	Inconnu	Inconnue
Linézolide	Rapide	Rapide	1	Inconnu	Inconnue
Rifampicine	Rapide	Inconnu	2-10	Inconnu	Inconnue

Tableau 2. Pharmacologie intra-cellulaire des anti-staphylococciques, d'après [300–302].

Les vitesses d'influx représentent le temps pour arriver à la concentration à l'équilibre et sont classées en très rapide (< 3 min), rapide (3-15 min), lente (15 min – 3h) et très lente (> 3h à plusieurs jours).

Cic/Cec : rapport des concentrations intra- et extra-cellulaires à l'équilibre

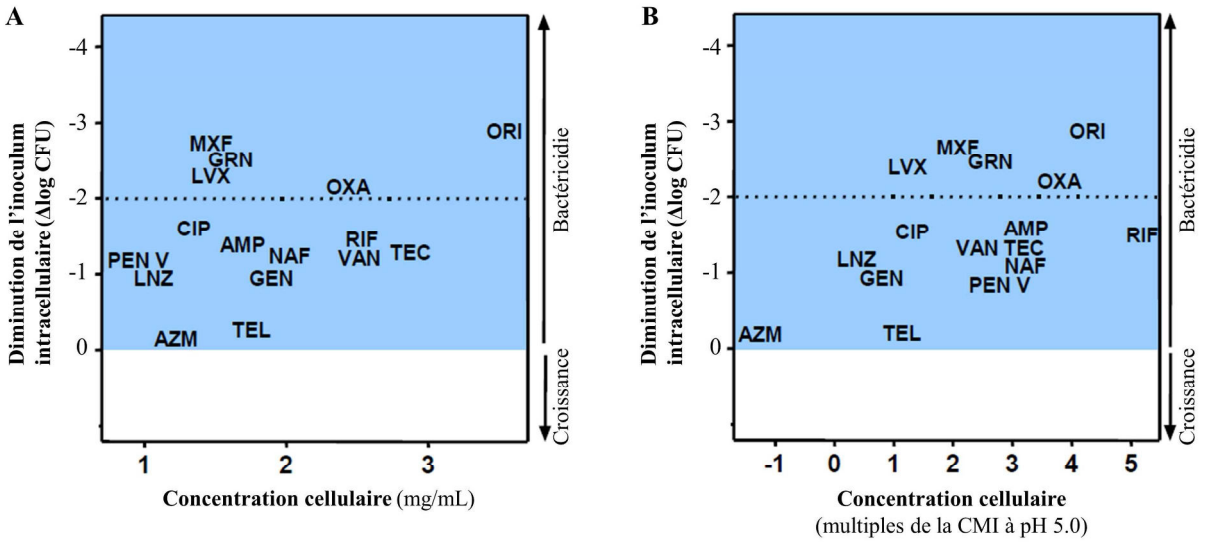


Figure 20. Activité intra-cellulaire de différents antibiotiques contre S. aureus dans un modèle de macrophages THP1 humains, d'après [306–308,302].

Les résultats sont exprimés en évolution du compte de bactéries intra-cellulaires après 24h d'exposition aux antibiotiques étudiés à une concentration extra-cellulaire correspondant au pic obtenu chez l'homme.

AMP, ampicilline ; AZM, azithromycine ; CFU, colony forming unit ; CIP, ciprofloxacine ; ETP, ertapénème ; GEN, gentamicine ; GRN, garenoxacine ; LNZ, linézolide ; LVX, lévofloxacine ; MEM, méropénème ; MXF, moxifloxacine ; NAF, nafcilline ; ORI, oritavancine ; OXA, oxacilline ; PEN V, pénicilline V ; RIF, rifampicine ; TEC, téicoplanine ; TEL, télithromycine ; VAN, vancomycine.

A notre connaissance, seules deux études se sont intéressées à l'activité intra-ostéoblastique des anti-staphylococciques. En 2013, l'équipe de Carolin A. Kreis a ainsi montré une activité satisfaisante de la tigécycline et de la rifampicine dans un modèle d'infection d'ostéoblastes humains, suggérant un intérêt dans le traitement des ostéites et des infections sur matériel d'ostéosynthèse, et notamment son utilisation au sein des ciments aux antibiotiques des espaceurs [309]. La dose de tigécycline utilisée était toutefois 30 fois supérieure aux concentrations tissulaires obtenues en thérapeutique chez l'homme. La seconde étude, menée en 2005 aux Etats-Unis, s'est intéressée à la rifampicine et à la clindamycine, montrant une excellente activité intra-cellulaire en utilisant des doses proches de la CMI de la souche étudiée [171]. L'information la plus intéressante apportée par cette étude est la démonstration d'une perte d'activité de ces antibiotiques lorsque les cellules étaient traitées 12h après l'infection, probablement du fait de modifications de paroi induites par la persistance intra-cellulaire prolongée des staphylocoques.

Enfin, les modèles animaux étudiant l'activité intra-cellulaire des antibiotiques ne sont à ce jour que peu adaptés à l'étude des IOA. Un modèle de péritonite de souris a toutefois permis de classer l'activité intra-cellulaire des anti-staphylococciques comme suit : dicloxacilline >

rifampicine > gentamicine [310]. Ce modèle s'affranchit toutefois des problèmes de diffusion tissulaire rencontrés dans les IOA. Dans un modèle d'infection de matériel étranger chez la souris, l'équipe de Murillo a toutefois confirmé la supériorité des fluoroquinolones et des β-lactamines dans l'éradication de *S. aureus* intra-cellulaire [311].

c. Antibiothérapie et small colony variants

La problématique de la relation entre antibiothérapie et SCV est double : l'utilisation de certains antibiotiques peut favoriser l'émergence des SCV, et ces variants phénotypiques présentent une sensibilité diminuée à certains antibiotiques [312].

L'utilisation de certains antibiotiques, et notamment de gentamicine, peut être à l'origine de l'**émergence des SCV**. Von Eiff a ainsi décrit que l'utilisation de billes imprégnées de gentamicine dans le traitement d'ostéite staphylococcique pouvait mener à l'émergence de SCV [107]. De même, l'utilisation de cotrimoxazole peut induire l'émergence de SCV thymidine-dépendants [313].

Les modifications des voies métaboliques impliquées dans le switch phénotypique sont à l'origine d'une **résistance accrue aux antibiotiques** [312,314]. Chez les SCV hémine- et ménadione-dépendants, l'interruption du transport trans-membranaire d'électrons a pour conséquence de diminuer la pénétration des antibiotiques cationiques, comme les aminosides, qui utilisent le gradient électrochimique membranaire pour traverser la membrane bactérienne et atteindre leur cible. De plus, ces modifications sont souvent associées à une résistance à l'acide fusidique du fait de l'association fréquente de mutations au sein du gène *rplF* encodant la protéine ribosomale L6 à celles survenant au sein des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'hémine et de la ménadione [315]. Du fait de leur interaction avec la voie de l'acide folique, les altérations de la biosynthèse de la thymidine conduisent à une résistance au cotrimoxazole [313].
Les quelques études comparant la sensibilité aux antibiotiques des SCV et des souches initiales n'ont pas mis en évidence de différences importantes en termes de concentration minimale inhibitrice (CMI), en dehors des aminosides et du cotrimoxazole. Une seule étude a par ailleurs reporté une élévation des CMI à la tigécycline au sein d'une collection de 48 SCV isolés de patients porteurs de mucoviscidose [316]. Toutefois, des études pharmacodynamiques ont montré que l'activité bactéricide de nombreux antibiotiques était

réduite, et notamment pour la daptomycine, la vancomycine et les β-lactamines [317–319]. A l'inverse, certains antibiotiques restent très actifs contre les SCV, et notamment les fluoroquinolones et l'oritavancine, seul lipoglycopeptide évalué [319–321].

Concernant plus spécifiquement les **SCV intra-cellulaires**, un modèle d'infection de monocytes humains par des SCV a été mis au point, utilisant les trois types de SCV précédemment décrits [319,320]. La première constatation était une croissance similaire à celle du phénotype sauvage pour les SCV hémine-dépendant, suggérant que ces souches trouvent dans le milieu intra-cellulaire les nutriments leur faisant défaut. A l'inverse, les SCV ménadione- et thymidine-dépendants se développaient de manière beaucoup plus lente. Ces trois types de SCV présentaient une sensibilité différente à l'action intra-cellulaire des antibiotiques, dépendant logiquement de leur capacité de croissance et des voies métaboliques atteintes. Les combinaisons à base de rifampicine ou d'un antibiotique fortement bactéricide tel que l'oritavancine ont montré une bonne efficacité intra-cellulaire contre les SCV [320,322].

TRAVAIL PERSONNEL

I. Introduction et objectifs

Comme développé dans la partie bibliographique, le genre *Staphylococcus* représente la première cause d'IOA, et est associé à des formes particulièrement difficiles à traiter. Leur prise en charge nécessite l'association i) d'une chirurgie lourde, imposant souvent le retrait du matériel orthopédique, et donc associée à un impact majeur sur la qualité de vie [56] ; et ii) d'une bi-antibiothérapie, parentérale et prolongée, grevée d'un taux élevé d'effets secondaires [323].

En dépit de cette prise en charge médico-chirurgicale longue et coûteuse, les IOA staphylococciques sont classiquement associées à un taux d'échec thérapeutique élevé, responsable d'infections chroniques et récidivantes engendrant une morbidité importante. Ce taux d'échec est estimé entre 20 et 30% dans les ostéomyélites, et entre 0 et 16% dans les spondylodiscites [7,55]. En cas d'IPA à *S. aureus*, il peut atteindre 20% en cas de formes aiguës relevant d'un traitement conservateur, mais peut dépasser 85% si une rétention de prothèse est proposée en dehors des recommandations (i.e. présence d'une fistule, non intégrité des tissus mous péri-prothétiques, et/ou durée d'évolution supérieure à 4 semaines). En cas d'indication adaptée de changement de prothèse en un ou deux temps, le taux d'échec varie entre 0 et 14% [5]. Cependant, ce taux d'échec thérapeutique et les facteurs de risque de passage à la chronicité et de récidive sont difficilement évaluables, en raison de la grande diversité des formes cliniques d'IOA à *S. aureus*. La majorité des études disponibles concernent en effet les IPA, et incluent des populations de patients très hétérogènes.

Du fait des difficultés de mise en place d'essais cliniques visant à améliorer la prise en charge de ces patients, le développement de travaux de recherche fondamentale apparait essentiel, afin d'améliorer la connaissance de la physiopathologie de ces infections, et donc de potentielles méthodes diagnostiques et thérapeutiques. Trois mécanismes bactériens ont ainsi été associés à la chronicité des IOA staphylococciques. Tout d'abord, la **formation de biofilm** a été associée aux formes persistantes d'IOA [208–210], et est à l'origine i) de la nécessité de dépose de tout matériel en cas de délai d'évolution supérieur à 3-4 semaines [5,11–13], et ii) de l'utilisation de molécules restant actives dans cette matrice extra-cellulaire telle que la rifampicine [109,269,270,277,279,280,282,283]. L'**internalisation et la persistance des staphylocoques au sein des cellules osseuses non phagocytaires**, et notamment des ostéoblastes, constitue un deuxième sanctuaire bactérien à l'origine de chronicisation et de rechutes [165,167,169–171]. Enfin, la **sélection de *small colony variant*** (SCV), dont l'émergence est favorisée par les conditions de croissances difficiles observées

dans les IOA et la pression de certains antibiotiques comme la gentamicine, a également été associé à la récurrence des IOA staphylococciques [17,106,215,216,218]. Ces deux derniers mécanismes ne sont toutefois actuellement pas pris en compte dans les stratégies thérapeutiques proposées dans les IOA. Par ailleurs, l'ensemble de ces mécanismes n'ont été étudiés qu'à partir de souches de staphylocoques de laboratoire, la disponibilité de mutants pour divers facteurs de virulence ayant permis de décrire au mieux les phénomènes moléculaires impliqués.

Dans ce contexte, notre principal objectif a été d'évaluer l'impact de ces trois mécanismes physiopathologiques (formation de biofilm, internalisation par les ostéoblastes et évolution vers le phénotype SCV) dans la chronicité des IOA staphylococciques, à partir de l'importante cohorte de patients de la plateforme de recherche translationnelle du CRIOAC des Hospices Civils de Lyon, associant laboratoires de bactériologie et de recherche, et services cliniques de chirurgie orthopédique et de maladies infectieuses. Cette interaction multidisciplinaire peu commune permet de disposer i) d'informations cliniques exhaustives concernant une importante file active de patients atteints d'IOA, ii) des souches cliniques correspondantes, et iii) de modèles cellulaires et d'outils de caractérisation moléculaire des souches, permettant au final de mettre en corrélation mécanismes bactériens fondamentaux et présentation clinique. Les souches utilisées dans ce travail sont ainsi issues de la collection des laboratoires de bactériologie des Hospices Civils de Lyon, conservant les souches cliniques issues de prélèvements ostéo-articulaires congelées sur billes en cryotubes (TSC, Heywood, Royaume Uni) à -80°C depuis 2001. Les souches de référence de *S. epidermidis* NCTC11047 et de *S. aureus* 8325-4 et HG001 ont été utilisées comme témoins dans toutes les expériences, leur interaction avec les ostéoblastes dans le type de modèle utilisé étant connue [198,324].

II. Modèle *ex vivo* d'infection d'ostéoblastes humains

1. Schéma général du modèle

Le modèle *ex vivo* d'infection d'ostéoblastes humains utilisé dans ce travail a été initialement développé au laboratoire pour étudier les interactions de différents clones de SARM avec les cellules osseuses [324]. Le modèle ainsi mis au point précédemment va être présenté ici, ainsi que les adaptations rendues nécessaires pour l'étude de souches de *S. epidermidis*. Une vue d'ensemble du modèle est représenté sur la Figure 22.

a. Culture des ostéoblastes humains

Les ostéoblastes humains de lignée MG63 (CRL-1427, LGC standard, Etats-Unis), issus d'un ostéosarcome, ont été utilisés pour l'ensemble des expériences [325]. Les réactifs et milieux de cultures cellulaires ont été obtenus auprès de GIBCO (Paisley, Royaume Uni).
Les ostéoblastes de lignée MG63 ont été cultivés en flasque de 75 cm² (T75, BD Falcon, Le Pont de Claix, France) à 37°C sous 5% de CO_2, dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, et additionné de 100 U/mL de pénicilline et de 100 µg/mL de streptomycine. Lors des étapes d'infection, ce milieu de culture cellulaire complet (MCC) était utilisé sans antibiotiques. La lignée était entretenue à raison d'un passage par semaine, et les ostéoblastes étaient utilisés entre les 2ème et 20ème passages après décongélation.
Les ostéoblastes primaires ont été isolés à partir de fragments de têtes fémorales prélevés lors de chirurgies de pose de prothèse de hanche, après consentement éclairé des patients concernés, et dans le cadre des biobanques des Hospices Civils de Lyon. Les prélèvements osseux étaient collectés le jour de la chirurgie dans du tampon phosphate salin (PBS pour *phosphate-buffered saline*) additionné de pénicilline (100 UI/mL) et de streptomycine (100 µg/mL). Les tissus mous étaient retirés au scalpel. Après plusieurs lavages au PBS, les prélèvements étaient coupés en fragments osseux de 1 à 2 mm^3 et cultivés dans du MCC avec antibiotiques supplémenté en acide ascorbique (50 µg/mL). Le milieu était changé chaque semaine jusqu'à confluence des cellules. Les ostéoblastes étaient alors caractérisés par des tests biochimiques spécifiques (induction de la sécrétion d'ostéocalcine par la vitamine D) et congelés dans de l'azote liquide. Les expérimentations utilisant ces cellules primaires ont été réalisées lors d'un passage unique des cellules après décongélation.

Avant les expériences d'infection, les ostéoblastes étaient déposés dans des plaques 24 puits pour culture cellulaire (Falcon, Le Pont de Claix, France) à raison de 40,000 cellules par puits dans 1 ml de MCC avec antibiotiques, et cultivées pendant 48h jusqu'à 80% de confluence.

b. Cultures bactériennes

Quarante-huit heures avant chaque expérience, les souches d'intérêt étaient décongelées, repiquées sur gélose au sang (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et incubées 18h à 37°C. A partir d'une des colonies obtenues, une culture en phase stationnaire était ensuite préparée par incubation pendant 18h dans 5 mL de bouillon cœur-cervelle (BCC) (AES, Bruz, France). A partir de cette culture en phase stationnaire, 1 mL de suspension était transféré dans 5 mL de BCC stérile puis incubé à 37°C pendant 3h afin d'obtenir des bactéries en phase de croissance exponentielle. Le bouillon ainsi obtenu était vortexé puis soniqué pendant 1 min à 100% afin d'homogénéiser la suspension en supprimant les amas bactériens. Le temps et l'intensité de sonication avaient été préalablement établis sur la souche de référence.
Le nombre de bactéries était ensuite estimé par spectrophotométrie selon la densité optique (DO) à 600 nm de la suspension (DO_{600}) à l'aide de droites de régression photométrique, selon les équations suivantes :

- pour *S. epidermidis* : $CFU/mL = 7.02 \times 10^8 \times DO_{600} - 1.03 \times 10^8$
- pour *S. aureus* : $CFU/mL = 7.10^8 \times OD_{600} - 3.10^7$

La droite de régression photométrique pour *S. aureus* avait été établie précédemment au laboratoire. L'adaptation du modèle à l'étude de souches de *S. epidermidis* a nécessité l'établissement d'une droite de régression photométrique spécifique, à partir de sept souches de *S. epidermidis* choisies au hasard. Les souches étaient cultivées pendant 24h en BCC à 37°C. Les suspensions bactériennes étaient ensuite diluées par raison 2 de 1 à 1/128. La DO_{600} de chaque dilution était mesurée avant étalement sur gélose tryptophane-soja (TSA, Oxoid, Dardilly, France). Après 24h d'incubation, les colonies présentes sur chaque gélose étaient énumérées et corrélées à la DO_{600} correspondante, permettant d'obtenir la courbe présentée en Figure 21.

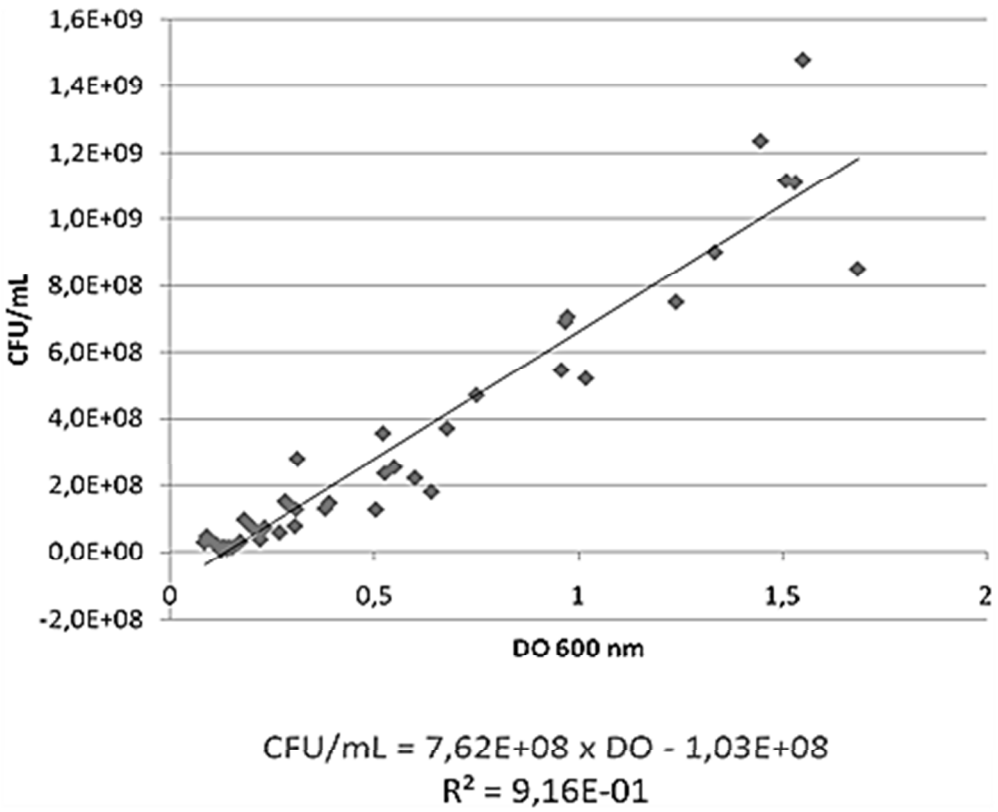


Figure 21. Droite de régression linéaire photométrique permettant d'estimer le nombre de bactéries par millilitre de bouillon cœur-cervelle en fonction de la densité optique à 600 nm, obtenue à partir de sept souches de S. epidermidis (données personnelles).

L'ensemble de ces étapes avaient pour but de standardiser précisément l'inoculum bactérien, mesuré en nombre de bactéries / cellule (MOI pour multiplicity of infection).

c. Infection des ostéoblastes

Après deux lavages au DMEM et numération des cellules, la quantité nécessaire de suspension bactérienne pour obtenir la MOI voulue était transférée dans chaque puits.
Après 30 minutes de sédimentation des bactéries à 4°C pour permettre la synchronisation du début de l'infection, les plaques étaient incubées à 37°C pour permettre l'adhésion et l'invasion cellulaire.
La MOI réelle était vérifiée par ensemencement des suspensions bactériennes standardisées sur gélose TSA par dilutions sériées.

2. Adhésion bactérienne aux ostéoblastes

La mesure de l'adhésion des bactéries aux ostéoblastes était évaluée par une méthode de cytométrie en flux développée dans le laboratoire [326].

Après l'étape d'infection, les cellules étaient lavées 2 fois avec du DMEM avant d'être mises en suspension par incubation en présence de 500 µL de trypsine-EDTA 0.05% par puits pendant 2 minutes à 37°C. Chaque puits était ensuite lavé à 2 reprises avec 1 mL de MCC sans antibiotique afin d'inactiver la trypsine et de récupérer l'ensemble des cellules dans un tube à hémolyse. Les cellules étaient ensuite lavées 2 fois avec du PBS froid avant centrifugation (1500 tours/minute, 5 minutes). Après élimination du PBS par aspiration, les cellules étaient incubées dans l'obscurité pendant 15 minutes en présence de vancomycine couplée à un fluorochrome (Bodipy, Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) à la concentration de 0.8 µg/mL. En se fixant sur le peptidoglycane de la paroi bactérienne sans pénétrer à l'intérieur des cellules, la vancomycine marquait ainsi uniquement les bactéries extra-cellulaires. Les cellules étaient alors lavées 3 fois par du PBS et fixées avec 400 µL de PBS-formol 1% (Sigma, St Louis, Etats-Unis) avant analyse sur cytomètre de flux (FacsCANTO™, Becton Dickinson). La fluorescence était analysée en excluant les bactéries non marquées et les débris cellulaires grâce aux puits contrôles préparés. Le seuil de détection de fluorescence était ajusté pour détecter moins de 2% des cellules non infectées (témoin négatif). Le nombre de bactéries adhérées était estimé par la proportion de cellules porteuses de staphylocoques marqués, ainsi que par l'intensité moyenne de fluorescence multiplié par la proportion de cellules au-dessus du seuil (AFU).

3. Mesure de l'internalisation des staphylocoques par les ostéoblastes

Après les 2h d'infection, les cellules étaient lavées deux fois au DMEM puis incubées à 37°C pendant 1h en présence de 1 mL de gentamicine (PAA, Pasching, Austria) à 200 µg/mL ou de lysostaphine à 10 µg/mL, permettant la destruction des bactéries restées extra-cellulaires. Après 1h, la gentamicine ou la lysostaphine était éliminée par deux nouveaux lavages au DMEM.

Le nombre de bactéries intra-cellulaires était estimé par étalement sur gélose des lysats cellulaires obtenus par choc osmotique à l'eau stérile (incubation dans 1 mL d'eau stérile pendant de 10 minutes). Avant étalement, les lysats cellulaires étaient soniqués pour homogénéisation. Cette étape pouvait être réalisée après les 2h d'infection, pour évaluer

uniquement l'étape d'internalisation, mais également après une durée d'incubation donnée, pour évaluer la persistance des bactéries dans les ostéoblastes.

4. Cytotoxicité induite par l'infection

Avant la phase de lyse cellulaire, 200 µL du surnageant de culture de chaque puits étaient prélevés pour doser la quantité de lactates déshydrogénase (LDH) par méthode colorimétrique dans un automate de biochimie dédié (Dimension Vista, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarryton, NY), la concentration de cette enzyme intra-cellulaire relarguée en cas de dommages membranaires étant proportionnelle au nombre d'ostéoblastes lysés lors de l'infection. Le pourcentage de mortalité cellulaire était calculé en comparant le taux de LDH observé dans le surnageant des cellules infectées (LDH_{obs}) avec celui de cellules non infectées laissées intactes ($LDH_{0\%}$) ou totalement lysées par choc osmotique ($LDH_{100\%}$) selon la formule suivante : $[(LDH_{obs} – LDH_{0\%}) / (LDH_{100\%} - LDH_{0\%})] \times 100$.

5. Emergence intra-cellulaire des small colony variants

Après étalement des lysats cellulaires sur gélose au sang, chaque boite de culture était photographiée, permettant ensuite de dénombrer le nombre de SCV en utilisant le logiciel d'analyse d'image ImageJ (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012). En l'absence de définition consensuelle, les colonies ayant une surface inférieure au 5ème à la surface médiane de l'ensemble des colonies présentes sur chaque boite de culture étaient considérées comme des SCV.

6. Evaluation de l'activité intra-cellulaire des antibiotiques

Pour évaluer l'activité intra-cellulaire des anti-staphylococciques, les cellules infectées étaient incubées pendant 24 h à 37°C dans du MCC contenant l'antibiotique à tester à différentes concentration. Les différents paramètres mesurés par le modèle (nombre de bactéries intra-cellulaire, nombre de SCV et cytotoxicité) étaient ensuite mesurés comme décrit précédemment.

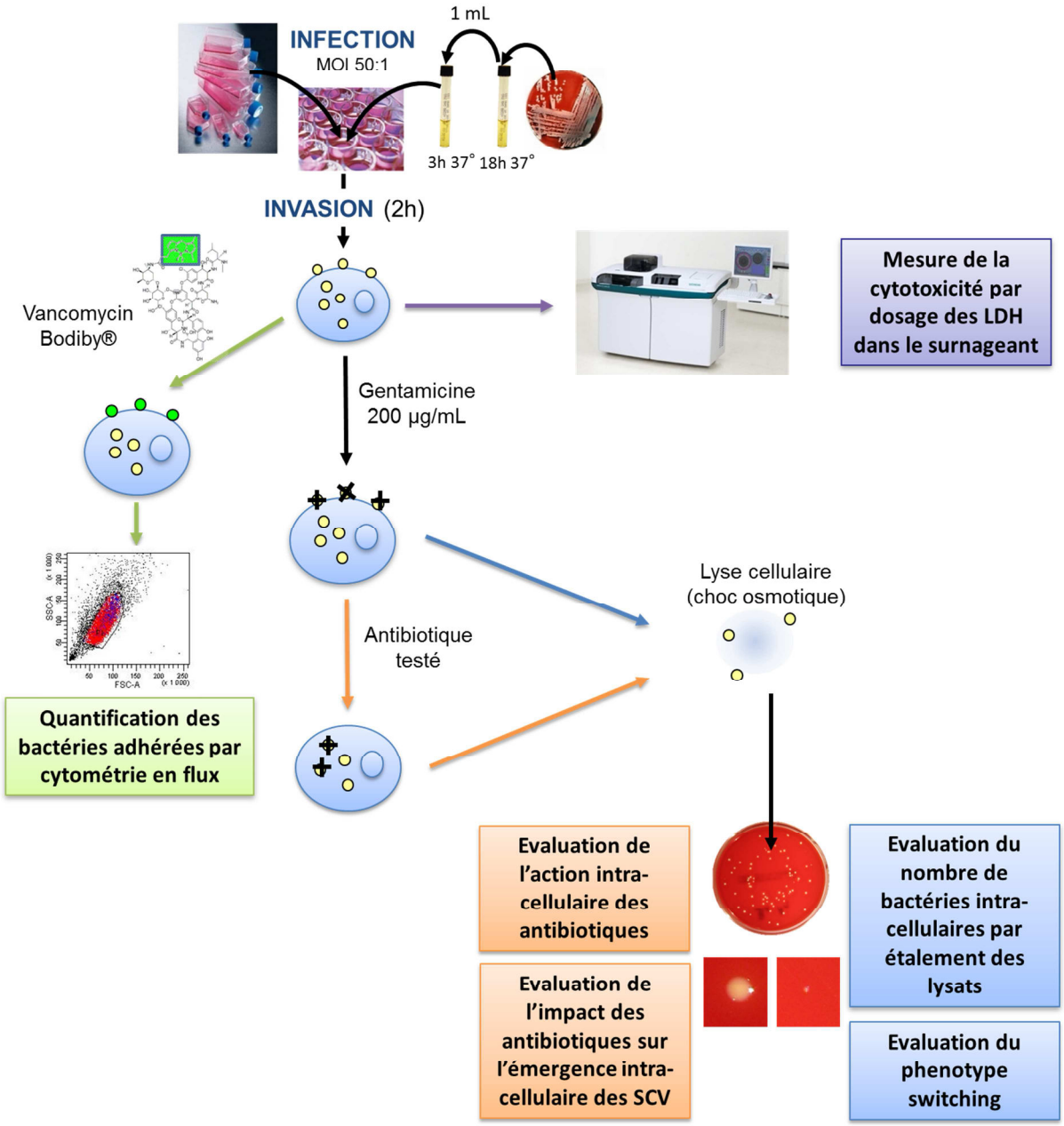


Figure 22. Modèle ex vivo d'infection d'ostéoblastes humains de lignée MG63 par les staphylocoques.

III. Etude de la formation de biofilm

La capacité de formation de biofilm a été évaluée par deux techniques explorant des stades différents de la formation du biofilm.

1. Etude du biofilm mature : méthode colorimétrique du Crystal violet

La coloration au Crystal violet permet une évaluation semi-quantitative du biofilm mature formé sur une plaque 96 puits par des bactéries après un temps de croissance donné. La DO mesurée après solubilisation du biofilm coloré est en effet proportionnelle à la quantité de biofilm formé sur les parois des puits (Figure 23) [327].

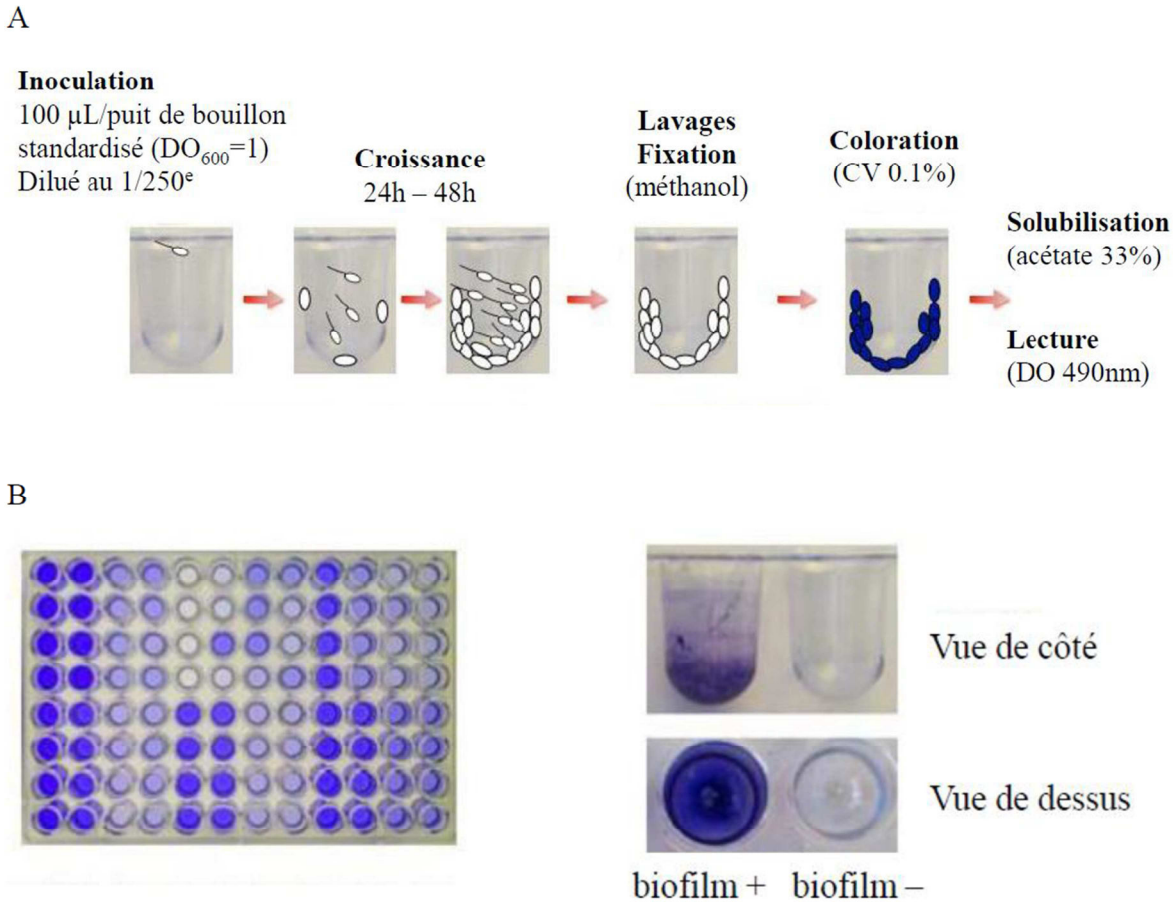


Figure 23. Principe de mesure de la quantité de biofilm mature formé par la méthode colorimétrique du Crystal violet (A) et exemple de coloration dans une microplaque 96 puits (B).

Les BCC contenant les souches en phase stationnaire étaient standardisées à DO_{600} = 1 +/- 0.05. Les suspensions obtenues étaient ensuite diluées au 1/100ème en BCC stérile. Cent

microlitres de chaque échantillon étaient déposés dans une plaque 96 puits à fond plat non coaté. Une plaque était ensuite incubée à 37°C pendant 24 ou 48h (une plaque par temps de mesure). Après élimination du surnageant par retournement, les puits étaient ensuite lavés 3 fois à l'eau afin de supprimer les bactéries planctoniques. Le biofilm était fixé par incubation en présence de 100 µL de méthanol 99% (Sigma, St Louis, USA) par puits pendant 20 minutes. Après 3 lavages à l'eau stérile, chaque puits était ensuite coloré avec 100 µL d'une solution de Crystal violet à 0.1% filtré (Sigma, St Louis, USA). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, le Crystal violet était éliminé par retournement et les puits sont lavés 5 fois à l'eau stérile. Après séchage de la plaque 1h à température ambiante, le biofilm coloré était alors solubilisé par incubation 10 minutes en présence d'acide acétique glacial 33% (100 µL par puits) avant lecture immédiate de l'intensité de coloration par mesure de la DO à 490 nm. Des puits ne contenant que du BCC stérile servaient de témoins négatifs.

2. Cinétique de formation de biofilm : Biofilm Ring Test™

La méthode du Biofilm Ring Test™ permet d'explorer la cinétique des étapes précoces de formation de biofilm par des microorganismes déposés dans les puits d'une microplaque avec un toner constitué de particules magnétiques colorées (Kit microplaques strip well, Biofilm Control™, St Beauzire, France). Ces billes magnétiques sont progressivement immobilisées dans le biofilm au cours de sa formation. Après différent temps d'incubation, le fond de la plaque est scanné une première fois. Puis un aimant est présenté sous chaque puits, attirant au centre des puits les particules non « engluées » dans le biofilm. Le fond de la plaque est alors scanné à nouveau. L'analyse comparative des images du fond du puits « avant » et « après » aimantation par le logiciel Biofilm Elements™ fournit un index de formation de biofilm (BFI pour « *Biofilm forming index* »), convolution entre la forme et l'intensité de l'anneau formé par les microbilles de toner rassemblées au centre du puits par aimantation. En l'absence de biofilm, l'ensemble des particules magnétiques s'amassent au centre du puits pour former un spot sous l'influence du champ magnétique. Le BFI est alors supérieur à 7. Lorsque le biofilm se développe, les particules progressivement immobilisées sont plus faiblement mobilisables par le champ magnétique et une atténuation du spot est observée (BFI entre 7 et 2). En présence d'un biofilm totalement formé, toutes les particules sont immobilisées et il n'y a plus de formation de spot. Le BFI se stabilise alors autour de 2 (Figure 24).

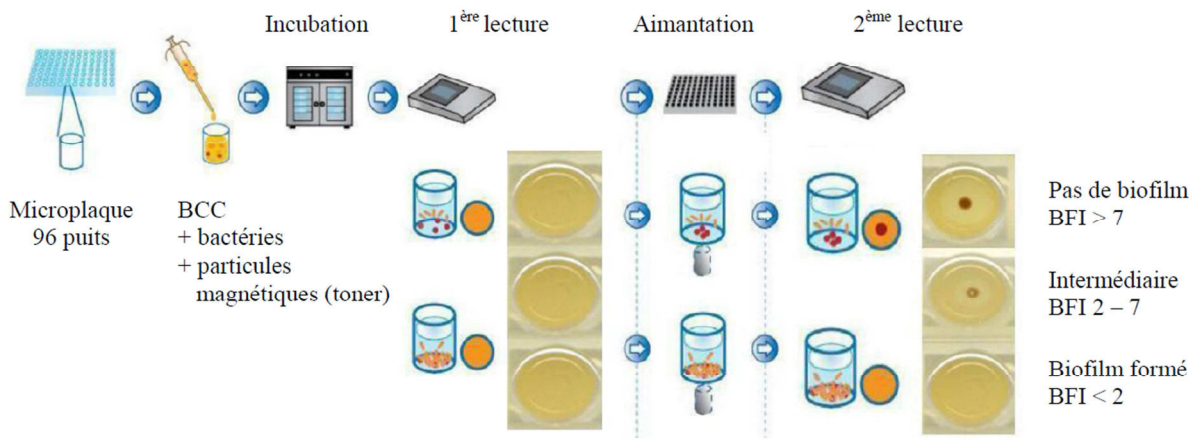


Figure 24. Principe de la mesure de la formation de biofilm par la méthode du Biofilm Ring Test™.

Pour chaque souche testée, à partir d'un bouillon en phase stationnaire de croissance, une suspension bactérienne était standardisée à une DO_{600} de 1 +/- 0.05 puis diluée au 1/250ème dans du BCC stérile. Le toner était alors ajouté pour obtenir une concentration de 1%. Après homogénéisation, 200 µL de suspension bactérienne / particules magnétiques étaient déposés dans les puits d'une barrette 8 puits (une par temps de mesure) regroupés sur des microplaques pouvant contenir 12 barrettes. Sur chaque microplaque, 2 puits contenant du BCC stérile avec toner et 2 puits avec du BCC seul étaient préparés et utilisés comme témoins. Les microplaques étaient ensuite incubées à 37°C en aérobie en chambre humide. Lors de chaque point de mesure, une microplaque était sortie de l'étuve et 100 µL d'huile opaque blanche étaient déposés sur chaque puits, permettant d'obtenir le contraste nécessaire au scannage du fond des puits. La plaque était alors été scannée avant et après 1 minute d'aimantation et les images du fond des puits étaient analysées par le logiciel Biofilm Elements™ calculant le BFI.

Le BFI brut était transformé en « proportion de billes immobilisées » (RBI pour « *Relative bead immobilisation* ») par normalisation tenant compte du témoin BCC + toner ($BFI_{référence}$, équivalent à une absence de formation de biofilm) et du témoin BCC seul ($BFI_{minimal}$, équivalent à 100% de billes immobilisées) selon la formule suivante :

$$RBI = \sqrt{\frac{BFI_{référence} - BFI_{condition}}{BFI_{référence} - BFI_{minimal}}}$$

Initialement développée par Chavant et al. à partir de souches de *Pseudomonas aeruginosa*, cette méthode n'avait jusqu'ici été utilisée que par une seule équipe sur *S. aureus*, obtenant des résultats concordants avec ceux obtenus par la méthode conventionnelle du crystal violet [328,329].

IV. Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus epidermidis* : rôle de l'internalisation dans les ostéoblastes et de la formation de biofilm

Longtemps uniquement considéré comme un commensal universel de la peau et des muqueuses, *S. epidermidis* est un staphylocoque à coagulase négative désormais reconnu comme un pathogène opportuniste majeur, notamment responsable d'infections nosocomiales et/ou sur matériel étranger [8,9]. Moins étudié que *S. aureus*, ces staphylocoques à coagulase négative, et en particulier *S. epidermidis*, sont pourtant responsables de 30 à 43% des IOA sur matériel orthopédique, devançant même ainsi *S. aureus* en termes de fréquence dans certaines séries [5,10,330].

De nombreux travaux ont démontré que *S. epidermidis* est parfaitement adapté à la formation et à la survie au sein de biofilm [331,332]. Comme *S. aureus*, il possède notamment de nombreuses protéines d'adhésions spécifiques (MSCRAMMs), indispensables à l'adhésion, interagissant avec la matrice extra-cellulaire. De nombreuses souches de *S. epidermidis* possèdent par ailleurs le locus *ica* (*intercellular adhesion*), assurant notamment la synthèse de PNAG, élément capital de la cohésion bactérienne au sein du biofilm [333]. Enfin, la capacité d'internalisation de *S. epidermidis* dans des cellules non phagocytaires a été démontrée avec les cellules épithéliales mammaires bovines et les cellules endothéliales humaines [194–196]. L'internalisation de *S. epidermidis* par les ostéoblastes n'a, quant à elle, été décrite que dans une seule étude utilisant une unique souche clinique isolée d'IOA [198].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux IOA sur matériel à *S. epidermidis*, aujourd'hui principalement expliquées par l'inoculation bactérienne, lors de la chirurgie, des souches de colonisation du patient. Or, si le portage de *S. epidermidis* est décrit comme universel, les infections sur matériel orthopédique restent peu fréquentes. En dehors du rôle indéniable des facteurs liés à l'hôte (immunodépression par exemple) ou à l'environnement (non-respect d'une asepsie chirurgicale stricte notamment), la question de l'expression de facteurs bactériens chez certaines souches de portage, favorisant la survenue des IOA sur matériel, parait légitime. Les souches de *S. epidermidis* responsables d'IOA pourraient alors représenter une sous-population particulière des souches de portage, que l'on pourrait distinguer par la présence de caractères de virulence particuliers.

L'objectif de ce travail a ainsi été de comparer deux populations de *S. epidermidis*, l'une regroupant des souches responsables d'IOA et la seconde des souches de portage nasal, vis-à-vis des mécanismes phénotypiques de virulence associés aux IOA staphylococciques représentés par les capacités d'internalisation par les ostéoblastes humains et de formation de biofilm.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Staphylococcus epidermidis in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation

Florent Valour[1,2,3]*, Sophie Trouillet-Assant[1,2], Jean-Philippe Rasigade[1,2], Sébastien Lustig[1,4,7], Emmanuel Chanard[5], Hélène Meugnier[6,7], Sylvestre Tigaud[2], François Vandenesch[1,6,7,8], Jérome Etienne[1,6,7,8], Tristan Ferry[1,3,7], Frédéric Laurent[1,2,7,8], on behalf of the Lyon BJI Study Group¶

1 INSERM U1111, International Center for Research in Infectiology, Lyon, France, **2** Laboratory of Bacteriology, North Lyon University Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **3** Infectious Diseases Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **4** Orthopedic Surgery Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **5** Laboratory of Bacteriology, Novecia, Lyon, France, **6** Laboratory of Bacteriology, East Lyon University Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **7** Claude Bernard University, Lyon, France, **8** French National Reference Center for Staphylococci, Lyon, France

Abstract

Background: *Staphylococcus epidermidis* orthopedic device infections are caused by direct inoculation of commensal flora during surgery and remain rare, although *S. epidermidis* carriage is likely universal. We wondered whether *S. epidermidis* orthopedic device infection strains might constitute a sub-population of commensal isolates with specific virulence ability. Biofilm formation and invasion of osteoblasts by *S. aureus* contribute to bone and joint infection recurrence by protecting bacteria from the host-immune system and most antibiotics. We aimed to determine whether *S. epidermidis* orthopedic device infection isolates could be distinguished from commensal strains by their ability to invade osteoblasts and form biofilms.

Materials and Methods: Orthopedic device infection *S. epidermidis* strains (n = 15) were compared to nasal carriage isolates (n = 22). Osteoblast invasion was evaluated in an *ex vivo* infection model using MG63 osteoblastic cells co-cultured for 2 hours with bacteria. Adhesion of *S. epidermidis* to osteoblasts was explored by a flow cytometric approach, and internalized bacteria were quantified by plating cell lysates after selective killing of extra-cellular bacteria with gentamicin. Early and mature biofilm formations were evaluated by a crystal violet microtitration plate assay and the Biofilm Ring Test method.

Results: No difference was observed between commensal and infective strains in their ability to invade osteoblasts (internalization rate 308+/−631 and 347+/−431 CFU/well, respectively). This low internalization rate correlated with a low ability to adhere to osteoblasts. No difference was observed for biofilm formation between the two groups.

Conclusion: Osteoblast invasion and biofilm formation levels failed to distinguish *S. epidermidis* orthopedic device infection strains from commensal isolates. This study provides the first assessment of the interaction between *S. epidermidis* strains isolated from orthopedic device infections and osteoblasts, and suggests that bone cell invasion is not a major pathophysiological mechanism in *S. epidermidis* orthopedic device infections, contrary to what is observed for *S. aureus*.

Citation: Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade J-P, Lustig S, Chanard E, et al. (2013) *Staphylococcus epidermidis* in Orthopedic Device Infections: The Role of Bacterial Internalization in Human Osteoblasts and Biofilm Formation. PLoS ONE 8(6): e67240. doi:10.1371/journal.pone.0067240

Editor: Stefan Bereswill, Charité-University Medicine Berlin, Germany

Received April 3, 2013; **Accepted** May 15, 2013; **Published** June 28, 2013

Copyright: © 2013 Valour et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: florent.valour@chu-lyon.fr

¶ Membership of the Lyon BJI Study Group is provided in the Acknowledgments.

Introduction

Staphylococcus epidermidis, coagulase-negative staphylococci, have been considered innocuous commensals of human skin and mucous membranes but are now accepted as the leading opportunistic pathogens responsible for numerous nosocomial infections [1]. In particular, they account for 30 to 43% of joint prosthesis infections [2]. The current accepted pathophysiological mechanism of *S. epidermidis* orthopedic device infection is the direct inoculation of skin colonizing strains at the time of surgery [2–4].

The contrast between the low incidence of *S. epidermidis* orthopedic device infection and the highly prevalent *S. epidermidis* carriage suggests that *S. epidermidis* bone and joint infections might either correspond to accidental events due to colonizing strains or to a specific, more virulent sub-population of commensal isolates. The existence of such specificity could be crucial because it may impact the prevention and management of these severe infections. The ability of a commensal pathogen to cause chronic diseases that are difficult to treat suggests that these infections are

attributable to the ability of this organism to escape the immune system and antibiotic therapy [1,5].

Two predominant mechanisms have been proposed to be implicated in orthopedic device infections: i) bacterial invasion and persistence within non-professional phagocytes such as osteoblasts, as previously demonstrated for *S. aureus* [6], and ii) the ability of bacteria to form biofilms [7–10]. The aim of the present study was to determine if *S. epidermidis* strains implicated in orthopedic device bone and joint infections can be distinguished from colonizing ones on the basis of these proposed mechanisms. We assayed 22 nasal carriage *S. epidermidis* strains and 15 bone-infective isolates in *ex vivo* models of human osteoblast infection and biofilm formation assays. This study received the approval of the French South-East ethics committee.

Materials and Methods

Ethical Statement

This study received the approval of the French South-East ethics committee, with the reference number 2013-018. In accordance with the French legislation, written informed patient consent was not required for any part of the study, and especially for the human primary osteoblasts collection.

Bacterial Strains

We analyzed all *S. epidermidis*-positive bacteriological samples collected in the orthopedic department of our institution between 2001 and 2011. Twenty-four strains that contributed to mono-microbial orthopedic device infections (i.e., clinical evidence of infection and at least 2 deep bacteriological *S. epidermidis*-positive samples [2]) were considered for inclusion. For technical reasons, gentamicin-resistant strains were excluded (n = 9); thus, 15 clinical orthopedic device infection isolates were included in the study (total hip prosthesis (n = 5), total knee prosthesis (n = 6), intramedullar osteosynthesis device (n = 4)). Thirty-three *S. epidermidis* colonizing isolates were selected from the staphylococcal strains collected from nasal swabs of patients at admission in the orthopedic surgery unit from June to December 2010. After exclusion of gentamicin-resistant strains, 22 commensal isolates were analyzed in this study. Identification of all *S. epidermidis* isolates was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) as previously described [11].

The nasal colonizing *S. epidermidis* NCTC11047 strain, previously evaluated in a similar bone cell infection model [12], was used as a control in each experiment. The *S. aureus* 8325-4 laboratory strain, which has been well characterized in its ability to invade osteoblasts [13], was used as a control in each osteoblast infection experiment. Prior to performing the assays, *S. epidermis* cells were grown overnight (18 h) in a brain heart infusion (BHI) (AES, Bruz, France) aerobically at 36.5°C. Five hundred microliters of this suspension were transferred in a sterile BHI and grown for 3 h aerobically at 36.5°C to obtain log-phase cultures. Bacteria were harvested by centrifugation and suspended in an assay medium. Suspensions were standardized on the basis of optical density at 600 nm (OD_{600}) using a photometric regression formula established in preliminary experiments (data not shown): $CFU/mL = 7.10^8 \times OD_{600} - 10^8$ for *S. epidermidis* and $CFU/mL = 7.10^8 \times OD_{600} - 3.10^7$ for *S. aureus*.

Human Osteoblast Culture

All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). The human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427), which was purchased from LGC standard (USA), was routinely cultured in growth medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FBS) and contained 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin ("growth medium with antibiotics"). Cells were passaged twice a week and were used in experiments up to passage 20 after being thawed from a stock culture.

Primary human osteoblasts were isolated from non-infected patients and sampled during routine hip surgery. Bone specimens were collected on the day of surgery in phosphate-buffered saline (PBS, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) containing penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) and processed the same day. Excess blood and soft tissue were removed with a scalpel aided by several PBS rinses. Samples were cut into fragments of 1 to 2 mm^3 and cultured in routine growth medium with antibiotics and supplemented with 50 µg/mL of ascorbic acid (Sigma Aldrich, St Louis, USA). The medium was thereafter changed once a week until cells became confluent. Osteoblasts were characterized by an osteocalcin assay, frozen, and used only once upon thawing.

Invasion of Osteoblasts by S. epidermidis Using a Gentamicin Protection Assay (Fig. 1)

Osteoblasts were seeded at 40,000 cells per well into 24-well tissue cultures plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 1 mL of growth medium with antibiotics and cultured for 2 days until 70 to 80% confluence. Cells were washed twice with 1 mL of DMEM before the addition of bacteria. Bacterial suspensions in growth medium without antibiotics were added to the bone cell culture wells at a multiplicity of infection (MOI) of 500:1 for *S. epidermidis* and 100:1 for *S. aureus*. After 2 h of co-culture of bacteria and osteoblasts in a 37°C/5% CO_2 incubator, cell cultures were washed twice with 1 mL DMEM and incubated 1 hour with growth medium supplemented with 200 µg/mL gentamicin (PAA, Pasching, Austria) to kill the remaining extracellular staphylococcal cells. One hundred microliters of each culture supernatant were plated onto tryptic soy agar plates (TSA, Oxoid, Dardilly, France) to confirm the absence of living extracellular bacteria. Osteoblast cultures were washed twice with DMEM and subsequently lysed by a 10-minute incubation period with sterile purified water. To quantify internalized bacteria, suspension dilutions of cell lysates were plated in duplicate on TSA plates followed by an overnight incubation at 37°C.

Adhesion of S. epidermidis to Osteoblasts (Fig. 1)

Staphylococcus epidermidis adhesion to osteoblasts was assessed using a flow cytometry-based assay as previously described [13]. Three colonizing and three infective *S. epidermidis* strains were randomly selected and tested in addition to *S. epidermidis* NCTC11047 and *S. aureus* 8325-4 strains, which were used as controls. Briefly, after 2 h of bacterial co-culture (MOI of 500:1 and 100:1 for *S. epidermidis* and *S. aureus*, respectively), osteoblasts were washed twice with DMEM, harvested from the plates using a 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO, Paisley, United Kingdom) treatment for 2 min at 37°C, and washed twice with ice-cold PBS. Then, they were incubated on ice and in the dark for 15 min with a 1:1 mixture of vancomycin and BODIPY FL vancomycin (Invitrogen, Grand Island, USA) at a concentration of 0.8 µg/mL, which targets the bacterial peptidoglycan and cannot penetrate intact cells. After labeling, cells were washed twice with PBS and fixed in 1% formaldehyde (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Flow cytometry analysis was performed with a Canto II cytometer (Becton Dickinson) using the FL-1 channel to measure the fluorescence intensity and the FSC/SCC stopping gate to exclude

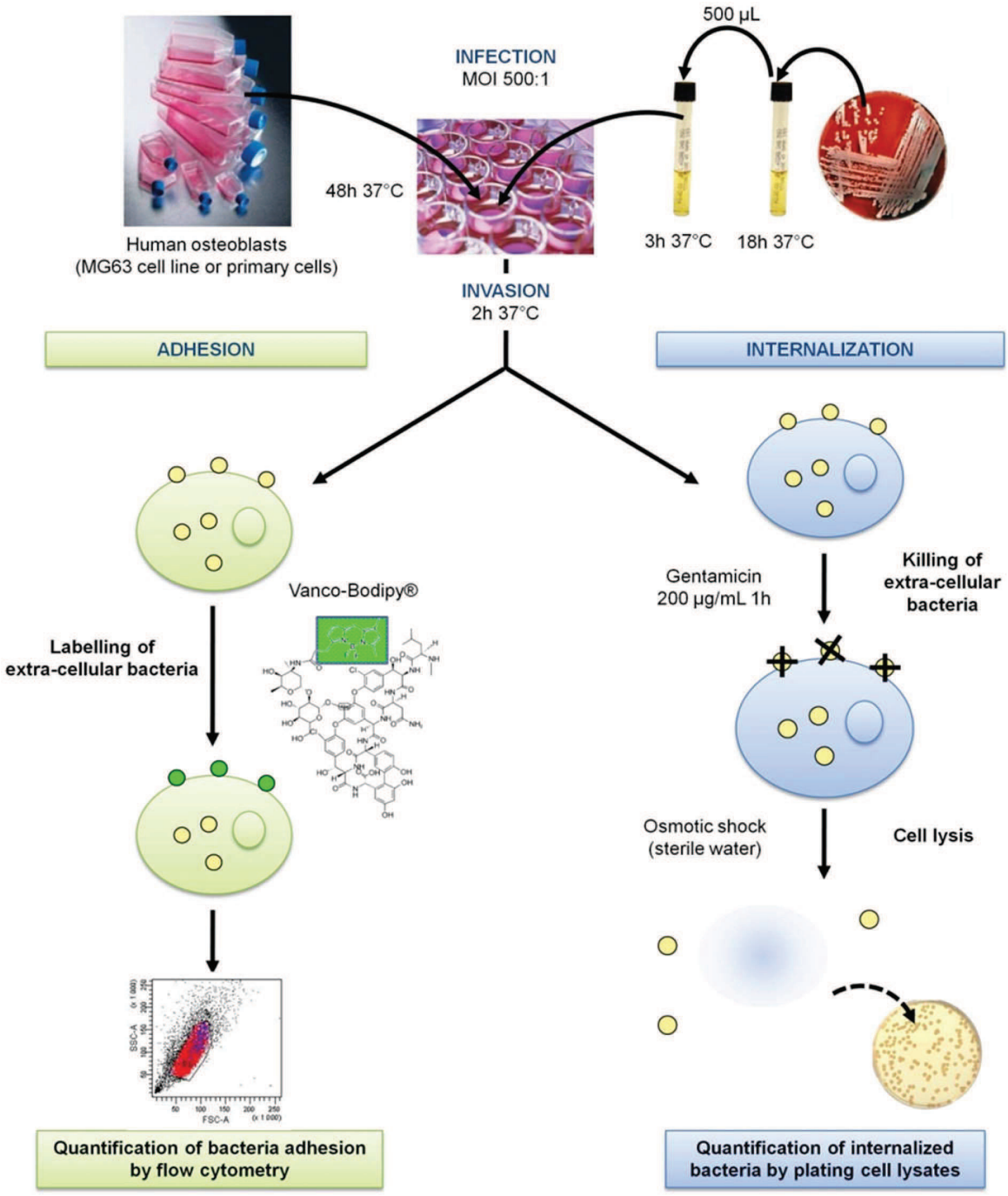


Figure 1. Gentamicin protection assay. MOI: Multiplicity of infection.
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g001

cellular debris and unbound bacteria. The fluorescence intensity marker (M) was set to include less than 2% of uninfected cells (negative control). The total number of bacteria was estimated as the mean fluorescence intensity of cells in M multiplied by the proportion of cells in M, which is represented in arbitrary fluorescence units (AFU) [13].

S. epidermidis Biofilm Formation

Biofilm formation was evaluated by a tissue culture plate method using crystal violet, which allows for a semi-quantitative measurement of mature biofilms [14]. After adjusting the OD_{600} of overnight bacterial suspensions at 1+/−0.05, they were diluted 1:100 in sterile BHI, and 100 µL of bacterial suspension were seeded in 96-well flat bottom plates (Becton Dickinson). Four wells were used for each isolate. Negative control wells contained BHI alone.

After 24 and 48 h of growth at 37°C, the contents of each well were gently removed, and the wells were washed three times with water to suppress the free-floating bacteria. Biofilms formed by adherent bacteria were fixed with 100 µL of 99% methanol (VWR International, Briare, France) per well for 20 min and air dried for 1 h under a chemical hood. Fixed bacteria were colored with 100 µL of 0.1% crystal violet (Merck, Fontenay-sous-bois, France) per well for 10 min, and excess stain was rinsed off by washing five times with water before air-drying. Dye bound to the biofilm was resolubilized with 100 µl of 33% acetic acid (VWR International) per well. The OD_{490} was measured in each well with a micro ELISA Auto Reader, Model 680 (BioRad, Hercules, USA). Tests were performed in triplicate, and an average OD_{490} value was calculated for each strain and for the negative controls. Finally, the OD_{490} value of the tested strain was expressed as an average OD_{490} value of the tested strain normalized to the control OD_{490} value.

The ability to form biofilms was also explored using the BioFilm Ring test (BioFilm Control, Saint Beauzire, France), as described by Chavant et al [15]. Briefly, this technique includes the immobilization of magnetic beads embedded in bacterial aggregates following biofilm formation. After adjusting the OD_{600} of overnight bacterial suspensions at 1+/−0.05, the suspensions were diluted 1:250 in fresh BHI and mixed with 1% of tonner solution corresponding to a magnetic bead suspension. The mixtures were homogenized, and 200 µl were deposited in each well of a 96-well microplate (12 8-well polystyrene strips). Each strain was cultured in duplicate. Every 2 h for 24 h, wells of one plate were covered with 100 µl of contrast solution (white opaque oil). The entire strip was placed for 1 min on a dedicated block test (magnet support) for magnetization contact and scanned with the plate reader to obtain an image for each well. During magnetization contact, free beads were attracted to the center of the bottom of wells and formed a spot, but beads blocked within the biofilm remain in suspension. The BioFilm Control software (BioFilm Elements) analyzes the images of each well before and after magnetization and calculates a value termed the BioFilm Index (BFI). Each observed BFI (BFI_o) was normalized to a proportion of immobilized beads (RBI for Relative Bead Immobilization) compared with controls with ($BFI_{reference}$) and without ($BFI_{minimal}$) beads using the following formula: $RBI = [(BFI_{reference}\text{-}BFI_o)/(BFI_{reference} - BFI_{minimal})]^{0.5}$.

Molecular Characterization by Pulsed-field Gel Electrophoresis

Staphylococcus epidermidis isolates were submitted to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis to assess their genetic diversity. Genomic DNA was extracted from log-phase cultures grown for 2 h in BHI broth, prepared in low-melting point agarose plugs (InCert agarose, Lonza, Basel, Switzerland) and digested with the endonuclease *Sma*I (Roche, Rosny-sous-bois, France). DNA fragments were resolved on a 1% agarose gel (SeaKem agarose, Lonza, Basel, Switzerland) with a contour-clamped homogeneous electric field apparatus GenePath (BioRad, Marnes-la-coquette, France) at 6 V/cm with switching times ramped from 5 to 35 s for 20 h at 14°C. Gels were stained with Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, USA). PFGE profiles and phylogenic analysis were performed with the GelCompar II software included in Bionumerics from Applied Maths (Kortrijk, Belgium). A dendrogram was generated using the Pearson correlation coefficient and by clustering using the unweighted pair group method analysis (UPGMA) with average linkages at a maximum position tolerance of 2%. The PFGE profiles were interpreted according to the criteria of Tenover et al. Isolates with DNA fingerprints differing by more than three bands and a similarity of less than 80% provided by the dendrogram analysis were interpreted as different PFGE types.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were used to estimate the frequencies of the study variables, which are described as the means and standard deviations. Differences between colonizing and infective strains were analyzed using the Mann-Whitney U tests, except for the Biofilm Ring test kinetic of biofilm formation, which was assessed by a two-way ANOVA test. A value of $p<0.05$ was significant. All analyses were performed using XLSTAT v.2011.1.02 (Addinsoft).

Results

Internalization of S. epidermidis in Human Osteoblasts

MG63 osteoblasts were infected with increasing MOIs of the reference strain NCTC11047 (fig. 2A), and the results demonstrated that the number of bacteria that are internalized was MOI-dependent, where more *S. epidermidis* was internalized when the MOI rose from 250:1 to 500:1. Based on these results, the MOI of 500:1 was chosen for all further invasion experiments. The ability of each of the clinical *S. epidermidis* strains to invade MG63 osteoblasts was evaluated in triplicate using a gentamicin protection assay. No difference in the osteoblast invasion rate was observed between colonizing and orthopedic device infection strains, where the numbers of internalized bacteria were 308+/−631 and 347+/−431 CFU/well, respectively, corresponding to 0.0008+/−0.0013% and 0.0004+/−0.0005% of the inoculums ($p = 0.973$) (fig. 2B). The internalization rate of the reference strain *S. epidermidis* NCTC11047 was estimated at 5165+/−2748 CFU/well (0.013+/−0.009% of the inoculums). The internalization rate of *S. aureus* 8325-4 was estimated at 0.37+/−0.20% of the inoculums.

To exclude a bias due to a "cell line effect", this low internalization rate of *S. epidermidis* in MG63 cells was confirmed using primary bone cells by testing the invasion ability of the reference strain NCTC11047 (0.0018+/−0.002%) and a randomly-chosen clinical strain (0.0001+/−0.0002%) (fig. 2C).

Adhesion of S. epidermidis to Human Osteoblasts

Given the low rate of invasion observed for *S. epidermidis* and that adhesion is a prerequisite for internalization, we assessed the ability of six randomly selected *S. epidermidis* clinical strains to adhere to MG63 osteoblasts. *S. epidermidis* NCTC11047 and *S. aureus* 8325-4 were used as controls (fig. 3 and 4). The AFU for the NCTC11047 reference strain and clinical strains were 3.38+/−1.1 and 6.04+/−3.8, respectively, corresponding to 4.5% +/−1.3% and 6.7% +/−3.4% of cells bearing bacteria. No significant differences between nasal colonizing ($n = 3$) and infective ($n = 3$) strains were observed ($p = 0.513$). For comparison, the AFU obtained for *S. aureus* was higher at 158.5+/−4.93, corresponding to 61.7% of cells associated with bacteria. As expected, the background fluorescence control (uninfected cells) was low (AFU = 1.6).

Biofilm Formation

The Biofilm Ring test was used to assess the early biofilm-forming ability of the clinical *S. epidermidis* strains. No differences were observed between the nasal colonizing and infective strains (two-way ANOVA, $p = 0.81$), and the results agreed with those observed for the reference strain NCTC11047. All strains produced biofilms and completely immobilized the beads after 8 to 12 hours (fig. 5A). For comparison, in our experimental

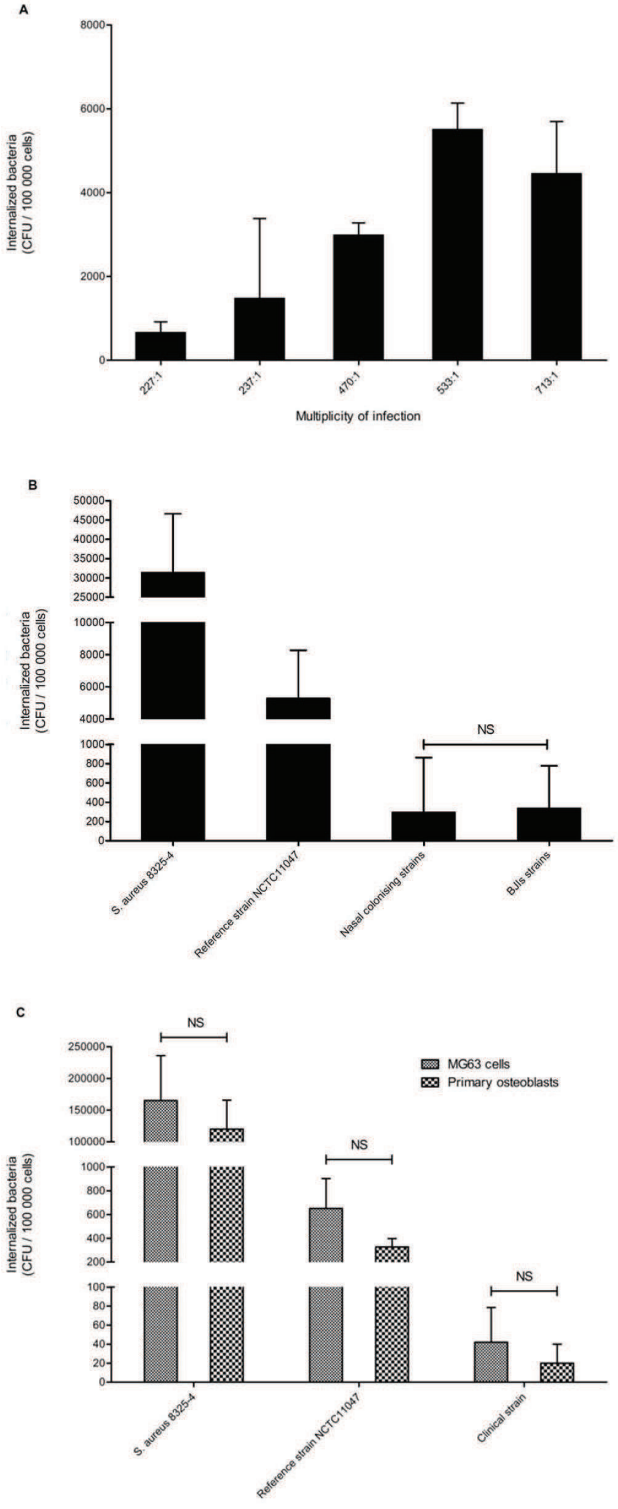


Figure 2. Invasion of human osteoblasts by *S. epidermidis* clinical isolates. A. Determination of the optimal multiplicity of infection (MOI) for use in osteoblast invasion assays (reference strain NCTC11047). B. Evaluation of the rate at which *S. epidermidis* strains invade the MG63 osteoblastic cell line for nasal colonization (n = 22) versus orthopedic infection (n = 15) isolates. C. Comparison of the invasion rate in MG63 osteoblastic cells and primary human osteoblasts for *S. aureus* 8325-4, *S. epidermidis* NCTC11047, and one randomly chosen *S. epidermidis* clinical isolate. Data are represented as the means and standard deviations of three replicate cultures from one gentamicin protection assay. NS: Not significant.
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g002

conditions, *S. aureus* 8325-4 completely immobilized the beads in less than 4 hours as did most of the clinical *S. aureus* isolates (data not shown).

Similarly, the crystal violet staining method revealed no differences in mature biofilm-forming ability between the two groups at 24 h ($p = 0.051$) and 48 h ($p = 0.93$) (fig. 5B).

Genetic Diversity: Pulse-field Gel Electrophoresis (PFGE) Patterns Analysis

The 38 *S. epidermidis* isolates exhibited 34 *Sma*I PFGE types, demonstrating a high genetic diversity between the tested strains (fig. 6). One strain remained resistant to the *Sma*I restriction enzyme and was assigned a specific non-restricted profile.

Discussion

Our study investigated whether internalization in osteoblasts and biofilm formation represented virulence factors that could discriminate *S. epidermidis* strains causing orthopedic device infections from colonizing ones. No differences were demonstrated between the two clinical populations (nasal versus orthopedic device infection strains) concerning their ability to invade MG63 osteoblastic cell lines. Similarly, biofilm formation, measured in its early and late phases by the Biofilm Ring test and crystal violet staining method, respectively, failed to discriminate these two isolate groups. Molecular typing of all strains by PFGE demonstrated a great diversity within the tested strains, which excluded the possibility that a low diversity was contributing to the absence of observed differences.

Some limitations of this study must be addressed. First, the selective use of gentamicin-susceptible isolates due to technical requirements to evaluate bone cells invasion using a gentamicin protection assay may have introduced a selection bias. Indeed, strains that may have acquired specific virulence factors associated with gentamicin resistance were excluded. However, we did not observe support for such a hypothesis in the published literature, so we consider that this bias likely does not alter our results. Second, based on the physiopathological model of *S. epidermidis* orthopedic device infection, colonizing strains from skin would have been more appropriate than from nares. Again, we did not identify any data that has demonstrated that colonizing *S. epidermidis* strains differed according to the site of carriage.

Several studies have attempted to identify features that distinguish invasive and pathogenic *S. epidermidis* strains from colonizing ones by mostly focusing on specific virulence factors. The IS256 mobile element has been epidemiologically related to *S. epidermidis* infecting isolates and proposed as a molecular marker for invasive strains [16,17]. This insertion sequence has been identified in 26 out 32 prosthetic joint infection isolates, whereas only one of the commensal strains harbored it [17]. Moreover, Gu et al. reported that insertion of IS256 within the *agr* locus in clinical isolates decreased *agr* expression and consequently induced a global disruption of staphylococcal virulence factors that finally enhanced the success of *S. epidermidis* during infection of indwelling medical devices [16]. The role of the IS256 element in infection has also been attributed to its potential direct impact on biofilm formation due to its insertion within the poly-N-acetyl-glucosamine (PNAG)/polysaccharide intercellular adhesin (PIA) gene [18], which allows for the production of mature biofilms. Given that the production of PNAG/PIA is also regulated by the *ica*-

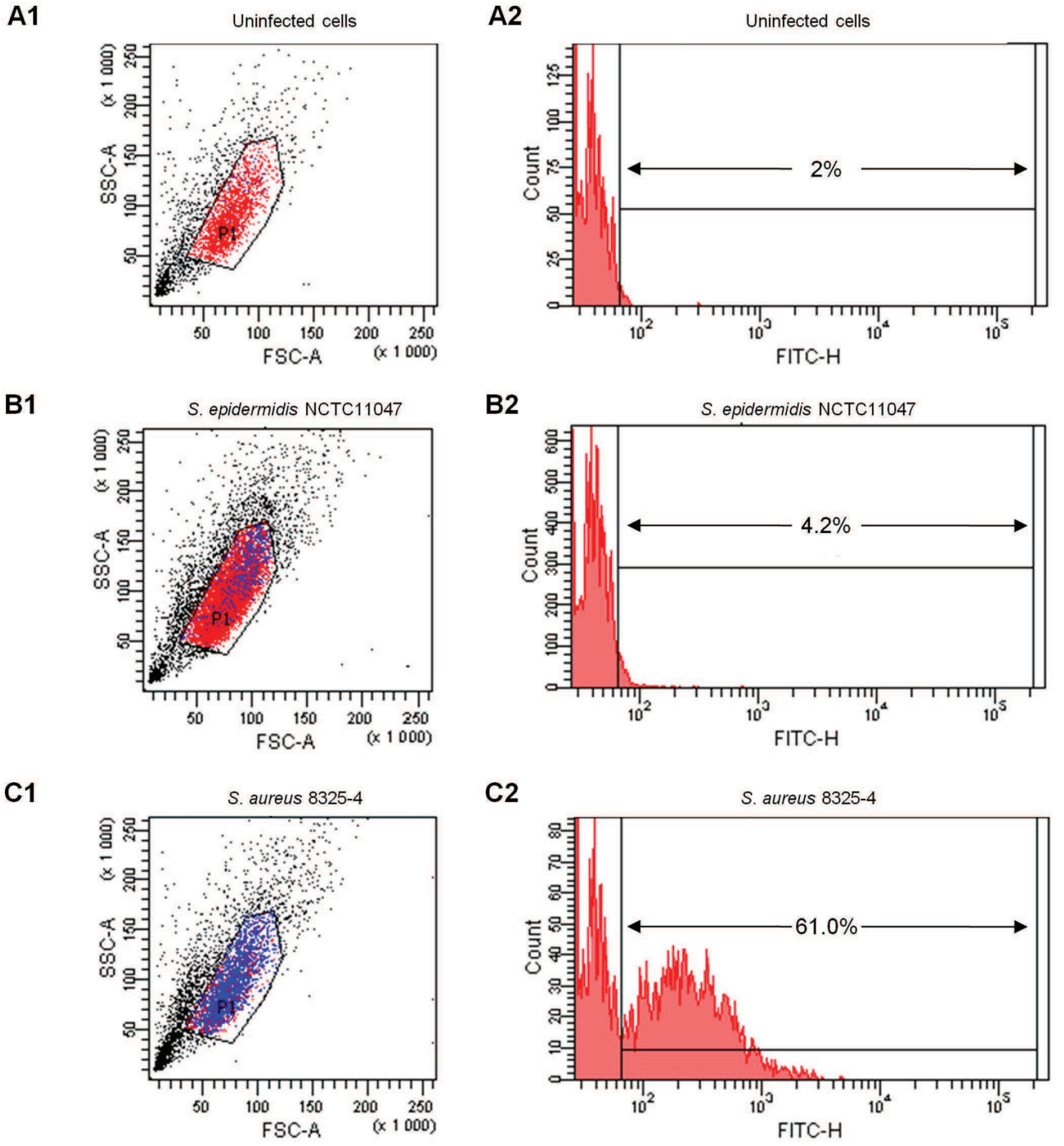
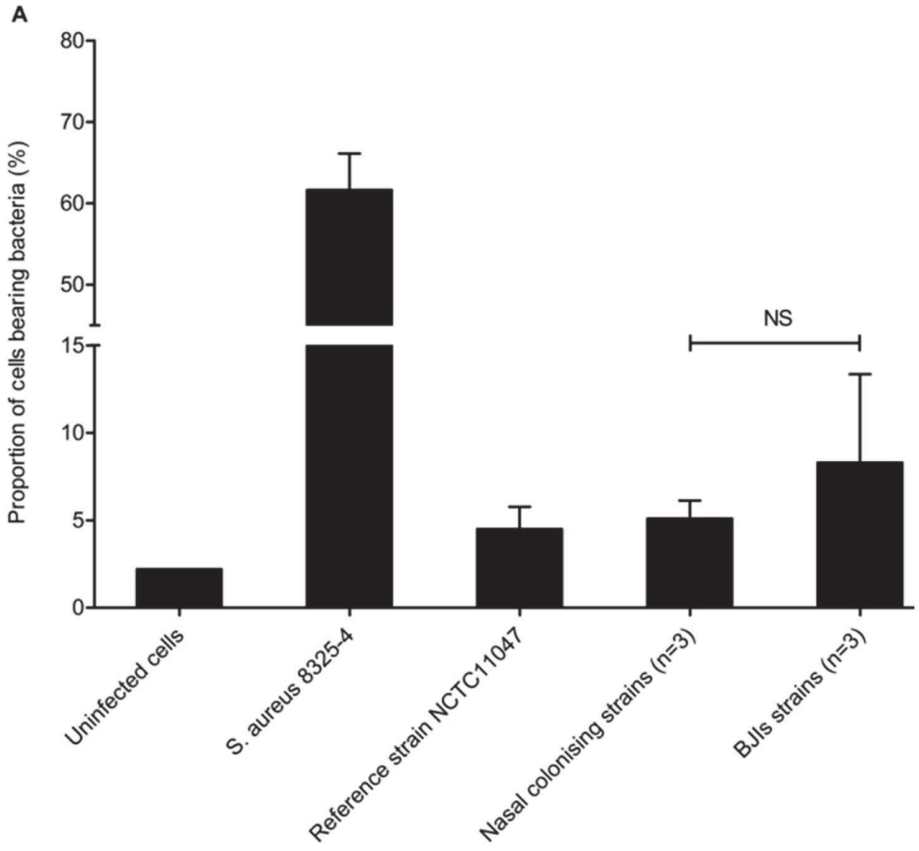


Figure 3. Flow cytometric quantification of adhesion to MG63 osteoblasts by *S. epidermidis*. Flow cytometry analysis was performed using an FSC/SSC stopping gate with uninfected cells (A1), with a fluorescence intensity marker M set to include <2% of uninfected cells (A2). The results from the original cytogram (1) and the distribution of FL1-positive events (2) of a representative experiment are shown, including the reference strains *S. epidermidis* NCTC1147 (B) and *S. aureus* 8325-4 (C).
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g003

operon genes, this operon has been proposed as a discriminating marker between *S. epidermidis* strains responsible for infection and colonization [19]. This marker was detected in 54 *S. epidermidis* strains collected from patients with bone and joint infections (81.5%), whereas only 17.4% of commensal isolates (n = 23) harbored this operon ($p<0.01$) [19]. Nevertheless, PNAG/PIA has been excluded as the unique pivotal factor for biofilm formation, and isolates lacking *ica* operon have been demonstrated to form biofilms through other adhesion proteins such as biofilm-associated protein (BAP) or accumulation-associated protein (AAP) [20]. More globally, if biofilms, and consequently most biofilm-associated virulence factors, participate in pathogenesis, they are


A
Proportion of cells bearing bacteria (%)
80
70
60
50
15
10
5
0
NS
Uninfected cells
S. aureus 8325-4
Reference strain NCTC11047
Nasal colonising strains (n=3)
BJIs strains (n=3)

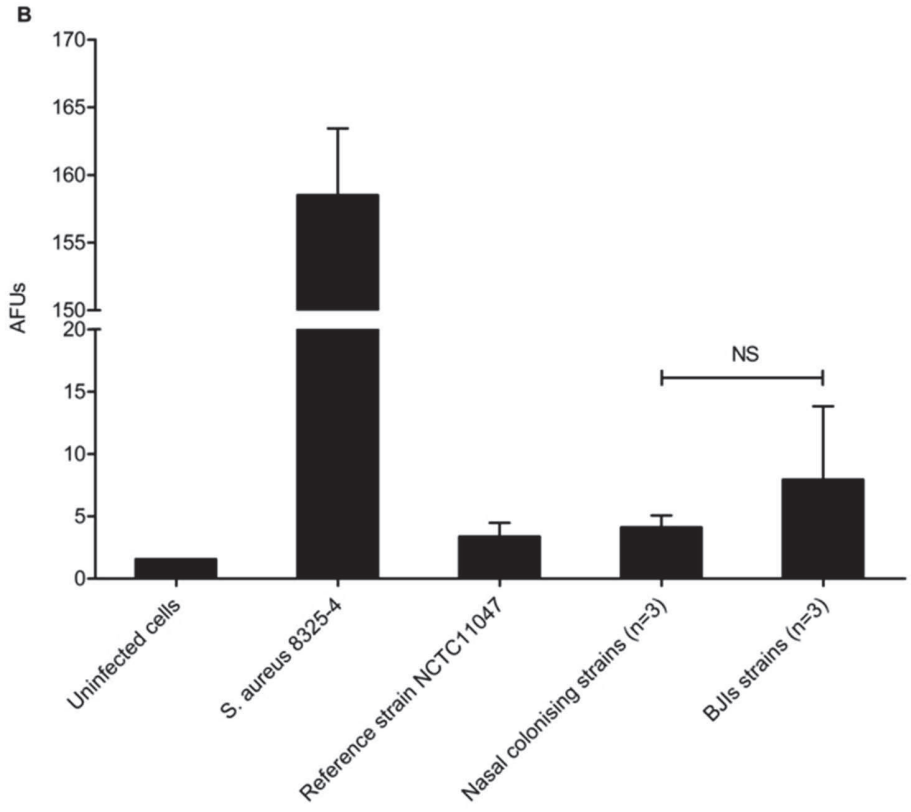
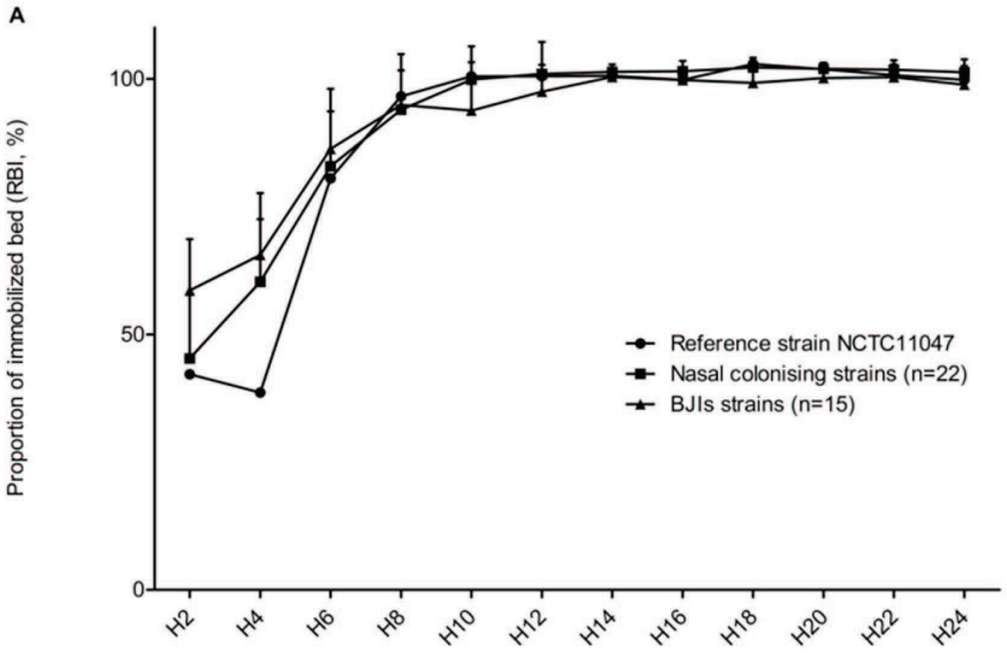

B
AFUs
170
165
160
155
150
20
15
10
5
0
NS
Uninfected cells
S. aureus 8325-4
Reference strain NCTC11047
Nasal colonising strains (n=3)
BJIs strains (n=3)

Figure 4. Quantification of *S. epidermidis* adhesion to MG63 osteoblasts. After 2 h of co-culture of MG63 osteoblasts with infective and colonizing *S. epidermidis* strains (n = 3 each) and *S. aureus* strains at an MOI of 500:1 and 100:1, respectively, adhered bacteria were labeled using the membrane-impermeable fluorochrome BODIPY FL vancomycin. The results are presented as the means and standard deviations of the proportion of cells bearing bacteria (A) and of arbitrary fluorescence units (AFUs) (B).
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g004



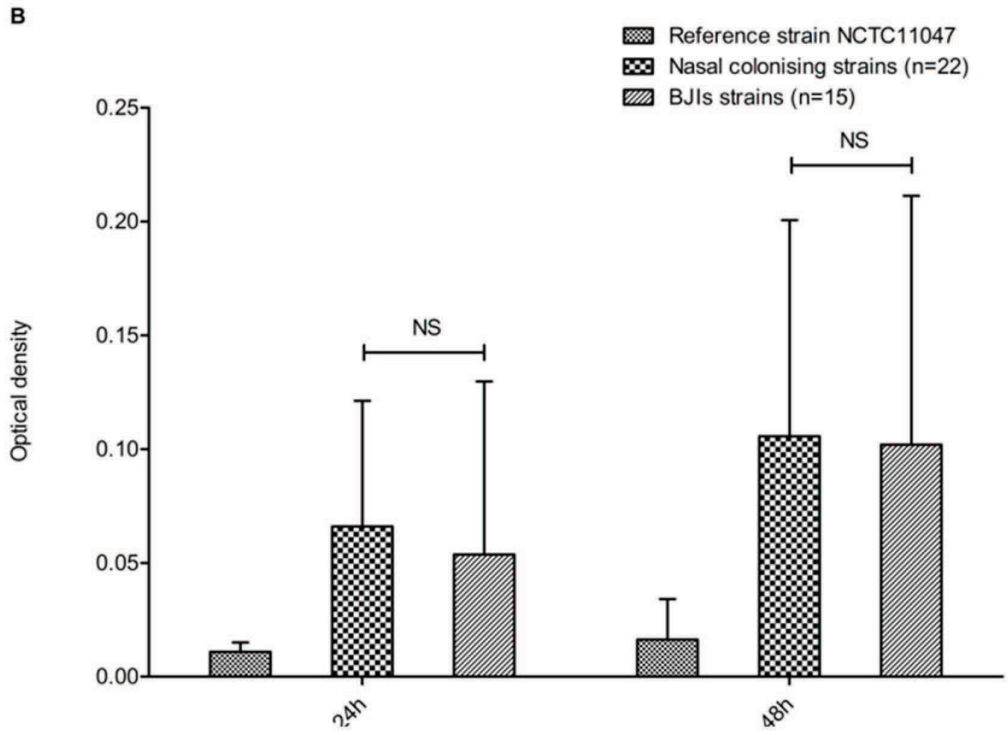


Figure 5. Evaluation of biofilm-formation ability of *S. epidermidis* clinical isolates. A. Kinetics of early biofilm formation was assayed by the Biofilm Ring Test method for the reference strain NCTC11047 and for infective (n = 15) and colonizing (n = 22) *S. epidermidis* strains. B. Quantification of mature biofilm formation after 24 and 48 h by the crystal violet staining method for the *S. epidermidis* reference strain NCTC11047 and 37 clinical isolates.
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g005

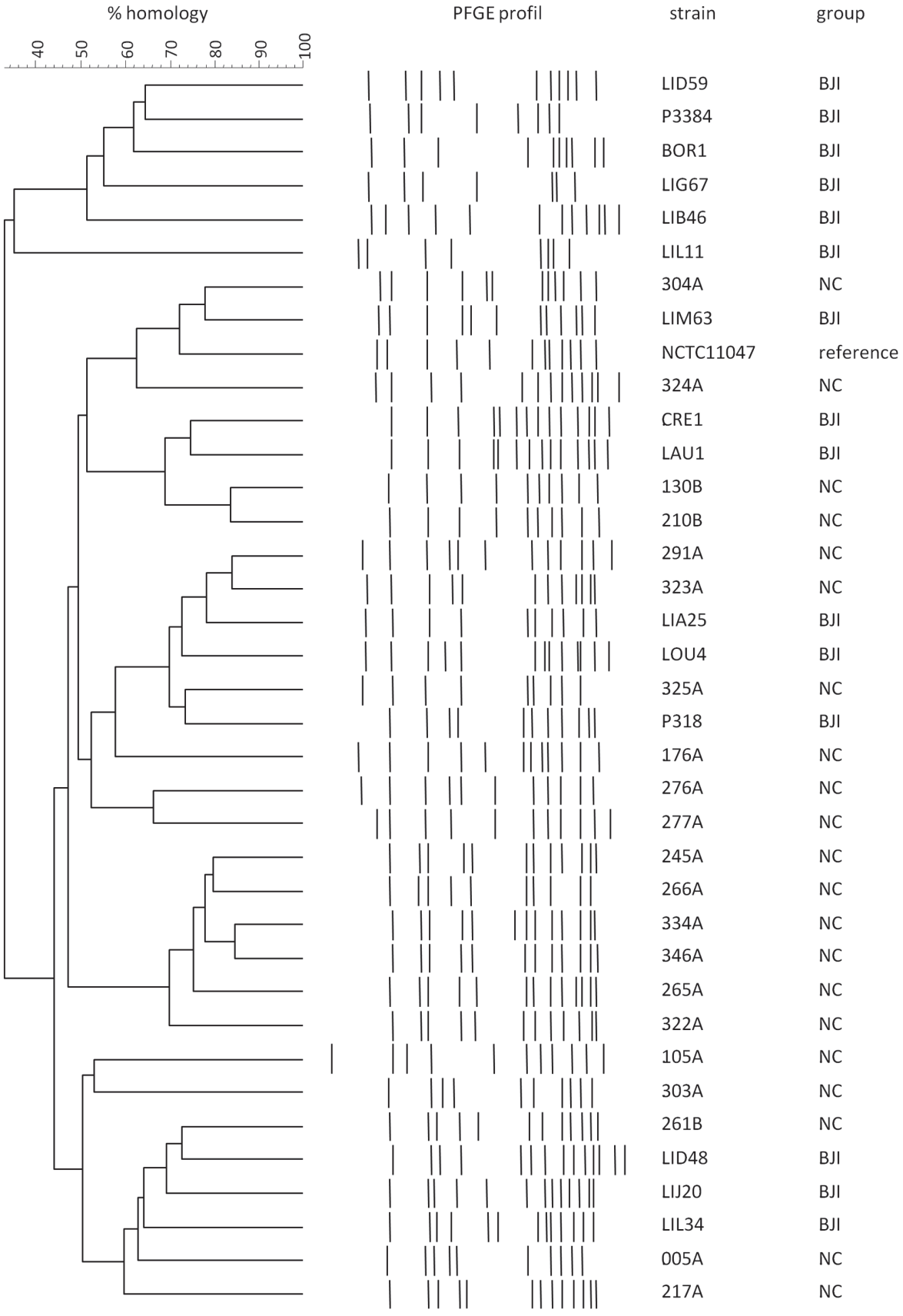

% homology
40
50
60
70
80
90
100
PFGE profil
strain
group
LID59 BJI
P3384 BJI
BOR1 BJI
LIG67 BJI
LIB46 BJI
LIL11 BJI
304A NC
LIM63 BJI
NCTC11047 reference
324A NC
CRE1 BJI
LAU1 BJI
130B NC
210B NC
291A NC
323A NC
LIA25 BJI
LOU4 BJI
325A NC
P318 BJI
176A NC
276A NC
277A NC
245A NC
266A NC
334A NC
346A NC
265A NC
322A NC
105A NC
303A NC
261B NC
LID48 BJI
LIJ20 BJI
LIL34 BJI
005A NC
217A NC

Figure 6. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern analysis. The number on horizontal lines indicates the percentage of homology by the Pearson correlation. BJI: Bone and joint infective strains; NC: Nasal carriage stains. One strain remained resistant to *Sma*I digestion and was assigned a specific non-restricted profile.
doi:10.1371/journal.pone.0067240.g006

also likely involved in maintaining species in a commensal state. For example, the importance of adhesins and proteins involved in the physiological biofilm formation (such as PNAG/PIA) during skin and mucous membrane colonization, where bacteria are subjected to significant mechanical forces, has been thoroughly demonstrated [21]. This finding could explain why numerous other studies have shown that invasive and commensal *S. epidermidis* strains could not be distinguished on the basis of their virulence factors [21–23], which supports the hypothesis of some authors of an accidental origin of infection from colonizing strains.

An unexpected insight from our study is the difference in bone cell invasion rates between the *S. epidermidis* and *S. aureus* strains. In 2007, Khalil et al. suggested a role for osteoblast invasion in the pathogenesis of *S. epidermidis* bone and joint infections based on the results from a limited number of clinical isolates (n = 4), which included only one bone-infective strain [12]. Here, we describe the first evaluation of the ability of a large collection of clinical *S. epidermidis* strains to invade bone cells. We demonstrated an extremely low internalization rate, 0.006% of the inocula, compared to 0.5 to 5%, which was classically observed for *S. aureus* in the same model. The particular nature of cell lines that are classically associated with the loss of some phenotypic characters led us to consider a possible "cell line effect" that may not reflect the *in vivo* reality [24]. Therefore, we repeated experiments on primary human osteoblasts, which yielded concordant results and confirmed the low ability of *S. epidermidis* to be internalized by cultured human osteoblasts in our model. As *S. aureus* adhesion to osteoblasts (via the staphylococcal fibronectin-binding protein (FnBP) interaction with cellular $\alpha5\beta1$ integrin) had been shown as necessary and sufficient for its internalization [6], we explored this step of the osteoblast - *S. epidermidis* interaction. Our results demonstrated that *S. epidermidis* adhered to osteoblasts at an extremely low rate. Nevertheless, the flow cytometric-based approach only evaluates strong interactions, such as $\alpha5\beta1$ integrin/FnBP. As FnBP are absent in *S. epidermidis*, the mechanisms of cell adhesion may be different. However, this does not challenge the results observed in the *S. epidermidis* internalization model, as the method quantifying bone cell invasion is independent of interaction type. Our data also suggest that internalization within osteoblasts is a less important pathophysiological mechanism for *S. epidermidis* orthopedic device infections than for *S. aureus*. Similarly, this mechanism seems to be more important in other clinical contexts involving *S. epidermidis*, such as bovine mastitis or urinary or endovascular infections. Indeed, several studies have demonstrated a high *S. epidermidis* internalization rate within endothelial [25], urothelial [26] or bovine mammary epithelial cells [27,28]. Given that *S. epidermidis* is a universal commensal that expresses virulence factors that do not necessarily differ depending on the site of infection, it would be interesting to evaluate strains that are highly internalized in epithelial mammary cells in the context of our osteoblast infection model and vice versa. This proposal is supported by the Khalil et al. study, which demonstrated that a strain isolated from peritonitis was more internalized by osteoblasts that the bone-infective strain [12]. Nevertheless, it may be misleading to compare data from different protocols obtained with different cell lines and strains. A cross-comparison of the strains used in both models is ongoing and should reveal whether the phenomenon is dependent on the cell or bacterial type.

Conclusions

The abilities of *S. epidermidis* to internalize in osteoblasts and to form biofilms failed to distinguish *S. epidermidis* strains isolated from infected orthopedic devices from nasal carriage isolates. These results support the hypothesis that *S. epidermidis* infections are an accidental event arising from the commensal flora, which colonize and infect strains that are clustered in a single microbiological entity. Given that a sub-group of patients with a higher risk of surgical site infection could not be detected based on the virulence of their *S. epidermidis* colonizing strains, only strict surgical asepsy may be able to reduce the incidence of *S. epidermidis* orthopedic device infections.

Our study provides the first assessment of the interaction between osteoblasts and a collection of clinical *S. epidermidis* strains responsible for bone and joint infections. Given our results obtained in our *ex vivo* models, internalization of *S. epidermidis* in human osteoblasts is not a likely major pathophysiological mechanism in orthopedic device infections, contrary to what is observed in other clinical situations, such as bovine mastitis or endovascular infections, or with other pathogens, such as *S. aureus*.

Acknowledgments

Lyon Bone and Joint Infection Study Group: Physicians – *Tristan Ferry, Thomas Perpoint, André Boibieux, François Biron, Florence Ader, Anissa Bouaziz, Judith Karsenty, Fatiha Daoud, Johanna Lippman, Evelyne Braun, Marie-Paule Vallat, Patrick Miailhes, Florent Valour, Christian Chidiac, Dominique Peyramond*; **Surgeons** – *Sébastien Lustig, Franck Trouillet, Philippe Neyret, Olivier Guyen, Gualter Vaz, Christophe Lienhart, Michel-Henry Fessy, Cédric Barrey*; **Microbiologists** – *Frédéric Laurent, François Vandenesch, Jean-Philippe Rasigade*; **Nuclear Medicine** – *Isabelle Morelec, Emmanuel Deshayes, Marc Janier, Francesco Giammarile*; **PK/PD specialists** – *Michel Tod, Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle*; **Clinical Research Assistant** – *Marion Martinez*

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FV STA JPR FL. Performed the experiments: FV STA. Analyzed the data: FV JPR HM TF FL. Contributed reagents/materials/analysis tools: FV JPR SL HM EC ST FV JE. Wrote the paper: FV STA TF FL.

References

1. Otto M (2009) Staphylococcus epidermidis–the 'accidental' pathogen. Nature reviews 7: 555–567.
2. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE (2004) Prosthetic-joint infections. New Engl J Med 351: 1645–1654.
3. Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. Lancet 364: 369–379.
4. Uckay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, et al. (2009) Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis (2009) Ann Med 41: 109–119.
5. Schierholz JM, Beuth J (2001) Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. J Hosp Infect 49: 87–93.
6. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, et al. (1999) Mechanisms of Staphylococcus aureus invasion of cultured osteoblasts. Microbial pathog 26: 317–323.
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318–1322.
8. Fey PD, Olson ME (2010) Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. Future Microbiol 5: 917–933.
9. Hall-Stoodley L, Stoodley P (2009) Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol 11: 1034–1043.

10. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME (2008) Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunol Med Microbiol 52: 13–22.
11. Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere AM, Bes M, et al. (2011) Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30: 343–354.
12. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, et al. (2007) Invasion of bone cells by Staphylococcus epidermidis. Microbes Infect 9: 460–465.
13. Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Vandenesch F, et al. (2011) A novel flow cytometry-based assay for the quantification of Staphylococcus aureus adhesion to and invasion of eukaryotic cells. J Microbiol Methods 86: 145–149.
14. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, et al. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Apmis 115: 891–899.
15. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hebraud M, Bernardi T (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods 68: 605–612.
16. Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, et al. (2005) Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of Staphylococcus epidermidis. J Hosp Infect 61: 342–348.
17. Koskela A, Nilsdotter-Augustinsson A, Persson L, Soderquist B (2009) Prevalence of the ica operon and insertion sequence IS256 among Staphylococcus epidermidis prosthetic joint infection isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28: 655–660.
18. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lossner I, Gotz F, et al. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in Staphylococcus epidermidis: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Mol Microbiol 32: 345–356.
19. Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Rydèn C, El Solh N (2000) Screening for Staphylococcus epidermidis markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint protheses. J Infect Dis 182: 351–355.
20. Tormo MA, Knecht E, Gotz F, Lasa I, Penades JR (2005) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? Microbiology 151: 2465–2475.
21. Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstkotte MA, et al. (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. J Clin Microbiol 42: 5614–5619.
22. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M (2005) Genomewide analysis of gene expression in Staphylococcus epidermidis biofilms: insights into the pathophysiology of S. epidermidis biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. J Infect Dis 191: 289–298.
23. Yao Y, Sturdevant DE, Villaruz A, Xu L, Gao Q, et al. (2005) Factors characterizing Staphylococcus epidermidis invasiveness determined by comparative genomics. Infect Immun 73: 1856–1860.
24. Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, et al. (2004) Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. Anticancer Res 24: 3743–3748.
25. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Gotz F, Peters G, et al. (2010) A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. Cell Microbiol 12: 1746–1764.
26. Pils S, Schmitter T, Neske F, Hauck CR (2006) Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry. J Microbiol Methods 65: 301–310.
27. Almeida RA, Oliver SP (2001) Interaction of coagulase-negative Staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells. Microb Pathog 31: 205–212.
28. Anaya-Lopez JL, Contreras-Guzman OE, Carabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, Lopez-Meza JE, et al. (2006) Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. Res Vet Sci 81: 358–361.

V. Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* : épidémiologie moléculaire

Les infections nosocomiales et l'émergence de clones communautaires de SARM constituant des enjeux majeurs de santé publique, la grande majorité des études cliniques et fondamentales sur les IOA à *S. aureus* portent sur les souches résistantes à la méticilline. En particulier, la corrélation entre l'internalisation dans les ostéoblastes et la chronicité des IOA a été démontrée dans notre laboratoire à partir des principaux clones de SARM circulants [324]. De plus, l'importante clonalité des SARM et l'association des clones communautaires et nosocomiaux à des entités cliniques relativement homogènes a rendu possible une corrélation bactério-clinique sans avoir accès à des données cliniques extensives. Toutefois, les SASM restent très majoritairement représentés dans les IOA, y compris sur matériel. Nous avons donc souhaité confirmer les résultats obtenus avec les SARM en utilisant une collection de souches cliniques de SASM responsables d'IOA.

Tous les patients porteurs d'une IOA à SASM suivi dans le CRIOAC des Hospices Civils de Lyon entre 2001 et 2011 ont été considérés pour l'inclusion dans notre cohorte. Conformément aux recommandations actuelles, le diagnostic d'IOA était basé sur l'existence de signes cliniques, radiologiques et biologiques d'IOA, et d'au moins un prélèvement bactériologique de référence (i.e. ponction articulaire, prélèvement chirurgical et/ou hémoculture) positif à SASM [11–13]. Les dossiers cliniques ont été analysés et les informations pertinentes ont été recueillies dans une grille de recueil standardisée, incluant données démographiques, antécédents (résumés par l'index de comorbidités de Charlson [334]), type d'IOA, présentation clinique, biologique et radiologique, prise en charge médicale et chirurgicale, et évolution.

Deux cent onze patients ont ainsi été identifiés. Après analyse des dossiers cliniques, six ont été exclus du fait de données manquantes trop importantes, ainsi que trois patients porteurs d'une IOA de contiguïté sur mal perforant plantaire, du fait des caractéristiques physiopathologiques et de la prise en charge particulières de ces infections [28]. Parmi les 202 patients restant, 116 souches cliniques avaient été conservées. Les souches issues d'une récidive (n=19) et les souches de SCVs stables (n=2) ont été exclues. **Au final, 95 couples patients-souches ont été inclues, représentant 64 (67.4%) IOA aiguës (délai entre le début des symptômes et le diagnostic ≤ 4 semaines) et 31 (32.6%) IOA chroniques.**

La première étape d'analyse de cette collection a été de déterminer le fond génétique de ces souches de SASM.

La première méthode utilisée était basée sur la technique de référence du *spa typing*, consistant en l'amplification et au séquençage de la région X du gène de la protéine A (*spa*), hautement polymorphique, et porteuse de séquences nucléotidiques répétées. Le fond génétique est alors déterminé par la séquence, le nombre de répétitions et l'ordre de ces séquences répétées [335,336]. La seconde méthode a consisté en l'utilisation d'une puce à ADN, permettant la détection simultanée de 172 gènes de virulence et de résistance. L'analyse des informations fournies par la puce a également permis l'attribution d'un complexe clonal, comme décrit précédemment [337].

Comme attendu pour une collection de SASM, le screening de notre collection a mis en évidence une importante diversité génétique, retrouvant 17 complexes clonaux différents, dont 7 incluaient au moins 5 souches différentes. Ce résultat était concordant avec la seule étude rapportant une analyse de clonalité des SASM responsables d'IOA menée en Allemagne en 2005-2006 [338]. Cette étude mettait également en avant une grande diversité génétique, et retrouvait les mêmes clones prédominant (CC8, CC45 et CC30 notamment). Toutefois, un élément marquant a été la constatation de 9 souches (9.5%) appartenant au complexe clonal 398 (CC398). Ce clone de SASM n'avait en effet jamais été décrit dans les IOA. En revanche, son homologue résistant à la méticilline est mis en avant depuis une dizaine d'années comme le principal représentant des clones de SARM émergent du réservoir animal [339,340]. Initialement décrit comme colonisant de nombreuses espèces animales, le SARM CC398 a secondairement été associé à de nombreuses infections humaines [340]. Une étude moléculaire récente a mis en évidence que ce clone de SARM pourrait en fait provenir d'un SASM CC398 humain [339], peu décrit chez l'animal mais associé à la colonisation humaine de 0.2 à 3.7% de la population, et à diverses situations pathologiques telles que les infections respiratoires, de la peau et des tissus mous, des endocardites infectieuses et des bactériémies [341–344]. Enfin, sur les 9 SASM CC398 de notre collection (2001-2011), 8 provenaient de souches isolées à partir de 2009, évoquant une émergence récente de ce clone.

Afin de mieux caractériser ce phénomène, nous avons voulu mener une étude épidémiologique plus large, incluant 485 souches de SASM isolées d'IOA et 348 SASM responsables de portage nasal dans 5 centres français. Les collections de ces différents centres ont été criblées à l'aide d'une PCR spécifique du clone CC398, amplifiant le gène *sau1-hsdS1*, comme précédemment décrit [345].

RESEARCH NOTE 10.1111/1469-0691.12567

Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clonal complex 398: high prevalence and geographical heterogeneity in bone and joint infection and nasal carriage

F. Valour[1,2,3,*], J. Tasse[3,*], S. Trouillet-Assant[3], J.-P. Rasigade[1,3], B. Lamy[4], E. Chanard[5], P. Verhoeven[6], J.-W. Decousser[7], H. Marchandin[4], M. Bès[3,8,9], C. Chidiac[2,3], F. Vandenesch[3,8,9], T. Ferry[2,3] and F. Laurent[1,3,8,9] on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection study group[†]

1) *Bacteriology Department, Groupement Hospitalier Nord,* 2) *Infectious Diseases Department, Hospices Civils de Lyon,* 3) *International Centre for Research in Infectious Diseases, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon,* 4) *Bacteriology Department, Montpellier University Hospitals, Montpellier,* 5) *Bacteriology Department, Novescia, Lyon,* 6) *Bacteriology Department, Saint Etienne University Hospitals, St Etienne,* 7) *Bacteriology Department, Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris,* 8) *Bacteriology Department, Groupement Hospitalier Est, and* 9) *French National Reference Centre for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France*

Abstract

The prevalence of clonal complex (CC) 398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) was unexpectedly high among bone and joint infections (BJIs) and nasal-colonizing isolates in France, with surprising geographical heterogeneity. With none of the major, most-known staphylococcal virulence genes, MSSA CC398 BJI was associated with lower biological inflammatory syndrome and lower treatment failure rates.

Keywords: Clonal complex 398, bone and joint infection, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, molecular epidemiology, nasal carriage, virulence factors
Original Submission: 1 September 2013; **Revised Submission:** 15 December 2013; **Accepted:** 21 January 2014
Editor: P. Tassios
Article published online: 26 January 2014
Clin Microbiol Infect

Corresponding author: F. Valour, Laboratoire de Bactériologie, Groupement Hospitalier Nord, 103 Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France
E-mail: florent.valour@chu-lyon.fr

*These authors contributed equally to this work.
[†]Lyon Bone and Joint Infection study group members are given in Appendix 1.

In addition to being a frequent colonizing organism, *Staphylococcus aureus* is one of the leading causes of human suppurative infections, such as bone and joint infections (BJIs). Although wild isolates are susceptible to methicillin (methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA)), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates emerged from MSSA initially in hospital settings (so-called hospital-acquired MRSA) and then in the community (community-acquired MRSA) by acquiring the SCC*mec* element harbouring the *mec*A gene, which encodes a specific penicillin-binding protein (PBP2a). In the past 10 years, livestock has been described as a third MRSA reservoir (livestock-associated MRSA), notably because of the worldwide spread of MRSA of sequence type (ST) 398 or related STs clustered in clonal complex (CC) 398 [1,2]. Initially reported as an animal colonizer, MRSA CC398 has been shown to be responsible for various human infections [2]. Whole genome sequence analysis has provided evidence that this MRSA clone probably originated in humans as MSSA, and then jumped to livestock, where it acquired methicillin resistance-associated genes [1]. However, little is known about this MSSA CC398 counterpart. Poorly described in animals, this clone was recently reported in people lacking livestock-associated risk factors as a rare pathogen in various conditions such as bloodstream, respiratory tract and skin and soft tissue infections, and infective endocarditis in several countries, as well as a rare human nasal commensal [3–7]. However, the role of MSSA CC398 in BJIs has not been described.

To investigate MSSA CC398 in BJIs, we conducted a retrospective study of all patients with monomicrobial or polymicrobial MSSA BJI (i.e. clinical evidence of infection and at least one reliable MSSA-positive bacteriological sample) diagnosed in four French geographical areas between 2009 and 2012 (Fig. 1). Because nasal carriage of staphylococci is associated with a high risk of *S. aureus* infection, a control population of nasal-colonizing isolates was established in two of the participating centres, obtained by nasal sampling of patients admitted for orthopaedic surgery (excluding patients with BJIs) or in intensive-care units. *S. aureus* characterization was initially performed with the automated system Vitek-2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

A total of 485 isolates from patients with MSSA BJIs (Lyon, $n = 173$ (Hospices Civils de Lyon, $n = 75$; Novescia, $n = 98$); Montpellier, $n = 132$; Saint-Etienne, $n = 96$; Paris, $n = 84$) were screened by the use of CC398-specific PCR targeting the *sau1–hsdS1* gene, as previously described [8]. Within this MSSA BJI collection, 68 of the 485 isolates (14.0%) belonged to CC398. For comparison, 31 (9.0%) of the 346 nasal-colonizing MSSA isolates (Hospices Civils de Lyon, from 2010 to 2012,

©2014 The Authors
Clinical Microbiology and Infection ©2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

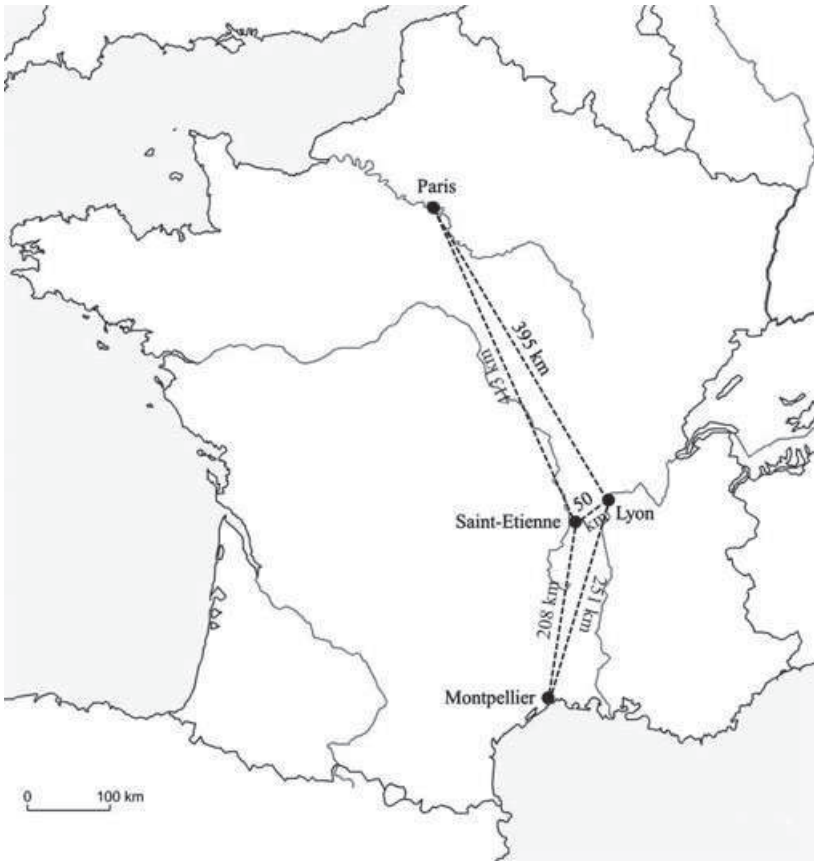


FIG. 1. Map showing the four geographical areas included in the study.

n = 228; Montpellier, 2012, *n* = 118) were CC398. Because most previous international staphylococcal clonal distribution studies have mainly focused on MRSA, it is difficult to determine whether this clone is emerging or has been neglected thus far. However, several facts argue for emergence. Concerning nasal-colonizing strains, CC398 accounted for only two of 829 (0.2%) MSSA isolates in a Dutch study published in 2008, and two of 52 (3.8%) Spanish MSSA isolates in 2009 [3,4]. With respect to BJIs, Luedicke *et al.* reported a high diversity of staphylococcal genetic backgrounds for the 2005–2006 period in Germany, with a distribution of the major CCs similar to that in our study, but no CC398 [9]. These differences may have been influenced by geographical area, but the hypothesis that this clone emerged and rapidly spread is supported by the fact that only one CC398 strain was identified in 2008 during screening of BJI MSSA strains isolated in our hospital in the period between 2001 and 2008 among 52 isolates (1.9%; p 0.081).

Surprisingly, heterogeneity in geographical distribution was observed. The prevalence of CC398 among MSSA BJI isolates was only 3.1% in Saint-Etienne, reached 10.4% in Lyon, and was as high as 19.0% in Paris and 23.5% in Montpellier. The frequency in Montpellier was significantly different from that observed in Saint-Etienne (p 0.002) and Lyon (p 0.009), and the frequency in Paris was different from that in Saint-Etienne (p 0.002) and Lyon (p 0.046). It is of note that the lower prevalence of MSSA CC398 was found in two cities that are close to each other (Lyon and Saint-Etienne; 50 km). Similarly, an important difference was observed in MSSA CC398 rate among nasal-colonizing isolates between Lyon (*n* = 9/228; 3.9%) and Montpellier (*n* = 22/118; 18.6%; p 0.013). This heterogeneity in geographical prevalence raises the question of the driving mechanism. It may lie in greater endemic diffusion in some areas, possibly related to specific routes of transmission, risk factors, and environmental conditions, or the emergence of subpopulations associated with the acquisition of particular genetic traits in other areas.

In an ancillary study, MSSA BJIs identified in our hospital (*n* = 75) between 2011 and 2012 were extensively characterized with respect to genetic background, virulence and resistance genes, and clinical characteristics. CC assignment on the basis of DNA microarray results (StaphyType; Alere, Jena, Germany) was in agreement with the CC398-specific PCR results [10,11]. As expected for the MSSA collection, a great diversity of CCs was observed (*n* = 20), among which CC398 was the fourth most common (*n* = 8; 10.7%), behind

©2014 The Authors
Clinical Microbiology and Infection ©2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*

CC30 (n = 12; 16.0%), CC5 (n = 10; 13.3%), and CC45 (n = 9; 12.0%). CC398 was associated with three different *spa* types, namely t571 (n = 6), t034 (n = 1), and t002 (n = 1). No significant differences were observed between CC398 and other strains with respect to demographic characteristics and the clinical presentation of BJIs (Table 1). Conversely, MSSA CC398 BJIs were significantly associated with a lower biological inflammatory syndrome (p 0.035) and lower treatment failure rates (0% vs. 37.3%, p 0.032). These results should be interpreted with caution, because of the large number of statistical tests performed and the small number of included cases of each clone. Nevertheless, this low virulence profile is in agreement with DNA microarray analysis revealing no particular resistance gene (except for an isolated resistance to macrolides related to the *ermT* gene), and none of the major, most well-known staphylococcal virulence genes, with the exception of one strain bearing the genes for enterotoxins C and L. This may also explain why this 'unspecialized' pathogen is associated with a large panel of diseases [3–7]. However, all strains harboured the *chp* and *scn* genes on a mobile genetic element belonging to the immune evasion cluster and β-haemolysin-converting bacteriophages and described as being associated with *S. aureus* human host specificity for the ST398 lineage that has been lost in the animal-adapted MRSA CC398 [1,12]. The presence of such mobile genetic elements provides evidence for the capacity of the MSSA CC398 clone to be highly receptive to horizontal gene transfer, which might lead to human and/or virulence adaptation. This hypothesis was recently confirmed by the emergence and spread of a Panton–Valentine leukocidin-positive CC398 subpopulation in Chinese skin and soft tissue infections, reaching 64.3% of CC398 isolates in a recent study [13]. This last report is very worrying; the acquisition of this hypervirulent phenotype by a clone that is well adapted to humans and able to be transmitted throughout the community (as demonstrated by high nasal colonization rates in some areas) may have a major impact on public health, and warrants regular monitoring.

TABLE 1. Characteristics of the 75 patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) bone and joint infection (BJI) included at the Lyon University Hospitals, and comparison between clonal complex (CC) 398 and other clones

	Total	CC398	Other clones	p
Total patients	75	8	67	
Demographic characteristics				
Sex (male)	47 (62.7)	6 (75.0)	41 (61.2)	0.364
Age (years)	52.7 ± 20.3	49.9 ± 17.0	53.1 ± 20.7	0.377
Charlson's comorbidity index	2.4 ± 2.8	1.8 ± 2.7	2.5 ± 2.8	0.492
BJI characteristics				
Arthritis	26 (34.7)	4 (50)	22 (32.8)	0.278
Prosthesis joint infections	16 (21.3)	1 (12.5)	15 (22.4)	0.455
Osteomyelitis	38 (50.7)	4 (50)	34 (50.7)	0.629
Osteosynthesis device infections	25 (33.3)	4 (50)	21 (31.3)	0.249
Vertebral osteomyelitis	11 (14.7)	0 (0)	11 (16.4)	0.262
Vertebral osteosynthesis device infections	5 (6.7)	0 (0)	5 (7.5)	0.560
Acute BJI	47 (62.7)	6 (75)	41 (61.2)	0.364
Delay from symptoms to diagnosis (days)	52.5 ± 362.9	3.4 ± 3.3	58.4 ± 383.9	0.246
Biological inflammatory syndrome	67 (89.3)	5 (62.5)	62 (92.5)	0.035
CRP (mg/L)	110 ± 113	62 ± 96	116 ± 115	0.193
Leukocyte count (10^9/mL)	10.2 ± 4.2	7.6 ± 2.3	10.5 ± 4.2	0.048
Neutrophil count (10^9/mL)	7.8 ± 4.0	5.3 ± 2.0	8.1 ± 4.1	0.035
Local complication	58 (77.3)	6 (75)	52 (77.6)	0.583
Fistula	38 (50.7)	2 (25)	36 (53.7)	0.122
Abscess	31 (41.3)	5 (62.5)	26 (38.8)	0.182
Bacteraemia	22/33 (66.7)	1/2 (50)	21/31 (67.7)	0.562
Outcome				
Treatment failure	25 (33.3)	0 (0)	25 (37.3)	0.032

CRP, C-reactive protein. Acute BJI: time from the onset of symptoms to diagnosis of ≤4 weeks. Biological inflammatory syndrome: CRP level of >10 mg/L at the time of diagnosis. Treatment failure: (i) persistence of septic symptoms despite appropriate surgical and medical treatment; (ii) relapse owing to the same MSSA after cessation of treatment; or (iii) the need for a new operation for sepsis more than 5 days after the initial operation.
Results are presented as n (%) and mean ± standard deviation. Comparisons were performed by use of a t-test with Welch's correction for continuous variables, and the chi-squared or Fisher exact test for dichotomous variables, as appropriate.

Finally, a particular ability of this clone to cause BJIs remains questionable. On the one hand, the high prevalence of MSSA CC398 in BJIs and the difference between BJI and nasal-colonizing isolates, especially in our institution (nine MSSA CC398/228 nasal-colonizing isolates (3.9%) as compared with 10.4% CC398 BJIs (p 0.028)), suggest a particular tropism of this clone for bone and joints. In Montpellier, the very widespread diffusion of the clone as indicated by the huge prevalence, even in carriage (23.5% of all MSSA), possibly masks the phenomenon, and makes it more difficult to obtain statistically significant data when comparing the prevalence of CC398 in BJIs and carriage. On the other hand, a global rise in the prevalence of MSSA CC398 has been observed in France in various pathogenic conditions, including bloodstream infections [5,7]. Moreover, DNA microarray analysis failed to highlight specific genetic virulence associated with BJIs. In any case, this rise in MSSA CC398 prevalence in BJIs as well as in many other infectious conditions may be attributable to specific unknown virulence factors or specific expression profiles impacting on phenotypic characteristics, such as biofilm formation and/or interactions with bone cells, which remain to be evaluated.

Acknowledgements

We thank S. Flammier, H. Meugnier and A. Sapin for technical assistance.

©2014 The Authors
Clinical Microbiology and Infection ©2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*

Funding

This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The funders played no role in the study design, data collection and analysis, preparation of the manuscript, or decision to publish.

Transparency Declaration

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Price LB, Stegger M, Hasman H *et al. Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio* 2012; 3: e00305–e00311.
2. Verkade E, Kluytmans J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. *Infect Genet Evol* 2013; doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.013. [Epub ahead of print].
3. Lozano C, Gomez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 500–505.
4. van Belkum A, Melles DC, Peeters JK *et al.* Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 479–483.
5. Chroboczek T, Boisset S, Rasigade JP *et al.* Clonal complex 398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: a frequent unspecialized human pathogen with specific phenotypic and genotypic characteristics. *PLoS ONE* 2013; 8: e68462.
6. Valentin-Domelier AS, Girard M, Bertrand X *et al.* Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? *PLoS ONE* 2011; 6: e28369.
7. Tristan A, Rasigade JP, Ruizendaal E *et al.* Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. *PLoS ONE* 2012; 7: e51172.
8. Stegger M, Lindsay JA, Moodley A, Skov R, Broens EM, Guardabassi L. Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying sau1–hsdS1. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 732–734.
9. Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 457–463.
10. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, *et al.* Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using spa sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2805–2808.
11. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 237–251.
12. van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 2006; 188: 1310–1315.
13. Zhao C, Liu Y, Zhao M *et al.* Characterization of community acquired *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infection in Beijing: high prevalence of PVL+ ST398. *PLoS ONE* 2012; 7: e38577.

Appendix 1. Lyon Bone and Joint Infection Study Group

Physicians: F. Ader, F. Biron, A. Boibieux, A. Bouaziz, E. Braun, C. Chidiac, F. Daoud, T. Ferry, J. Karsenty, J. Lippman, P. Miailhes, T. Perpoint, D. Peyramond, M.-P. Vallat, and F. Valour. Surgeons: C. Barrey, M.-H. Fessy, O. Guyen, C. Lienhart, S. Lustig, P. Neyret, F. Trouillet, and G. Vaz. Microbiologists: F. Laurent, J.-P. Rasigade, and F. Vandenesch. Nuclear medicine: E. Deshayes, F. Giammarile, M. Janier, and I. Morelec. Pharmacokinetic/pharmacodynamic specialists: M.-C. Gagnieu, S. Goutelle, and M. Tod. Clinical research assistant: M. Martinez.

©2014 The Authors
Clinical Microbiology and Infection ©2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*

VI. Détection de la delta-toxine : un nouveau marqueur diagnostique de la chronicité des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* lié à l'internalisation dans les ostéoblastes et à la formation de biofilm

Le délai d'évolution des IOA impacte de manière importante leur prise en charge, notamment en cas d'IOA sur matériel orthopédique. En effet, les recommandations nationales et internationales actuelles préconisent une ablation totale du matériel orthopédique en cas d'IOA chronique, alors qu'un traitement conservateur, avec simple lavage et débridement, est envisageable en cas d'IOA aiguë [5,11,13]. D'après ces mêmes recommandations, la définition de la chronicité des IOA est basée sur un délai d'évolution entre le début de l'infection (début des symptômes, ou, en cas d'infection sur matériel, date de l'inoculation correspondant la plupart du temps à la mise en place du matériel) et la prise en charge de 3 à 4 semaines. Cependant, cette définition est arbitraire, sans qu'aucun substrat objectif biologique ou microbiologique ne puisse guider la prise en charge. Or, les quelques séries disponibles décrivant des patients porteurs d'une IPA bénéficiant d'un traitement conservateur montrent des taux d'échec très variables, même au sein de ces quatre premières semaines d'évolution de l'infection. Zürcher-Pfund et al. décrivent même un taux d'échec de 84.6% chez 11 patients porteurs d'une IPA aiguë (durée d'évolution $\leq$ 3 semaines) après traitement conservateur [346]. Ces mêmes auteurs proposent dans leur discussion une synthèse des publications de 1980 à 2012, incluant 599 IPA avec traitement chirurgical conservateur. Même si les situations incluses sont très hétérogènes (type de patients, délai d'évolution, bactéries impliquées …), le taux d'échec global est de 47.4%. Une large étude rétrospective multicentrique récente, incluant 345 épisodes d'IPA, retrouve même qu'une durée d'évolution des symptômes supérieure à 10 jours est associée à un risque d'échec multiplié par 2 (1.13-4.18 ; p=0.042) [347].

La recherche de marqueurs objectifs de chronicité pouvant guider les indications de prise en charge des IOA semble donc essentielle. Comme nous l'avons vu en introduction, trois mécanismes phénotypiques bactériens ont été associés à la chronicité au cours des IOA staphylococciques : i) la formation de biofilm [209,210]; ii) l'internalisation bactérienne au sein de cellules osseuses non phagocytaires, et notamment des ostéoblastes [169,170]; et iii) le switch vers le phénotype SCV [17,215,216]. Une étude récente menée dans notre laboratoire sur les principaux clones de SARM circulants a ainsi mis en évidence que les souches hospitalières, habituellement responsables d'IOA persistantes et indolentes, avaient

une capacité d'internalisation dans les ostéoblastes et une cytotoxicité moindres que les souches communautaires, généralement associées à des formes aiguës.
Il faut noter que la grande majorité de ces études ont porté sur des souches de laboratoire, et visaient à décrire les mécanismes fondamentaux impliqués dans ces voies supposées de récurrence et de chronicité.
De plus, la dysfonction du système *agr*, principal régulateur de l'expression des facteurs de virulence staphylococciques, a été associée à des formes persistantes d'infections staphylococciques, incluant bactériémies et infections respiratoires, notamment du fait d'une augmentation de la capacité de formation de biofilm [234–237].

Nous avons donc souhaité décrire les capacités de formation de biofilm, d'internalisation dans les ostéoblastes et de switch intra-cellulaire pour le phénotype SCV de notre large collection de souches cliniques de SASM, et corréler ces résultats avec le tableau clinique présenté par les patients, ainsi qu'avec la fonctionnalité du système *agr*.

Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation

Florent Valour[1,2,3,4], Jean-Philippe Rasigade[2,3,4], Sophie Trouillet-Assant[3], Julie Gagnaire[2], Anissa Bouaziz[1], Judith Karsenty[1], Céleste Lacour[2], Michèle Bes[2,3], Sébastien Lustig[3,4,5], Thomas Bénet[6], Christian Chidiac[1,3,4], Jérôme Etienne[2,3,4], François Vandenesch[2,3,4], Tristan Ferry[1,3,4], Frédéric Laurent[2,3,4], on behalf of the Lyon BJI study group

1: Department of Infectious Diseases, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
2: Department of Microbiology, French National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
3: INSERM U1111, International Centre for Infectiology Research, Lyon, France
4: Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France
5: Orthopedic Surgery department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
6: Department of Infection Control and Epidemiology, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

RUNNING TITLE: Delta-toxin detection for MSSA BJI chronicity diagnosis

CORRESPONDING AUTHOR: Florent Valour; Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, Laboratoire de Bactériologie; 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon – France; Phone: 00.33.4.72.07.18.37; Fax: 00.33.4.72.07.18.42; Email address: florent.valour@chu-lyon.fr

Article soumis à Clinical Microbiology and Infection

ABSTRACT

Biofilm formation, intra-osteoblastic persistence, small colony variants (SCVs), and the dysregulation of *agr*, the major virulence regulon, are possibly involved in staphylococcal bone and joint infection (BJI) pathogenesis. We aimed to investigate the contributions of these mechanisms among a collection of 95 *Staphylococcus aureus* clinical isolates from 64 acute (67.4%) and 31 chronic (32.6%) first episodes of BJI. The included strains were compared for internalization rate, cell damage, and SCV intracellular emergence using an *ex vivo* model of human osteoblast infection. Biofilm formation was assessed in a microbead immobilization assay (BioFilm Ring test). Virulence gene profiles were assessed by DNA microarray. Seventeen different clonal complexes were identified among the screened collection. The staphylococcal internalization rate in osteoblasts was significantly higher for chronic than acute BJI isolates, regardless of the strain genetic background. Conversely, no differences regarding cytotoxicity, SCV emergence, biofilm formation, and virulence gene distribution were observed. Additionally, *agr* dysfunction, detected by the lack of delta-toxin production using whole cell matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) analysis (n=15; 15.8%), was significantly associated with BJI chronicity, osteoblast invasion, and biofilm formation. These findings provide new insights into MSSA BJI pathogenesis, demonstrating the correlation between chronicity and staphylococcal osteoblast invasion. This adaptive mechanism, along with biofilm formation, is associated with *agr* dysfunction, which can be routinely assessed by delta-toxin detection using MALDI-TOF spectrum analysis, providing clinicians with a diagnostic marker of BJI chronicity at the time of diagnosis.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*; Bone and joint infection; Osteoblast invasion, biofilm formation; delta-toxin; MALDI-TOF-MS.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is the leading cause of bone and joint infections (BJIs), which are described as difficult-to-treat clinical entities due to frequent bacterial persistence leading to chronicity and relapse [1, 2]. The management strongly differs between acute BJI, for which debridement with implant retention is recommended, and chronic forms, which require the removal of any orthopedic implants [3]. Consequently, the initial recognition of the chronic nature of the infection represents a major therapeutic issue, which is currently arbitrarily based on an evolution delay over 3 to 4 weeks, without any reliable biological substrate.

Staphylococcal BJI chronicity has been classically associated with three major bacterial virulence mechanisms that provide protection against the host immune system and antimicrobial activity: i) biofilm formation, especially in orthopedic device-associated infections [4, 5]; ii) the bacteria's ability to invade and persist in non-professional phagocytic host cells, including osteoblasts, which represents a reservoir responsible for infection recurrence [6-8]; and iii) bacterial phenotype switching to small-colony variants (SCVs), which can be enhanced under adverse/stressful growing conditions, such as for bacteria embedded in biofilms or internalized within osteoblasts [9-11]. Furthermore, the dysregulation of the accessory gene regulator (*agr*), a major regulon controlling the expression of a plethora of *S. aureus* virulence factors, has been associated with persistent infections [12-14].

In this context, our objective was to assess different phenotypic and molecular bacterial markers, i.e. osteoblast invasion, biofilm formation, SCV phenotype switching, and *agr* dysfunction, for clinical relevance toward early identification of BJI chronicity at the time of diagnosis.

MATERIALS AND METHODS

Ethical statements. This study received the approval of the French South-East ethics committee (reference number 2013-018).

BJI definitions. All methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates responsible for a first episode of BJI in our institution from 2001 to 2011 were considered for inclusion. Patients with diabetic foot- and decubitus ulcer-related BJI were excluded because of the particular pathophysiology and management of these infections. Corresponding clinical data were retrospectively collected from medical records on a standardized case record form, and included demographic characteristics and patient comorbidities (summarized in the modified Charlson comorbidity index), BJI clinical presentation, presence of biological inflammatory syndrome (i.e., C-reactive protein [CRP] plasma level ≥10 mg/L and/or white blood cell [WBC] count ≥10,000/mm^3), and outcome. BJI were defined as acute (infection lasting for ≤4 weeks) or chronic infections. Treatment failure included i) persistent infection under appropriate antimicrobial therapy, including the need of new surgery >5 days after the first one and/or ii) relapse after antimicrobial disruption.

Evaluation of staphylococcal interaction with human osteoblasts. Staphylococcal interaction with osteoblasts was assessed in a gentamicin protection assay, as previously described [15-17]. All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom).

MG63 osteoblastic cell culture. The human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427), purchased from LGC standard (USA), was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Prior to assays, the osteoblasts were seeded at 40,000 cells per well into 24-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 1 mL of growth medium and were cultured for 2 days until 70-80% confluence.

Bacterial suspension standardization and infection. Overnight staphylococcal culture suspensions were diluted 5-fold in fresh BHI and further incubated with gyratory shaking for 3 h at 37°C to obtain mid-exponential-phase cultures. These suspensions were washed, sonicated to minimize clumping, and resuspended in antibiotic-free medium at a concentration corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of 100, using the following previously established regression formula correlating bacterial density (CFU/mL) with optical

density at 600 nm (OD_{600}): CFU/mL = 7.10^8 x OD_{600} – 3.10^7 (data not shown). The normalized bacterial suspensions were then added to osteoblast cultures. After 2h of co-culture, the infected osteoblasts were incubated for 24h in the presence of gentamicin (PAA, Pasching, Austria) to kill the remaining extracellular bacteria and the bacteria released upon host cell lysis, thus preventing them from infecting new host cells.

Evaluation of staphylococcal-induced cytotoxicity. After 24h, lactate dehydrogenase (LDH) release from damaged cells was quantified in the cell culture supernatant using a colorimetric method with a Dimension Vista automated clinical chemistry analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarryton, NY). The percent mortality of osteoblasts was assessed by comparing LDH release into the infected cell supernatant to that of uninfected cells that were either left intact (lower control) or fully lysed by osmotic shock (higher control) and was calculated as follows: (LDH infected cells – LDH lower control) / (LDH higher control – LDH lower control).

Quantification of internalized bacteria. The osteoblasts were subsequently lysed by a 10-min incubation period in sterile water. Suspension dilutions of these lysates were spiral-plated using a WASP automated plater (AES Chemunex, Bruz, France). Colonies were enumerated using an EasyCount automated plate reader (AES Chemunex).

Evaluation of SCV phenotype switching. Automated computer image analysis software (ImageJ, Rasband, W.S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2012) was used to numbered SCVs, arbitrary defined as colonies with areas smaller than one-fifth of the median area measured for all colonies on each plate.

Each strain was evaluated in duplicate in a single experiment. The *S. aureus* 8325-4 laboratory strain, which has been well characterized with regard to its capacity to invade osteoblasts, was used as a control in each experiment [15, 16]. LDH release and intracellular bacterial counts were expressed relative to the 8325-4 reference strain.

Biofilm formation. The biofilm formation capacities of 40 randomly selected strains were explored using the BioFilm Ring test (BioFilm Control, Saint Beauzire, France), as described by Chavant et al [18]. Briefly, this technique is based on the immobilization of magnetic microbeads when embedded in bacterial biofilms. After adjusting the OD_{600} of overnight bacterial suspensions at 1+/-0.05, the suspensions were diluted 1:250 in fresh BHI, mixed with 1% of tonner suspension (magnetic microbeads), and deposited in triplicate in a 96-well microplate. Every 1h for 5h, the wells of one plate were covered with 100 µL of contrast solution (white opaque oil). The plate was then placed on a dedicated magnet support for 1

min for contact magnetization and was then scanned with a plate reader to obtain an image of the bottom of each well. During contact magnetization, free beads are attracted to the center of the bottom of each well, forming a spot, whereas the beads captured within a biofilm remain in suspension. The BioFilm Control software (BioFilm Elements) analyzes the images of each well before and after magnetization and calculates the "BioFilm Index" (BFI). Each observed BFI (BFI_o) was normalized as a proportion of the immobilized beads (so-called RBI for "Relative Bead Immobilization") and was compared with controls with ($BFI_{reference}$) and without ($BFI_{minimal}$) beads using the following formula: $RBI = [(BFI_{reference} - BFI_o) / (BFI_{reference} - BFI_{minimal})]^{0.5}$ [18].

Accessory gene regulator functionality. The multifunctional regulatory RNAIII, the main effector of the *agr* system [19], is also a messenger RNA for the delta-toxin, whose production is consequently a surrogate marker of *agr* functionality [20]. Recently, it was shown that delta-toxin production and thus *agr* function can be assessed using whole cell matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) during the routine MS-mediated microbiological identification process [21]. Consequently, *agr* functionality was assessed by the evaluation of delta-toxin production from whole bacterial cells by MALDI-TOF-MS spectrum analysis using an Axima Assurance® mass spectrometer (Shimadzu Biotech) piloted by LaunchPad® software (version 2.8.4.20081127, Shimadzu Biotech) with the conventional settings for bacterial identification [21, 22]. Delta-toxin peak at 3005±5 Thomson (or its allelic variant at 3015±5 Th) was searched manually in the MS spectrum, as previously described [21].

Molecular characterization. DNA was extracted using commercial extraction kits (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The DNA microarray Identibac *S. aureus* genotyping® (Alere Technologies) used in this study and the related procedures have been previously described in detail [23]. This microarray allows the detection of 332 different target sequences corresponding to 185 genes and their allelic variants. The isolate clonal complexes (CCs) were determined by the comparison of the hybridization profiles to previously typed multilocus sequence typing (MLST) reference strains [23].

Statistical analysis. Descriptive statistics were used to estimate the frequencies of the study variables, expressed as the means and 95% confidence intervals (95%CIs). Non-parametric statistical methods were used throughout to compare the study groups (the Chi-squared test

with Yates' correction, if needed, the Mann-Whitney *U*-test for two-group difference analysis, and the Kruskal-Wallis test for multiple pairwise comparisons) and to investigate correlations (Spearman coefficient), as appropriate. Phenotypic factors (internalization, LDH release, and SCV phenotype switching rates), delta-toxin expression, and virulence genes were included in a binary logistic regression model to disclose risk factors for chronicity, including variables with p-values <0.15 in the univariate analysis in the final model. For all tests, a p-value <0.05 was taken as significant. All analyses were performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Population characteristics. A total of 211 patients with MSSA BJI were identified; six were excluded because of the lack of available clinical data and three due to chronic osteomyelitis resulting from diabetic perforating ulcers. Among the 202 remaining patients, 116 strains were available. Nineteen strains isolated at the time of relapse and two stable SCVs were excluded. In total, 95 strains responsible for 64 (67.4%) acute and 31 (32.6%) chronic BJI were included (Table 1).

	Total (n=95)	**Acute BJI[a] (n=64)**	**Chronic BJI[a] (n=31)**	***p*-value**
Demographic characteristics				
Sex (male)	60 (63.2%)	38 (59.4%)	22 (71.0%)	0.272
Age (year)	53.6 (49.6-57.6)	56.1 (51.3-60.8)	48.5 (49.6-57.6)	0.105
Modified CCI[b]	2.6 (2.1-3.2)	2.9 (2.2-3.6)	2.0 (1.1-2.9)	0.148
BJI type				
Native septic arthritis	12 (12.6%)	10 (15.6%)	2 (6.5%)	0.351
Native osteomyelitis	12 (12.6%)	2 (3.1%)	10 (32.3%)	$< 10^{-3}$
Vertebral osteomyelitis	7 (7.4%)	5 (7.8%)	2 (6.5%)	0.856
Orthopedic device infection	64 (67.4%)	47 (73.4%)	17 (54.8%)	0.070
Osteosynthesis	32 (50%)	23 (48.9%)	9 (52.9%)	0.777
Prosthetic joint	29 (45.3%)	22 (48.8%)	7 (41.2%)	0.689
Others	3 (4.7%)	2 (4.3%)	1 (5.9%)	0.691
Inflammatory syndrome	88 (92.6%)	59 (92.2%)	29 (93.5%)	0.811
CRP level (mg/L)	170.5 (141.7-199.3)	209.8 (174.4-245.3)	86.23 (52.7-119.8)	$< 10^{-3}$
WBC (/mm^3)	10,790 (9,985-11,600)	11,060 (10,140-11,970)	10,220 (8,538-11,910)	0.098
Neutrophil count (/mm^3)	8,129 (7,338-8,921)	8,577 (7,706-9,448)	7,169 (5,492-8,846)	0,009
Management				
Surgical treatment	83 (87.4%)	57 (89.1%)	26 (83.9%)	0.700
Antimicrobial duration (weeks)	27.8 (23.5-32.0)	26.4 (21.2-31.7)	30.6 (22.8-38.4)	0.244
Outcome				
Treatment failure linked with the same strain	21 (22.1%)	14 (21.9%)	7 (22.6%)	0.938

Table 1. Characteristics of the 95 included patients with methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bone and joint infection.

Results are presented as effective (%) and mean (95%CI) values. Comparisons between acute and chronic BJI were performed using a two-tailed Fisher's exact test or a Mann-Whitney U-test, as appropriate.

[a]Bone and joint infection; [b]Charlson comorbidity index

MSSA from chronic BJI shows a higher capacity to invade human osteoblasts. The mean relative internalization rate within osteoblasts was significantly higher for chronic BJI isolates (240.7% of 8325-4 internalization rate; 95%CI, 171.3-310.2) than for acute BJI strains (162.7%; 95%CI, 132.3-193.0; p=0.035) (Figure 1A).

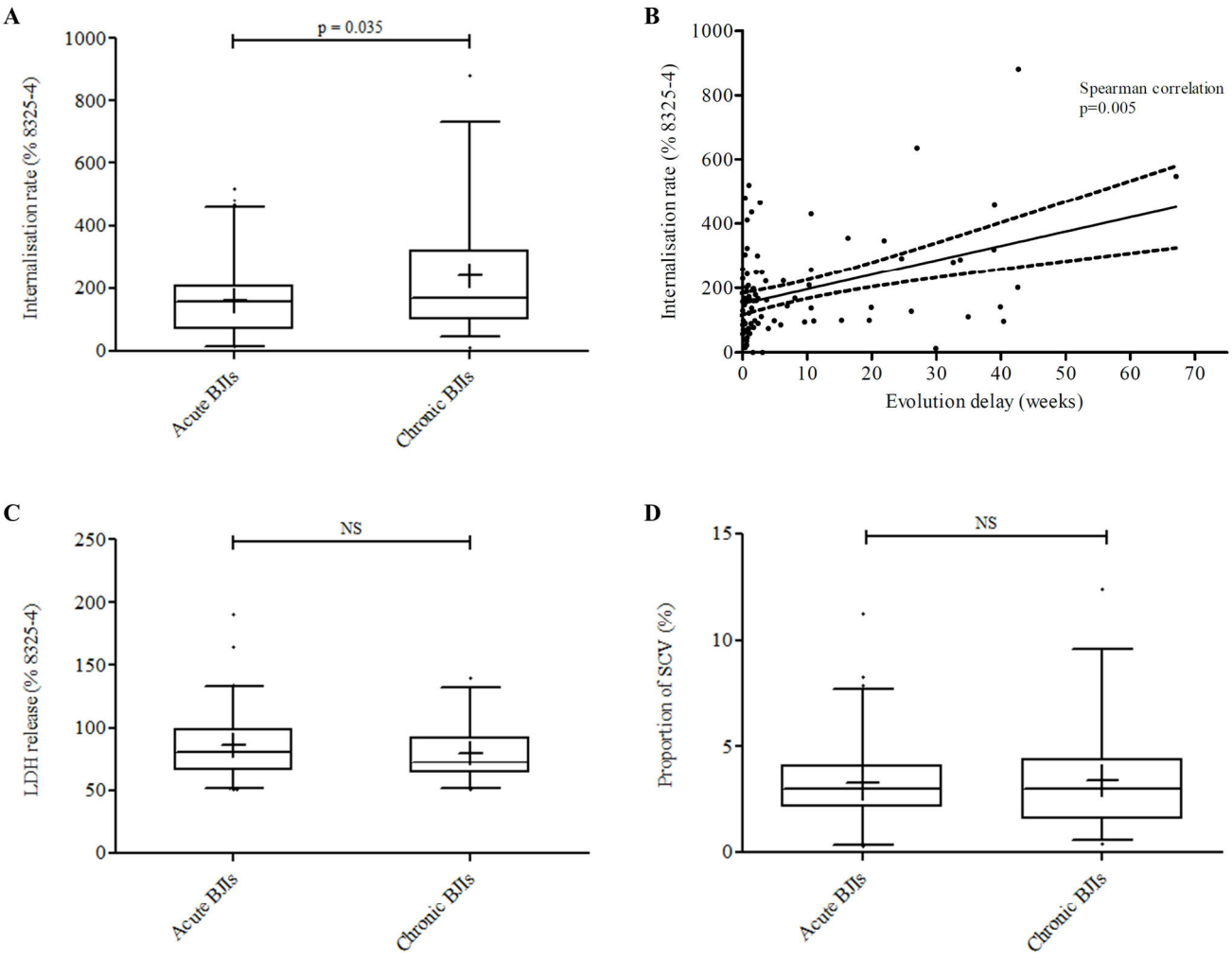


Figure 1. Difference in interactions between human osteoblasts and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) strains isolated from acute and chronic bone and joint infections (BJI).

A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

B: Correlation between the internalization rate of MSSA isolates and BJI evolution delay

C: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection by MSSA isolates

D: Proportion of phenotype switching to small colony variants (SCVs)

Moreover, the internalization rate was correlated with the infection evolution delay, i.e., the time from symptom onset to microbiological diagnosis (Spearman coefficient 0.29; p=0.005) (Figure 1B). No difference was observed between the two groups regarding cytotoxicity at 24h, with 10.7% (95%CI, 8.3-13.1) and 7.6% (95%CI, 4.8-10.4) of cell death (p=0.152), respectively (Figure 1C). LDH release was not correlated with BJI evolution delay (Spearman coefficient -0.07; p=0.512). Similarly, no difference in the capacities of the two groups to convert to the SCV phenotype was observed, with SCV proportions of 3.3% (95%CI, 2.8-3.7) and 3.4% (95%CI, 2.5-4.2) for the acute and chronic MSSA BJI isolates, respectively (p=1.000) (Figure 1D).

Biofilm formation does not differ between acute and chronic MSSA BJI isolates. The total immobilization of magnetic beads, reflecting biofilm formation, was observed within 5 hours for all isolates. The kinetics of biofilm formation was similar for the acute and chronic BJI isolates (Figure 2). Of note, microarray data indicated that all strains harbored the biofilm-associated genes *ica*A, *ica*C, and *ica*D (see below).

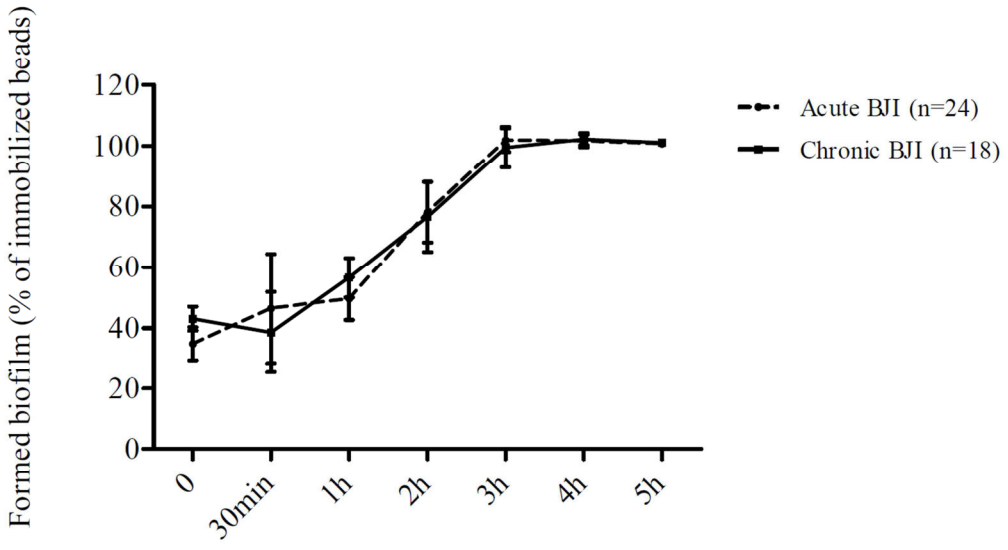


Figure 2. Difference in biofilm formation by methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) strains isolated from acute and chronic bone and joint infections (BJI).

Genetic background analysis reveals a high diversity among BJI MSSA clinical isolates, with no difference in virulence gene distribution in acute and chronic BJI isolates. Seventeen different clonal complexes were identified, of which 7 included more than 5 strains (Table 2). No significant difference regarding the distribution of these clonal complexes between acute and chronic BJI was observed (p=0.408). Using multiple pairwise comparisons (Kruskal-Wallis test), no differences were identified between the different clusters with regard to their capacity to invade bone cells (p=0.446), cause cell damage (p=0.368), switch SCV phenotypes (p=0.054), or form biofilm (p=0.347) (Table 2, Figure 3).

CC[a]	Total	BJI[b] chronicity		Internalization rate	LDH[c] release	SCV[d] proportion	δ-toxin -
		Acute BJI[b]	Chronic BJI[b]				
CC5	18 (18.9%)	13 (20.3%)	5 (16.1%)	214.9% (135.6-294.2)	77.2% (68.9-85.5)	3.0% (2.3-3.6)	6 (33.3%)
CC30	17 (17.9%)	10 (15.6%)	7 (22.6%)	169.6% (105.5-233.7)	84.5% (77.1-91.8)	4.5% (3.1-5.9)	1 (5.9%)
CC45	12 (12.6%)	10 (15.6%)	2 (6.5%)	279.6% (80.62-478.6)	97.2% (73.1-121.3)	3.0% (1.8-4.2)	1 (8.3%)
CC15	10 (10.5%)	8 (12.5%)	2 (6.5%)	185.8% (89.7-281.9)	94.2% (71.1-117.4)	2.0% (1.1-2.9)	3 (30%)
CC398	9 (9.5%)	6 (9.4%)	3 (9.7%)	103.0% (71.0-135.0)	72.2% (57.6-86.9)	2.9% (1.7-4.0)	1 (11.1%)
CC8	8 (8.4%)	3 (4.7%)	5 (16.1%)	248.3% (110.7-385.8)	79.1% (58.4-99.7)	4.9% (2.2-7.6)	0 (0%)
CC25	6 (6.3)	4 (6.3%)	2 (6.5%)	170.6% (-16.8-358.0)	88.7% (48.5-129.0)	3.3% (1.2-5.4)	1 (16.7%)
Others	10 different CC with less than 5 strains each						

Table 2. Distribution of the major MSSA clonal complexes regarding infection evolution delay and comparison of their capacities to invade bone cells, induce cytotoxicity, and convert to an SCV phenotype.

[a] Clonal complex; [b] Bone and joint infection; [c] Lactate dehydrogenase; [d] Small colony variant

Results are presented as effective (%) and mean (95%CI) values and are expressed relative to the results obtained with the 8325-4 reference strain.

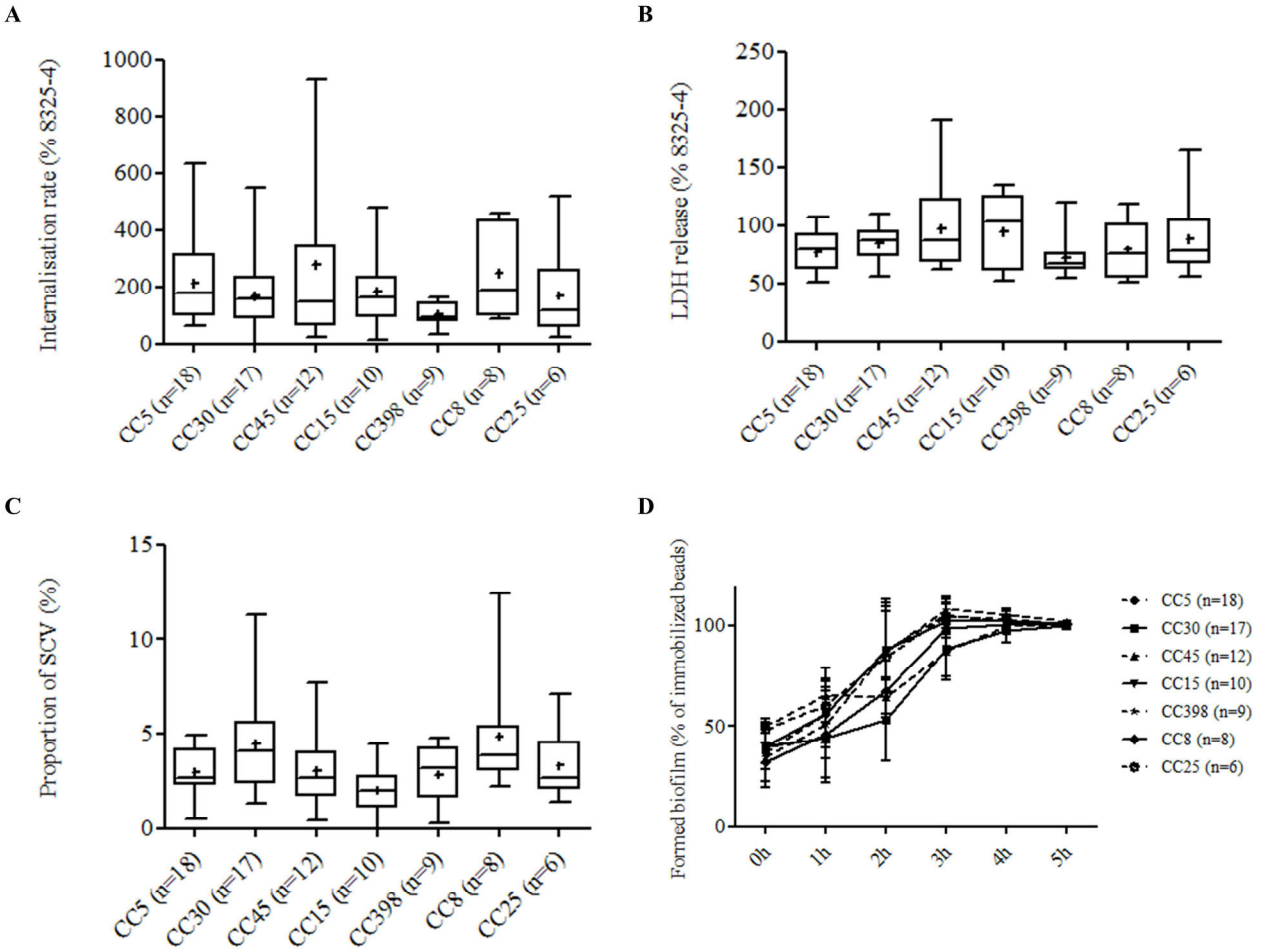


Figure 3. Comparison of the major methicillin-susceptible S. aureus (MSSA) bone and joint infection (BJI) clones regarding their capacities to invade bone cells, induce cytotoxicity, convert to a small colony variant (SCV) phenotype, and form biofilm.

A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

B: Correlation between the internalization rate of MSSA isolates and BJI evolution delay

C: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection by MSSA isolates

D: Proportion of phenotype switching to SCVs

The distribution of virulence genes of the 95 BJI MSSA isolates is presented in Table 3. No difference regarding the prevalence of these virulence factors between the acute and chronic BJI MSSA strains was noted. Logistic regression failed to identify one of these virulence genes as a determinant for BJI chronicity (Table 3). In the multivariate model, none of internalization rate (OR 1.000; 95%CI 1.000-1.000; p=0.244), absence of delta-toxin production (OR 0.397; 95%CI 0.708-8.112; p=0.160), and sdrD (OR 0.365; 95%CI 0.128-1.038; p=0.059) were independently associated with chronicity.

	Descriptive data				Univariate analysis	
	Total	**Acute BJI[a]**	**Chronic BJI[a]**	**p**	**OR (95%CI)[b]**	**p**
Sex (male)	60 (63.2%)	38 (59.4%)	22 (71.0%)	0.503	1.436 (0.582-3.546)	0.432
Age (year)	53.6 (49.6-57.6)	56.1 (51.3-60.8)	48.5 (49.6-57.6)	0.105	0.984 (0.962-1.007)	0.175
Modified Charlson	2.6 (2.1-3.2)	2.9 (2.2-3.6)	2.0 (1.1-2.9)	0.148	0.881 (0.737-1.053)	0.164
Internalization rate					1.000 (1.000-1.000)	0.101
LDH[c] release					1.000 (1.000-1.000)	0.235
SCV[d]					1.000 (1.000-1.000)	0.875
δ-toxin –					2.832 (0.920-8.715)	0.069
***agr* alleles**				0.561	0.896 (0.525-1.532)	0.689
agr I	42 (44.2%)	26 (40.6%)	16 (51.6%)		1.559 (0.658-3.696)	0.313
agr II	29 (30.5%)	22 (34.4%)	7 (22.6%)		0.557 (0.207-1.495)	0.245
agr III	23 (24.2%)	15 (23.4%)	8 (25.8%)		1.136 (0.422-3.060)	0.801
agr IV	1 (1.1%)	1 (1.6%)	0 (0%)		NC	NC
Toxins						
tst	16 (16.8%)	11 (17.2%)	5 (16.1%)	1.000	0.927 (0.291-2.946)	0.897
enterotoxins						
*se*a	17 (17.9%)	12 (18.8%)	5 (16.1%)	1.000	0.833 (0.265-2.618)	0.755
*se*b	6 (6.3%)	4 (6.3%)	2 (6.5%)	1.000	1.034 (0.179-5.979)	0.970
*se*c	7 (7.4%)	7 (10.9%)	0 (0%)	0.092	NC	NC
*se*d	8 (8.5%)	6 (9.4%)	2 (6.7%)	1.000	0.690 (0.131-3.641)	0.662
*se*e	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
*se*g	58 (61.7%)	41 (65.1%)	17 (54.8%)	0.373	0.652 (0.271-1.566)	0.338
she	10 (10.5%)	7 (10.9%)	3 (9.7%)	1.000	0.872 (0.210-3.632)	0.851
*se*i	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311
*se*j	7 (7.4%)	5 (7.8%)	2 (6.5%)	1.000	0.814 (0.149-4.450)	0.812
*se*k	5 (5.3%)	5 (7.8%)	0 (0%)	0.169	NC	NC
*se*L	7 (7.4%)	7 (10.9%)	0 (0%)	0.092	NC	NC
*se*m	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311
*se*n	58 (61.1%)	41 (64.1%)	17 (54.8%)	0.501	0.681 (0.285-1.630)	0.388
*se*o	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311
*se*q	5 (5.3%)	5 (7.8%)	0 (0%)	0.169	NC	NC
*se*r	7 (7.4%)	5 (7.8%)	2 (6.5%)	1.000	0.814 (0.146-4.450)	0.812
*se*u	59 (62.1%)	42 (65.6%)	17 (54.8%)	0.369	0.636 (0.265-1.527)	0.311
*luk*SPV–*luk*FPV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
*luk*D–*luk*E	52 (54.7%)	34 (53.1%)	18 (58.1%)	0.668	1.222 (0.514-2.904)	0.650
*luk*M–*luk*F-PV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
*luk*X	62 (89.9%)	41 (93.2%)	21 (84.0%)	0.245	0.384 (0.079-1.877)	0.237
*luk*Y	65 (68.4%)	43 (67.2%)	22 (71.0%)	0.816	1.194 (0.469-3.040)	0.710
Exfoliative toxins						
eta	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
etb	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
etd	6 (6.3%)	4 (6.3%)	2 (6.5%)	1.000	1.034 (0.179-5.979)	0.970
HLB conv phages						
sak	72 (75.8%)	48 (75.0%)	24 (77.4%)	1.000	1.143 (0.414-3.152)	0.796
chp	68 (71.6%)	48 (75.0%)	20 (64.5%)	0.336	0.606 (0.240-1.533)	0.290
scn	90 (94.7%)	61 (95.3%)	29 (93.5%)	0.660	0.713 (0.113-4.504)	0.719
Proteases						
*spl*A	52 (54.7%)	34 (53.1%)	18 (58.1%)	0.668	1.222 (0.514-2.904)	0.650
*spl*B	52 (54.7%)	34 (53.1%)	18 (58.1%)	0.668	1.222 (0.514-2.904)	0.650
*spl*E	48 (50.5%)	30 (46.9%)	18 (58.1%)	0.383	1.569 (0.660-3.731)	0.308
Superantigens						
*set*C	65 (68.4%)	43 (67.2%)	22 (71.0%)	0.816	1.194 (0.469-3.040)	0.710
*set*6	94 (98.9%)	64 (100%)	30 (96.8%)	0.326	NC	NC
*ssl*1	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*ssl*2	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC

*ssl*3	69 (72.6%)	45 (70.3%)	24 (77.4%)	0.624	1.448 (0.534-3.928)	0.468
*ssl*4	82 (94.3%)	55 (94.8%)	27 (93.1%)	1.000	0.736 (0.116-4.672)	0.745
*ssl*5	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*ssl*6	23 (24.2%)	14 (21.9%)	9 (29.0%)	0.455	1.461 (0.551-3.877)	0.446
*ssl*7	94 (98.9%)	63 (98.4%)	31 (100%)	1.000	NC	NC
*ssl*8	54 (56.8%)	36 (56.3%)	18 (58.1%)	1.000	1.077 (0.452-2.564)	0.867
*ssl*9	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*ssl*10	90 (100%)	61 (100%)	29 (100%)	NC	NC	NC
*ssl*11	64 (69.6%)	43 (68.3%)	21 (72.4%)	0.809	1.221 (0.462-3.227)	0.687
Capsule / biofilm associated genes						
*cap*1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
*cap*5	45 (47.4%)	28 (43.8%)	17 (54.8%)	0.382	1.561 (0.659-3.699)	0.312
*cap*8	50 (52.6%)	36 (56.3%)	14 (45.2%)	0.382	0.641 (0.270-1.518)	0.312
*ica*A	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*ica*C	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*ica*D	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
bap	1 (1.1%)	0 (0%)	1 (3.2%)	0.326	NC	NC
Adhesins (MSCRAMMs)						
bbp	87 (91.6%)	59 (92.2%)	28 (90.3%)	0.713	0.791 (0.176-3.546)	0.791
*clf*A	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*clf*B	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
cna	41 (43.2%)	30 (46.9%)	11 (35.5%)	0.378	0.623 (0.257-1.510)	0.295
ebh	93 (97.9%)	63 (98.4%)	30 (96.8%)	0.548	0.476 (0.029-7.876)	0.604
*ebp*S	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
eno	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
fib	54 (56.8%)	36 (56.3%)	18 (58.1%)	1.000	1.077 (0.452-2.564)	0.867
*fnb*A	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*fnb*B	84 (88.4%)	56 (87.5%)	28 (90.3%)	1.000	1.333 (0.328-5.419)	0.688
map	92 (96.8%)	61 (95.3%)	31 (100%)	0.548	NC	NC
*sas*G	45 (47.4%)	30 (46.9%)	15 (48.4%)	1.000	1.062 (0.450-2.507)	0.890
*sdr*C	94 (98.9%)	64 (100%)	30 (96.8%)	0.326	NC	NC
*sdr*D	75 (78.9%)	54 (84.4%)	21 (67.7%)	0.105	0.389 (0.141-1.069)	0.067
vwb	95 (100%)	64 (100%)	31 (100%)	NC	NC	NC
*isa*B	50 (56.2%)	33 (55.0%)	17 (58.6%)	0.822	1.159 (0.473-2.843)	0.747
*hsd*S1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NC	NC	NC
*hsd*S2	73 (76.8%)	50 (78.1%)	23 (74.2%)	0.796	0.805 (0.296-2.186)	0.670
*hsd*S3	60 (63.2%)	39 (60.9%)	21 (67.7%)	0.651	1.346 (0.545-3.328)	0.520
*hys*A1	94 (98.9%)	64 (100%)	30 (96.8%)	0.326	NC	NC
*hys*A2	86 (90.5%)	56 (87.5%)	30 (96.8%)	0.263	4.286 (0.512-35.906)	0.180

Table 3. Distribution of virulence genes among acute and chronic bone and joint infection MSSA isolates and determinants of infection chronicity.

[a] Bone and joint infection; [b] Odds ratio (95% confidence interval); [c] Lactate dehydrogenase; [d] Small colony variant; NC: Not calculable

***agr* dysfunction, detected through the absence of delta-toxin production, is associated with MSSA BJI chronicity, osteoblast invasion, and biofilm formation.** Eighty strains (84.2%) were considered to have a functional *agr* system, as a delta-toxin peak (n=76) or its allelic variant (n=4) was detected using MALDI-TOF spectrum analysis. Interestingly, the evolution delay of BJI was significantly higher in the delta-toxin negative isolates (17.4 weeks; 95%CI, 6.1-28.8) than in the strains with a functional *agr* system (6.4 weeks; 95%CI, 4.0-8.9; p=0.045). Compared to delta-toxin positive strains, the absence of delta-toxin expression was associated with a higher internalization rate (337.1% of the 8325-4 internalization rate [95%CI, 219.5-454.7] versus 160.2% (95%CI, 133.9-186.5); p <0.001), lower osteoblast cytotoxicity (64.5% of 8325-4 LDH release [95%CI, 57.1-71.8] versus 87.3% [95%CI, 82.0-93.7], corresponding to 2.8% [95%CI, 0.6-5.0] versus 11.0% [95%CI, 8.9-13.0] of cell death; p <0.001), and an accelerated biofilm formation at each measurement point (Figure 4). No difference was detected regarding intracellular phenotype switching to SCV (2.5%; 95%CI, 1.7-3.1) for the delta-toxin-negative strains versus 3.5% for the delta-toxin-positive strains (95%CI 3.0-3.9; p=0.153). Of note, the delta-toxin-negative strains were not significantly associated with one of the seven major staphylococcal clonal complexes (p=0.181).

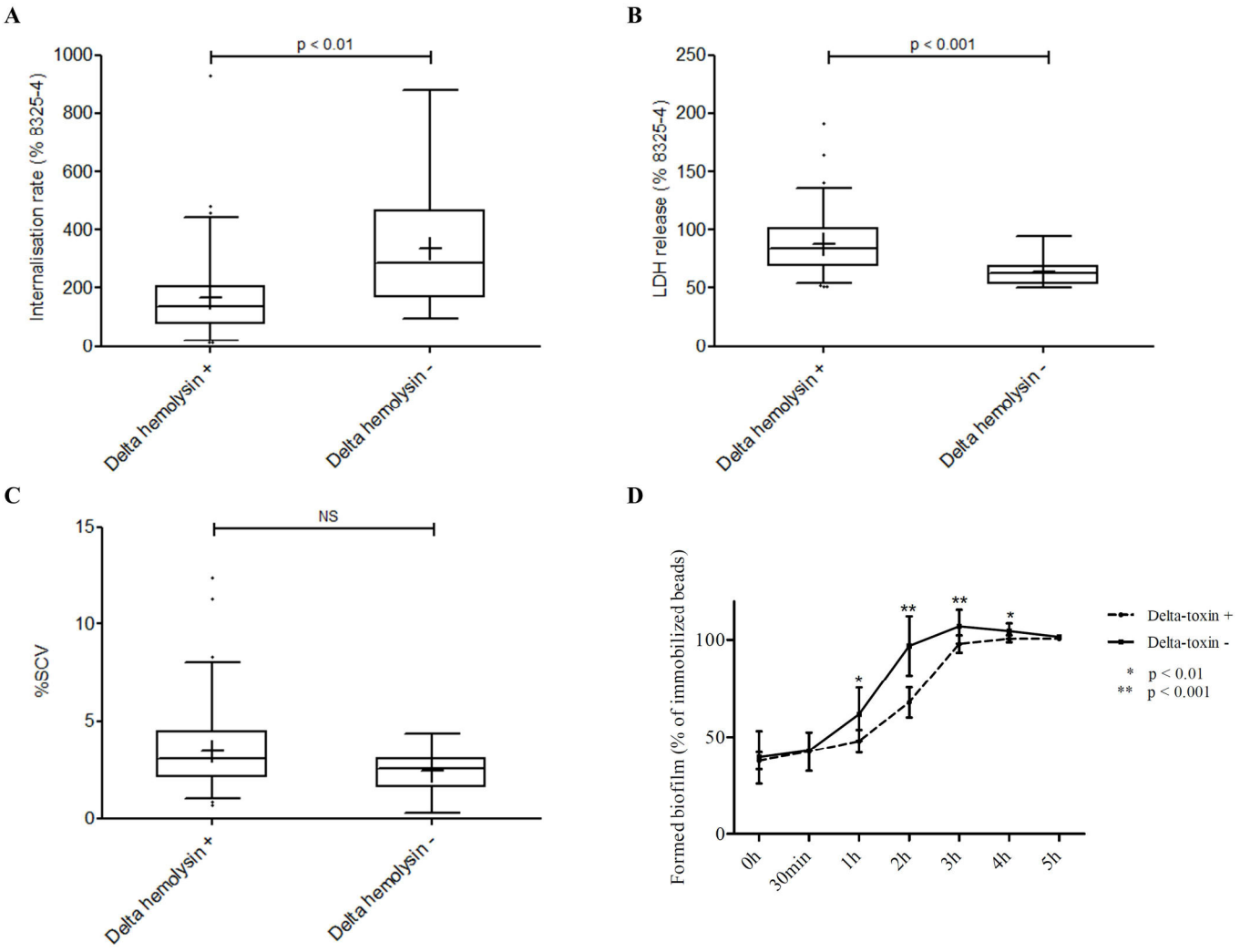


Figure 4. Osteoblast invasion, cytotoxicity, and small colony variant (SCV) intracellular emergence of methicillin-susceptible S. aureus (MSSA) bone and joint infection (BJI) isolates regarding the bacterial production of delta-toxin

A: Internalization rate of MSSA isolates within human osteoblasts

B: Cytotoxicity rate induced by human osteoblast infection with MSSA isolates

C: Proportion of phenotype switching to SCVs

D: Biofilm formation

DISCUSSION

Staphylococcal osteoblast invasion is considered as a pathophysiological pathway of BJI on the basis of *in vivo* observations and results obtained from *ex vivo* models of osteoblast infection, though only using a few reference *S. aureus* isolates [6-8]. Intracellular persistence may constitute a strategy to escape the action of the host immune system and antibiotics with exclusive extracellular diffusion, constituting a bacterial reservoir that can lead to chronicity or relapse [8]. This hypothesis has been previously investigated in our laboratory using the main circulating MRSA clones, showing that community-acquired MRSA, usually responsible for acute forms of BJI, were more cytotoxic and less internalized in osteoblasts than hospital-acquired MRSA, known to more frequently induce indolent and recurrent BJI [16]. The present results confirm the association between the staphylococcal invasion of human osteoblasts and BJI chronicity for the first time among a large and highly diverse collection of clinical MSSA isolates. Conversely, this important diversity in bacterial genetic background may explain the difficulty in identifying any difference in cytotoxicity between chronic and acute BJI strains. Similarly, we failed to disclose any association between chronicity and the intracellular emergence of SCV. However, an accurate definition of SCV, involving not only colony sizes but also metabolism markers, for example, is lacking and may have helped to associate this phenotype with chronic BJI forms. Indeed, SCVs have been associated with *S. aureus* implanted-material infection and BJI recurrence [9, 10], and cell invasion has been described as a putative mechanism of interconversion from the wild type to the SCV phenotype [11].

The high genetic diversity of our strain collection, the absence of a direct relationship between BJI chronicity and bacterial genetic backgrounds or virulence factors, and the association of osteoblast invasion with *agr* deficiency suggest that an intra-osteoblastic life-style is an adaptive staphylococcal mechanism leading to BJI chronicity rather than merely an intrinsic feature. Indeed, the comparison of *agr* expression at different time points during various infections has shown that acute infections are usually associated with a functional *agr* system [13]. *agr* dysfunction appears to occur during the infection course and in cases of persistent bacteremia, diabetic foot infection, or pulmonary infection in cystic fibrosis patients [12, 13, 21, 24]. Of note, chronicity of infection appeared to be in multivariate analysis the major factor associated with *agr* dysfunction in a previous series of 168 unselected clinical isolates [21].

In addition to the finding of a higher evolution delay of BJI in *agr*-deficient isolates, our results revealed a strong association between *agr* dysfunction and the bacterial phenotypic mechanisms associated with BJI chronicity, including: i) an enhanced biofilm formation, which had been previously suggested using various laboratory strains and a few clinical isolates from inhomogeneous pathologic conditions [14, 55, 26]; and ii) an increased osteoblastic invasion, with reduced infection-induced cytotoxicity. To our knowledge, the association of *agr* dysfunction and non-professional phagocytic cell invasion has only been described in airway epithelial cells [26]. Interestingly, using isogenic mutants, we also linked the intraosteoblastic cytotoxic phenotype of MRSA with the regulation of phenol-soluble modulins (PSMs), which can be considered as major effectors of intracellular staphylococcal virulence [16]. Indeed, once internalized, *S. aureus* is initially trapped in phagosomes [27]. PSM release may then results in phagosome membrane disruption, leading to translocation of PSM in the cytosol, and ultimately to host cell death [16]. Of note, PSM expression is under direct control of *agr* and delta-toxin is known itself as one of these PSM, called PSM**γ**. Put together, these considerations may explain the reduced cell lysis observed in our study in delta-toxin negative strains, consequently promoting the constitution of an intracellular staphylococcal reservoir leading to chronicity.

Finally, it has been demonstrated that *agr* functionality can be easily assessed by delta-toxin production using whole-cell MALDI-TOF spectrum analysis [20, 21]. As MALDI-TOF-MS is increasingly being used in routine laboratory practice for bacterial identification [21, 28], it may provide in the same run reliable information with respect to *S. aureus agr* functionality at the time of BJI diagnosis, that is, when impaired, an predictive marker of chronic infection [21]. It may provide pivotal information for clinicians who currently lack objective criteria to characterize the chronicity state of BJI in patients, and directly impact their management. Notably, in the case of prosthetic joint infection, the current guidelines arbitrarily tolerate implant retention in cases of infection lasting for less than 3 to 4 weeks, considering that surgical debridement associated with combination therapy including anti-biofilm molecules, such as rifampin, will avoid chronicization and increase the cure rate [3]. However, this decision is often very difficult in clinical practice because: i) the delay of 3-4 weeks is only theoretical, as bacterial adhesion and biofilm formation are highly likely to occur in the first hours of infection; and ii) the clinical onset of infection is often difficult to determine due to the frequent occult evolution of BJI. In practice, these factors contribute to a failure rate of implant retention strategies that generally approaches 20% but can reach 50% in some poorly explained cases [2, 29, 30]. Thus, prospective evaluations of strategies using *agr*-deficiency

detection at the time of diagnosis to help in the management of BJI as acute or chronic infections should be a priority according to their potential clinical impact.

CONCLUSIONS

Using a large and non-clonal clinical collection of BJI MSSA isolates, our findings confirmed that bacterial invasion and intracellular life switching within bone cells constitute a pivotal pathophysiological mechanism of staphylococcal BJI chronicity, regardless of the genetic background of the isolate. Moreover, the loss of *agr* function that occurs during the infection course appears to be linked with BJI chronicity through i) the promotion of an intra-osteoblastic *S. aureus* reservoir by limiting intracellular staphylococcal cell damage and ii) the enhancement of biofilm formation. As a consequence, the detection of delta-toxin by MALDI-TOF-MS, which is used in routine microbiology practice for bacterial identification, may provide a simple tool for the detection of strains associated with chronic forms of BJI and may offer crucial help for clinical decisions in BJI management.

FUNDING

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

CONFLICTS OF INTEREST

No conflict, for all authors.

ACKNOWLEDGMENTS

Lyon Bone and Joint Infection Study Group: Physicians – *Florence Ader, François Biron, André Boibieux, Anissa Bouaziz, Evelyne Braun, Christian Chidiac, Fatiha Daoud, Tristan Ferry, Judith Karsenty, Johanna Lippman, Patrick Miailhes, Thomas Perpoint, Dominique Peyramond, Marie-Paule Vallat, and Florent Valour;* **Surgeons** – *Cédric Barrey, Pierre Breton, Fabien Boucher, Romain Desmarchelier, Michel-Henry Fessy, Olivier Guyen, Christophe Lienhart, Sébastien Lustig, Alain-Ali Mojallal, Philippe Neyret, Franck Trouillet, and Gualter Vaz;* **Microbiologists** – *Frédéric Laurent, Céline Dupieux, Jean-Philippe Rasigade, and François Vandenesch*; **Nuclear Medicine** – *Emmanuel Deshayes, Francesco Giammarile, Marc Janier, and Isabelle Morelec;* **PK/PD specialists** – *Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle, and Michel Tod;* and **Clinical Research Assistant –** *Marion Martinez*

REFERENCES

1. Lew DP and Waldvogel FA. Osteomyelitis. Lancet, **2004**; 364: 369-379.

2. Zimmerli W, Trampuz A and Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med, **2004**; 351: 1645-1654.

3. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR*, et al.* Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, **2013**; 56: e1-e25.

4. Sanchez CJ, Jr., Mende K, Beckius ML*, et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect Dis, **2013**; 13: 47.

5. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW and Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunol Med Microbiol, **2008**; 52: 13-22.

6. Bosse MJ, Gruber HE and Ramp WK. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. J Bone Joint Surg Am, **2005**; 87: 1343-1347.

7. Jevon M, Guo C, Ma B*, et al.* Mechanisms of internalization of Staphylococcus aureus by cultured human osteoblasts. Infect Immun, **1999**; 67: 2677-2681.

8. Ellington JK, Harris M, Webb L*, et al.* Intracellular Staphylococcus aureus. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. J Bone Joint Surg Br, **2003**; 85: 918-921.

9. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC*, et al.* Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol, **2006**; 4: 295-305.

10. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE and Zimmerli W. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. Clin Infect Dis, **2006**; 43: 961-967.

11. Tuchscherr L, Medina E, Hussain M*, et al.* Staphylococcus aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. EMBO Mol Med, **2011**; 3: 129-141.

12. Fowler VG, Jr., Sakoulas G, McIntyre LM*, et al.* Persistent bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. J Infect Dis, **2004**; 190: 1140-1149.

13. Traber KE, Lee E, Benson S*, et al.* agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates. Microbiology, **2008**; 154: 2265-2274.

14. Vuong C, Saenz HL, Gotz F and Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus. J Infect Dis, **2000**; 182: 1688-1693.
15. Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y*, et al.* A novel flow cytometry-based assay for the quantification of Staphylococcus aureus adhesion to and invasion of eukaryotic cells. J Microbiol Methods, **2011**; 86: 145-149.
16. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T*, et al.* PSMs of Hypervirulent Staphylococcus aureus Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts. PLoS One, **2013**; 8: e63176.
17. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP*, et al.* Staphylococcus epidermidis in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. PLoS One, **2013**; 8: e67240.
18. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hebraud M and Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods, **2007**; 68: 605-612.
19. Novick RP and Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet, **2008**; 42: 541-564.
20. Janzon L, Lofdahl S and Arvidson S. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of Staphylococcus aureus. Mol Gen Genet, **1989**; 219: 480-485.
21. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S*, et al.* Detection of Staphylococcus aureus delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One, **2012**; 7: e40660.
22. Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M*, et al.* Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **2011**; 30: 343-354.
23. Monecke S, Slickers P and Ehricht R. Assignment of Staphylococcus aureus isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. FEMS Immunol Med Microbiol, **2008**; 53: 237-251.
24. Park SY, Chong YP, Park HJ*, et al.* agr Dysfunction and persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in patients with removed eradicable foci. Infection, **2013**; 41: 111-119.
25. Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimaraes MA, Ferreira-Carvalho BT and Figueiredo AM. agr RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of Staphylococcus aureus. Microbiology, **2008**; 154: 3480-3490.

26. Ferreira FA, Souza RR, de Sousa Moraes B*, et al.* Impact of agr dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV. BMC Microbiol, **2013**; 13: 93.

27. Sinha B and Fraunholz M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. Int J Med Microbiol, **2010**; 300:170-175.

28. Seng P, Drancourt M, Gouriet F*, et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis, **2009**; 49: 543-551.

29. Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD*, et al.* Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. Clin Infect Dis, **2006**; 42: 471-478.

30. Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA*, et al.* A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus prosthetic joint infections managed with implant retention. Clin Infect Dis, **2013**; 56: 182-194.

VII. Action intra-ostéoblastique des antibiotiques : un nouveau paramètre à prendre en compte dans le traitement des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* ?

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, le choix de l'antibiothérapie dans le traitement des IOA staphylococciques est aujourd'hui principalement guidé par l'activité anti-bactérienne intrinsèque des molécules disponibles et leur diffusion intra-osseuse [4,5,11–13,33,112]. Toutefois, l'impact thérapeutique potentiel des mécanismes physiopathologiques bactériens impliqués dans les IOA a récemment été pris en compte dans les recommandations. En particulier, du fait de son activité « anti-biofilm », la rifampicine a ainsi pris une place de choix dans la stratégie thérapeutique des IOA, notamment en cas de traitement conservateur d'une IOA sur matériel orthopédique [252,269,270]. En revanche, alors que l'internalisation staphylococcique au sein de cellules osseuses non phagocytaires telles que les ostéoblastes pourrait conduire à la constitution d'un autre réservoir bactérien à l'origine de la chronicité et de rechute, l'action intracellulaire des anti-staphylococciques n'est en revanche actuellement pas prise en compte dans l'élaboration des stratégies thérapeutiques des IOA. Ceci s'explique par le fait qu'il n'existe que peu de données sur le sujet. En effet, les principales études disponibles sur l'activité intra-cellulaire des antibiotiques évaluent l'action de quelques molécules utilisées à fortes doses dans des modèles d'infection de cellules mono-macrophagiques [300,301,306]. De même, si les profils de sensibilité SCV aux antibiotiques des souches sont souvent moins favorables que ceux des souches de phénotype usuel, ces différences ne sont actuellement pas prises en compte dans les choix thérapeutiques des IOA [312,319,320].

Sur la base des résultats présentés dans les pages précédentes, confirmant l'importante du processus d'internalisation bactérienne par les ostéoblastes dans les phénomènes de chronicisation des IOA staphylococciques, nous avons souhaité évaluer l'activité intra-cellulaire des principaux anti-staphylococciques dans notre modèle. Les antibiotiques et le mode de vie intra-cellulaire pouvant constituer un mode de sélection de SCV, nous avons également évalué l'impact de ces antibiotiques sur l'émergence intra-cellulaire de SCV.

Antimicrobial activity against intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus*: a new therapeutic concept for bone and joint infection?

Florent Valour[1,2]*, Sophie Trouillet-Assant[2], Natacha Riffard[2], Jason Tasse[2], Sacha Flammier[2], Jean-Philippe Rasigade[2,3], Christian Chidiac[1,2], François Vandenesch[2,3,4], Tristan Ferry[1,2], and Frédéric Laurent[2,3,4], on behalf of the Lyon BJI study group

[1]Infectious diseases department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; [2]INSERM U1111, International Centre for Research in Infectiology, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; [3]Laboratory of Bacteriology, Hospices Civils de Lyon, France; [4]French National Reference Center for Staphylococci, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

***Corresponding author:** Florent Valour; Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, Laboratoire de bactériologie; 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon – France; Phone: 00.33.4.72.07.18.37; Fax: 00.33.4.72.07.18.42; Email adress: florent.valour@chu-lyon.fr

Running title: Antibiotic activity against intra-osteoblastic *S. aureus*

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Bone and joint infection; Antimicrobial intracellular activity.

Article soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Synopsis

Objectives: Although *S. aureus* persistence in osteoblasts, partly as small-colony variants (SCVs), can contribute to bone and joint infection (BJI) relapses, the intracellular activity of antimicrobials is not currently considered in the choice of treatment strategies for BJI. Here, antistaphylococcal antimicrobials are evaluated for their intra-osteoblastic activity and their impact on the intracellular emergence of SCVs in an *ex vivo* osteoblast infection model.

Methods: Osteoblastic MG63 cells were infected for 2 h with HG001 *S. aureus*. After killing the remaining extracellular bacteria with lysostaphin, infected cells were incubated for 24 h with antimicrobials at the intraosseous concentrations reached with standard therapeutic doses. Intracellular bacteria and SCVs were then quantified by plating cell lysates.

Results: A bactericidal effect was observed with fosfomycin, linezolid, tigecycline, oxacillin, rifampin, ofloxacin, and clindamycin, with a reduction in intracellular inoculum of -2.5, -3.1, -3.9, -4.2, -4.9, -4.9, and -5.2 log10 CFU/100,000 cells, respectively ($p<10^{-4}$). Conversely, a bacteriostatic effect was observed with ceftaroline and teicoplanin, whereas vancomycin and daptomycin had no significant impact on intracellular bacterial growth. Ofloxacin, daptomycin, and vancomycin significantly limited intracellular SCV emergence. Overall, ofloxacin was the only molecule to combine an excellent intracellular activity while limiting the emergence of SCVs.

Conclusions: These data provide a basis for refining the choice of antibiotics to prioritise in the management of BJI, justifying the combination of a fluoroquinolone for its intracellular activity with an anti-biofilm molecule, such as rifampin.

Introduction

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

To date, the choice of antimicrobial therapy for *S. aureus* BJI is mainly based on the *in vitro* antibacterial activity and bone diffusion of antimicrobials.[1,2,16] Recently, certain pathophysiological mechanisms of BJI have also been taken into consideration. For instance, the use of rifampin is recommended in ODI due to its activity into staphylococcal biofilm.[16,17] Although *S. aureus* can be internalised into human osteoblasts and persist in bone cells partly as SCVs, which can lead to an intracellular bacterial reservoir responsible for BJI chronicity and relapse, the intracellular activity of antimicrobials is not currently considered in the treatment strategies of BJI. Therefore, we aimed to evaluate the intra-osteoblastic activity of the main antimicrobials used for staphylococcal BJI in an *in vitro* model of osteoblast infection and to assess their impact on the emergence of intracellular SCVs.

Materials and methods

Bacterial strain

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

MG63 osteoblastic cell culture

All cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, United Kingdom). The human osteoblastic cell line MG63 (CRL-1427),[18] purchased from LGC standard (USA), was routinely cultured in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere in a growth medium (CGM) consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum, 25 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine +/- 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (CGM with antibiotic). The cells were passaged once a week and used up to passage 20 after thawing. Prior to assays, osteoblasts were seeded at 40,000 cells per well into 48-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) in 500 µL of growth medium with antibiotics and cultured for 24 h until 70 to 80% confluence.

Bacterial suspension standardisation and osteoblast infection

Prior to the assays, the *S. aureus* HG001 strain was subcultivated on Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (COS, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37°C for 24 h. Three colonies were then used to inoculate 5 mL of brain-heart infusion (BHI; AES, Bruz, France) incubated overnight at 37°C. The suspensions were washed and resuspended in CGM at a concentration corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of 100 using a previously established clone-specific regression formula correlating the bacterial density (CFU/mL) with the optical density at 600 nm (OD_{600}): CFU/mL = 7.10^8 x OD_{600} – 3.10^7 (data not shown). Normalised bacterial suspensions were then sonicated for 10 min at 100% (Bactsonic, LaboModern, Paris, France) to minimise clumping and added to the bone cell culture wells. After incubation for 30 min at 4°C to allow sedimentation of the bacteria while blocking internalisation, all the cultures were simultaneously transferred to 37°C to synchronise the beginning of the internalisation step. After 2 h, the cell cultures were washed twice with 500 µL of DMEM and incubated for 1 h with growth medium supplemented with

10 µg/mL lysostaphin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) to kill the remaining extracellular staphylococcal cells.

Antimicrobial intracellular activity and impact on intracellular SCV selection

After killing the extracellular bacteria with lysostaphin, the infected cells were washed twice with DMEM and incubated for 24 h with growth medium containing the tested antimicrobials at three concentrations. "Bone concentration" (C_{bone}) corresponded to the intraosseous concentrations reached in humans when using standard therapeutic dosages and was determined after a pharmacologic literature review.[19,20] These molecules were also used at minimal ($C_{min} = C_{bone} / 3$) and maximal ($C_{max} = C_{bone} \times 3$) concentrations to assess the existence of potential dose effects (Table 1). For each condition, lysostaphin at 10 µg/mL was also added to the growth medium to kill the bacteria released upon host cell lysis, thus preventing these bacteria from reinfecting new host cells.

After 24 h of incubation, the osteoblasts were washed twice with DMEM and subsequently lysed by a 10-minute incubation with sterile water. Cell lysates were sonicated to minimise clumping, and dilutions of these lysates were spiral-plated in duplicate on COS using a WASP automated plater (AES Chemunex, Bruz, France). After overnight incubation at 37°C, the plates were photographed, and the colonies were counted using automated computer image analysis software (ImageJ. Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012). SCVs, defined as colonies with an area smaller than 5-fold less than the median area measured for all colonies on each plate, were enumerated.

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

Statistical analysis

For every concentration, each antimicrobial was evaluated in triplicate during three independent experiments. The results are presented as the mean, with the 95% confidence interval (CI) of the 9 measure points available for each condition. To standardise the results, intracellular inocula were normalised for 100,000 osteoblasts and expressed as changes observed in the number of intracellular colony-forming units (Δlog CFU) at 24 h compared

with untreated cells using the Mann-Whitney U-test. Intracellular SCVs were expressed using the ratio of the number of SVC colonies among antimicrobial-treated cells compared to untreated osteoblasts. The existence of a dose effect was assessed by linear regression between the three used concentrations. A p-value <0.05 was considered to be significant. All analyses were performed using GraphPad-Prism v5.03 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Results

Susceptibility studies

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

Antimicrobial	MIC	Usual plasmatic concentration	Usual bone:plasma ratio	C_{min}	C_{bone}	C_{max}
Beta-lactams						
Oxacillin	0.094	50	0.17	3.33	10	30
Ceftaroline	0.19	20	0.19	1.33	4	12
Clindamycin	0.032	4-14	0.35	1.33	4	12
Fosfomycin	2	4-14	0.35	1.33	4	12
Glyco/lipopeptides						
Vancomycin	1.5	20-40	0.21	2	6	18
Teicoplanin	1.5	10-70	0.21	1	3	9
Daptomycin	0.19	4-11	0.24	1.7	5	15
Linezolid	1	20	0.4	2.67	8	24
Ofloxacin	0.5	5	0.5	0.67	2	6
Rifampin	0.004	10-30	0.27	2	6	18
Tigecycline	0.125	0.2-1.5	0.35	0.1	0.3	0.9

Table 1. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus HG001 and antimicrobial concentrations. *All concentrations are expressed in mg/L. MICs were determined by the standard diffusion method (E-test). Plasmatic and bone/plasma concentration ratios were determined after a literature review, especially from the review from Landersdorfer et al.*[22]

C_{bone}: Bone concentration; C_{min}: Minimal concentration; C_{max}: Maximal concentration; MIC: Minimal inhibitory concentration.

Antimicrobial-induced cellular toxicity

The data obtained by the LDH-release assay demonstrated that the antimicrobials used at C_{max} (and consequently at C_{min} and C_{bone}) had no impact on LDH concentration in the supernatant, and thus were not responsible for cell death.

Intracellular action

The intracellular effect of the antimicrobials was expressed by the inoculum change between the initial and 24 h inocula (Δlog-CFU) and compared with untreated cells. Of note, the mean initial inoculum was $1.8x10^6$ CFU/100,000 osteoblasts (95%CI [$1.4x10^6$; $2.1x10^6$]).

At the bone concentration, vancomycin and daptomycin were not able to significantly prevent the intracellular growth observed in untreated cells (+3.2 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [+2.1; +4.3]), highlighted by an intracellular inoculum increase of +2.9 (95%CI [+0.8; +4.9]; p=0.830) and +1.7 (95%CI [-0.7; +4.0]) log10 CFU/100,000 cells (p=0.070), respectively. Compared to untreated cells, an intracellular bacteriostatic effect was observed with ceftaroline and teicoplanin, which was estimated at -0.1 (95%CI [-2.5; +2.3]; p=0.002) and -0.2 (95%CI [-2.7; +2.3]; p=0.001) log10 CFU/100,000 osteoblasts, respectively. At the bone concentration, a significant bactericidal effect was observed with fosfomycin (-2.5 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-0.6; -4.5]; $p<10^{-4}$), linezolid (-3.1 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-2.9; -4.8]; $p<10^{-4}$), tigecycline (-3.9 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-2.9; -4.8]; $p<10^{-4}$), oxacillin (-4.2 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-3.1; -5.3]; $p<10^{-4}$), rifampin (-4.9 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-4.8; -4.9]; $p<10^{-4}$), ofloxacin (-4.9 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-4.9; -5.0]; $p<10^{-4}$), and clindamycin (-5.2 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-5.1; -5.2]; $p<10^{-4}$) (Figure 1, panel A; Supplementary data 1).

At the minimal concentration, only rifampin (-4.7 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-4.9; -4.6]; $p<10^{-4}$), clindamycin (-5.2 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-5.2; -5.1]; $p<10^{-4}$), ofloxacin (-3.2 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-4.9; -1.4]; $p<10^{-3}$), and fosfomycin (-3.7 log10 CFU/100,000 cells; 95%CI [-5.1; -2.3]; $p<10^{-4}$) were bactericidal. At the maximal concentration, all antibiotics were bactericidal, with the exception of vancomycin and daptomycin (Figure 2; Supplementary date 1).

The combined analysis of the three concentrations used for each antimicrobial revealed a significant dose effect for oxacillin, ceftaroline, vancomycin, daptomycin, tigecycline, and ofloxacin (Figure 2; Supplementary data 1).

Impact of antistaphylococcal antibiotics on intracellular SCV emergence

After 24 h, the number of SCVs in untreated cells was 13,514/100,000 osteoblasts (95%CI [6,448; 20,580]), corresponding to 4.1% (95%CI [2.6-5.7]) of all colonies. Our data showed that this number did not increase, regardless of the antibiotic and concentration tested.

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

Additionally, oxacillin (-92.2%; 95%CI [-85.4; -99.0]; $p<10^{-3}$), ceftaroline (-17.1; 95%CI [-102.1; +136.4]; p=0.044), linezolid (-64.2; 95%CI [-93.1; -35.4]; p=0.023), fosfomycin (-94.7; 95%CI [-87.1; +102.4]; $p<10^{-3}$), and tigecycline (-8.1; 95%CI [-129.0; +145.2]; p=0.015) reduced the proportion of intracellular SCVs but only at the maximum concentration.

A slight but significant dose effect was observed only with oxacillin (Figure 3, Supplementary data 1). Other differences were not statistically significant.

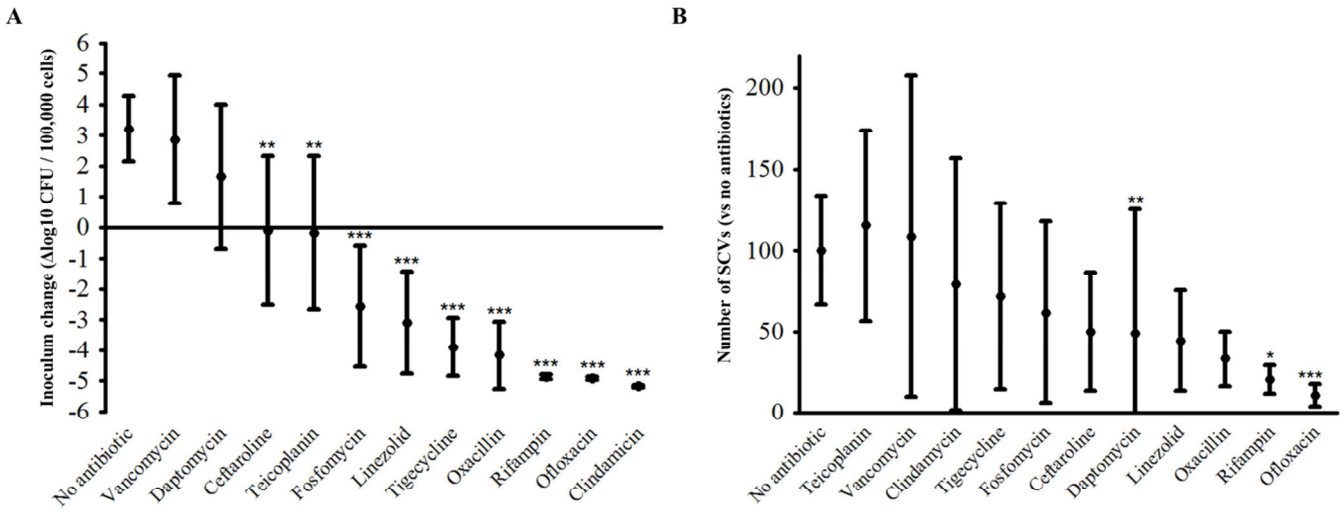


Figure 1. Intraosteoblastic inoculum change and intracellular proportion of small-colony variants in the presence of the main antistaphylococcal molecules at the usual bone concentration.

Change in the number of intracellular CFU (Δlog CFU; means +/- 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of $1.8x10^6$ (95%CI $1.4x10^6$ - $2.1x10^6$) for 100,000 osteoblasts, was compared to untreated cells (Mann-Whitney U-test).

*CFU: Colony-forming units; CI: confidence interval; SCV: Small-colony variants; ** p<0.01; *** p<0.001.*

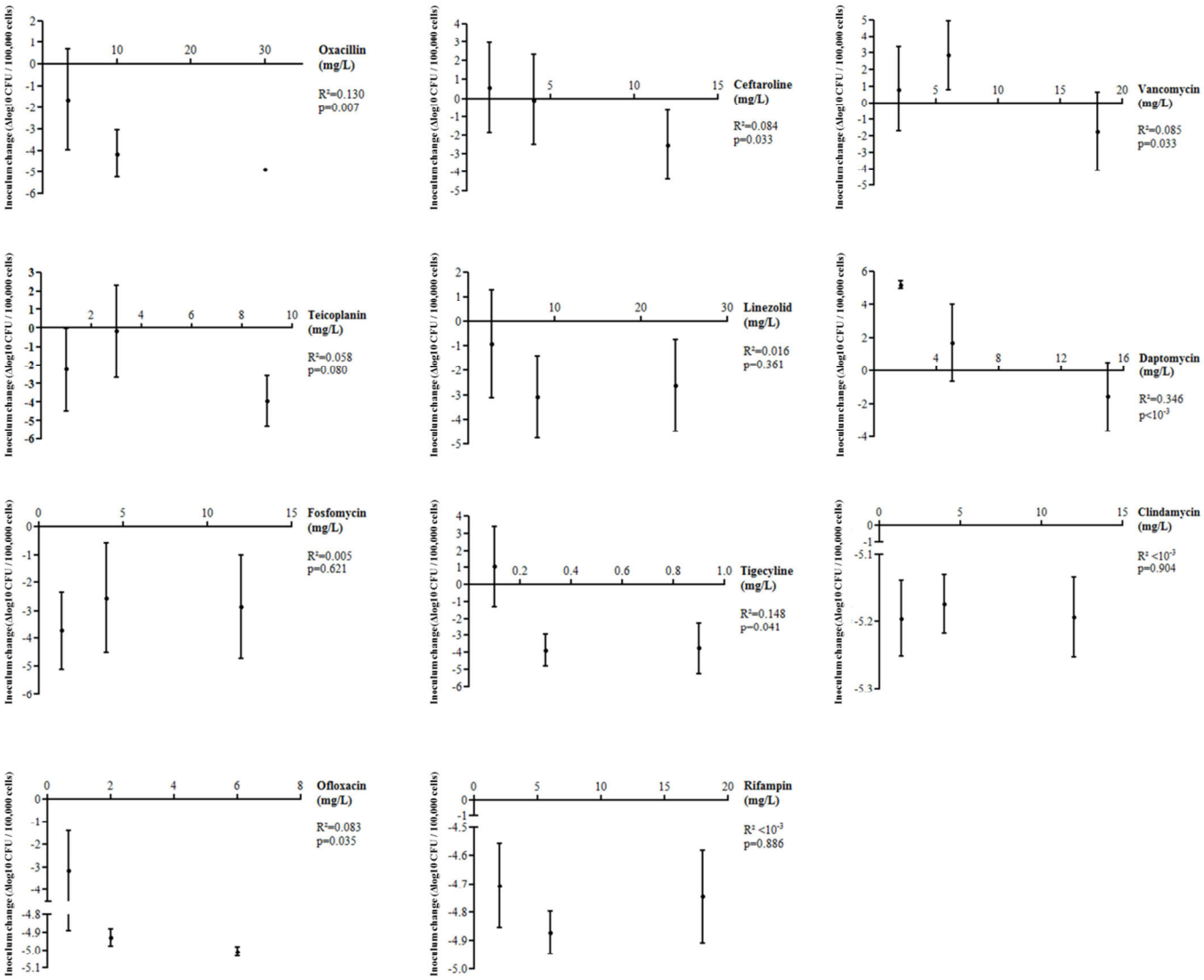


Figure 2. Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on intraosteoblastic inoculum.

The results are expressed by the change in the number of intracellular CFU (Δlog CFU; means +/- 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of $1.8x10^6$ (95%CI $1.4x10^6$ - $2.1x10^6$) for 100,000 osteoblasts. Dose effect was assessed using linear regression between the three used concentrations.

*CFU: Colony forming units; CI: confidence interval; * $p<0.05$.*

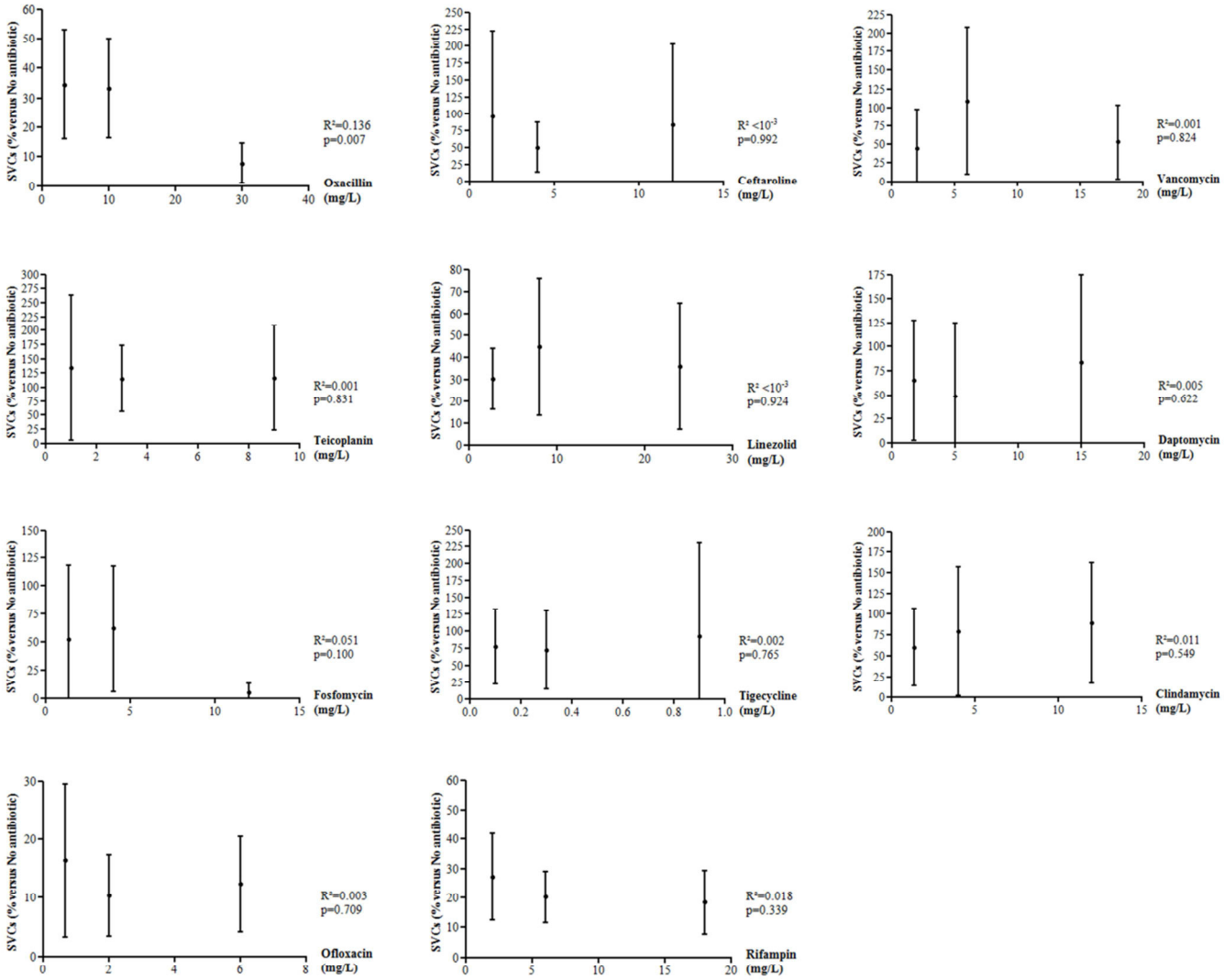


Figure 3. Dose effect of the main antistaphylococcal molecules on the intraosteoblastic emergence of small-colony variants.

Change in the number of intracellular CFU (Δlog CFU; means +/- 95%CI) at 2 h, starting from an initial intracellular inoculum of $1.8x10^6$ (95%CI $1.4x10^6$ - $2.1x10^6$) for 100,000 osteoblasts, was compared with untreated cells (Mann-Whitney U-test). The dose effect was assessed using linear regression between the three used concentrations.

*CFU: Colony-forming units; CI: confidence interval; SCV: Small-colony variants; * $p<0.05$.*

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

Supplementary data 1. Summary of the antimicrobial impact on intracellular global inoculum and SCVs.

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

Discussion

Considering that intra-osteoblastic *S. aureus* constitutes a bacterial reservoir leading to chronicity and relapse,[11,12] targeting intracellular bacteria might be a major therapeutic issue in the antimicrobial therapy for BJI and should to be taken into account. Compared with previous evaluations of the intracellular activity of antimicrobials, the present study was specifically adapted to BJI by the following: i) the use of a human osteoblast infection model, thereby allowing a better estimation of the situation encountered in BJI, as opposed to using monocyte-macrophage cells, as previously described;[21,22] and ii) the evaluation of the antimicrobial intraosseous concentrations reached in humans when using standard therapeutic doses and not plasmatic (or higher) concentrations, which do not correspond to the therapeutic tissue reality.[19]

At the bone concentration, vancomycin and daptomycin did not result in a significant reduction in the intracellular inoculum, and ceftaroline and teicoplanin appeared only bacteriostatic. Conversely, the other tested antimicrobials achieved a significant intracellular bactericidal effect: rifampin, ofloxacin, and clindamycin were the most active molecules. These results must be analysed with regard to the relative intracellular distribution of bacteria and antimicrobials and the physicochemical parameters of intracellular compartments. After the internalisation step, *S. aureus* is processed in a phagolysosome, which is characterised by a low pH, and certain *S. aureus* strains are able to escape from the phagosome. The proportion of bacteria released into the cytoplasm depends on the time from infection (ranging from 10-30% at 2 h to 60-80% after 8 h) but also on various virulence factors including delta- and beta-toxins and phenol-soluble modulins.[23] Within this context, the low activity of vancomycin on intracellular staphylococci can consequently lie in its slow uptake and modest cellular accumulation[24] compared to teicoplanin, a more lipophilic glycopeptide, which shows a more extensive and faster accumulation.[25] Conversely, the good intracellular activity of clindamycin, fluoroquinolones, and rifampin can be explained by their well-known rapid accumulation in eukaryotic cells.[26–28] However, fluoroquinolones are mainly located in the cytosol, whereas clindamycin and rifampin are distributed both in the cytosol and phagosomes, likely allowing these molecules to target all intracellular *S. aureus* cells.[29] Moreover, the local environment, and especially the acidic pH, can be unfavourable to the activity of some antibiotics. For instance, such conditions only slightly affect fluoroquinolones and clindamycin, with the retention of their good intracellular activity.[29] Interestingly, some studies have even shown that methicillin-resistant *S. aureus* strains

recover their susceptibility to β-lactam antibiotics when they are phagocytised by eukaryotic cells due to the acidic pH in phagolysosomes.[30,31] Indeed, penicillin-binding protein (PBP) 2a, a low β-lactam-affinity PBP encoded by the *mecA* gene and conferring resistance to penicillin, can be acetylated by β-lactams due to a pH-induced conformational change.[32] This mechanism can possibly be involved in the increased intracellular activity of β-lactams against MSSA due to a similar conformational modification of natural PBPs.

To our knowledge, only two studies previously assessed the intra-osteoblastic activity of some antimicrobials. Kreis et al. recently obtained results concordant with ours using tigecycline and rifampin but with tigecycline concentrations 30-fold higher than therapeutic bone concentrations.[33] Ellington et al. also suggested an excellent intra-osteoblastic activity of rifampicin, clindamycin, and macrolides, but these compounds were used at MICs and not at bone concentrations.[21] Other studies were performed using monocyte or macrophage cell lines, showing that the intracellular activity of the anti-staphylococcal depends on the exposure time and the extracellular concentration of the molecules tested, which emphasises the importance of using therapeutic bone concentrations.[34] As in the present work, these studies have also highlighted a superiority of fluoroquinolones on internalised bacteria and the inefficiency of vancomycin in macrophages.[34-36] Finally, animal models have also been used to evaluate the intracellular activity of anti-staphylococcal molecules. In a mouse model of staphylococcal peritonitis, Sandberg et al. classified the intracellular activity of antimicrobials as follows: dicloxacillin > rifampin > gentamicin.[37] However, a peritonitis model does not match the tissue reality of BJI, for which antibiotic diffusion problems is a major concern. In another mouse model of foreign-device infection, Murillo et al. confirmed the superiority of fluoroquinolones over β-lactam antibiotics in the eradication of intracellular *S. aureus*.[38]

The interpretation of the results obtained for SCVs is more complex, as the observed results after 24 h of treatment is a balance between the emergence of these phenotypic variants, which can be promoted by the stress induced by the tested antibiotics themselves, and the efficacy of these same antibiotics on the SCVs. A previous study has shown that most antibiotics were able to kill intracellular SCVs, depending on the concentration used.[39] Using a therapeutic concentration, we showed that among intracellularly active antimicrobials, only ofloxacin was able to limit the intracellular emergence of SCVs. Finally, an accurate definition of SCV, involving not only colony size but also metabolism markers, for example, is lacking and may have helped to more precisely describe these variants.

Some limitations of our study must be addressed. First, only one *S. aureus* reference strain was tested, which may represent a limitation to the extrapolation of our results to different

clinical isolates. Moreover, it would have been interesting to assess the intracellular concentrations of antibiotics, which was not technically feasible in our laboratory. Nevertheless, as mentioned above, only a sub-cellular pharmacodynamics analysis would have been relevant, taking into account both the intracellular location of bacteria and antimicrobials. Thus, the binding of each antimicrobial to culture medium proteins was not considered and may have impacted the available amount of antibiotic for intracellular diffusion. However, this parameter is rarely taken into account in bone diffusion studies in the literature. Consequently, the choice of concentrations used in our study is most likely the most relevant according to current pharmacological knowledge. Finally, antimicrobials were added after a two-hour period of cell infection. However, Ellington et al. showed that the intracellular antibiotic activity decreased when staphylococci persisted for 12 hours intracellularly before treatment, likely due to a change in the bacterial cell wall.[21] A similar study using various incubation periods could be interesting to confirm these results under our experimental conditions.

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

Acknowledgments

Lyon Bone and Joint Infection Study Group: Physicians – *Florence Ader, François Biron, André Boibieux, Anissa Bouaziz, Evelyne Braun, Christian Chidiac, Fatiha Daoud, Tristan Ferry, Judith Karsenty, Johanna Lippman, Patrick Miailhes, Thomas Perpoint, Dominique Peyramond, Marie-Paule Vallat, Florent Valour;* **Surgeons** – *Cédric Barrey, Pierre Breton, Fabien Boucher, Romain Desmarchelier, Michel-Henry Fessy, Olivier Guyen, Christophe Lienhart, Sébastien Lustig, Alain-Ali Mojallal, Philippe Neyret, Franck Trouillet, Gualter Vaz, Antony Viste;* **Microbiologists** – *Frédéric Laurent, Jean-Philippe Rasigade, François Vandenesch*; **Nuclear Medicine** – *Emmanuel Deshayes, Francesco Giammarile, Marc Janier, Isabelle Morelec;* **PK/PD specialists** – *Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle, Michel Tod;* **Clinical Research Assistant –** *Eugénie Mabrut.*

Funding

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

Transparency declarations

All authors declare no conflict of interest.

References

1. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004; **364**: 369–79.

2. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1645–54.

3. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; **339**: 520–32.

4. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F *et al*. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr Infect Dis Rep* 2005; **7**: 420–8.

5. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH *et al*. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; **52**: 13–22.

6. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; **11**: 1034–43.

7. Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML *et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 47.

8. Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 2005; **87**: 1343–7.

9. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK *et al*. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1999; **26**: 317–23.

10. Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC *et al*. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1995; **19**: 409–19.

11. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T *et al.* PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PloS One* 2013; **8**: e63176.

12. Valour F, Rasigade JP, Trouillet S *et al*. Intra-osteoblastic persistence of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: an adaptative mechanism of bone and joint infection chronicity. In: *Abstracts of the fifty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 2012.* Abstract B-1319, p. 143. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

13. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M *et al*. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1995; **20**: 95–102.

14. Tuchscherr L, Medina E, Hussain M *et al. Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 2011; **3**: 129–41.

15. Von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* 2006; **37 Suppl 2**: S26–33.

16. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR *et al.* Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2013; **56**: e1–e25.

17. Saginur R, Stdenis M, Ferris W *et al.* Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 55–61.

18. Pautke C, Schieker M, Tischer T *et al.* Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* 2004; **24**: 3743–8.

19. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M *et al*. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet* 2009; **48**: 89–124.

20. Chirouze C, Muret P, Berthier F *et al*. Penetration of daptomycin into bone and joint. Abstracts of the 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, IL, 2011. Abstract A1-1745. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

21. Ellington JK, Harris M, Hudson MC *et al*. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2006; **24**: 87–93.

22. Mélard A, Garcia LG, Das D *et al*. Activity of ceftaroline against extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) forms of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: comparison with vancomycin, linezolid and daptomycin. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**:648-58.

23. Fraunholz M, Sinha B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; **2**: 43.

24. Beauchamp D, Gourde P, Simard M *et al*. Subcellular localization of tobramycin and vancomycin given alone and in combination in proximal tubular cells, determined by immunogold labeling. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 2204–10.

25. Maderazo EG, Breaux SP, Woronick CL *et al*. High teicoplanin uptake by human neutrophils. *Chemotherapy* 1988; **34**: 248–55.

26. Easmon CS, Crane JP. Cellular uptake of clindamycin and lincomycin. *Br J Exp Pathol* 1984; **65**: 725–30.

27. García I, Pascual A, Ballesta S *et al*. Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Int J Antimicrob Agents* 2000; **15**: 201–5.

28. Höger PH, Vosbeck K, Seger R *et al*. Uptake, intracellular activity, and influence of rifampin on normal function of polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **28**: 667–74.

29. Carryn S, Chanteux H, Seral C *et al*. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin North Am* 2003; **17**: 615–34.

30. Lemaire S, Olivier A, Van Bambeke F *et al*. Restoration of susceptibility of intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams: comparison of strains, cells, and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2797–805.

31. Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P *et al*. Role of acidic pH in the susceptibility of intraphagocytic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to meropenem and cloxacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1627–32.

32. Lemaire S, Fuda C, Van Bambeke F *et al*. Restoration of susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactam antibiotics by acidic pH: role of penicillin-binding protein PBP 2a. *J Biol Chem* 2008; **283**: 12769–76.

33. Kreis CA, Raschke MJ, Roßlenbroich SB *et al*. Therapy of intracellular *Staphylococcus aureus* by tigecycline. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 267.

34. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P *et al*. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 841–51.

35. Brinch KS, Tulkens PM, Van Bambeke F *et al*. Intracellular activity of the peptide antibiotic NZ2114: studies with *Staphylococcus aureus* and human THP-1 monocytes, and comparison with daptomycin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1720–4.

36. Lemaire S, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC *et al*. Activity of moxifloxacin against intracellular community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison with clindamycin, linezolid and co-trimoxazole and attempt at defining an intracellular susceptibility breakpoint. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 596–607.

37. Sandberg A, Hessler JHR, Skov RL, Blom J *et al*. Intracellular activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1874–83.

28. Murillo O, Pachón ME, Euba G *et al.* Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection caused by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 1062–6.

39. Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC *et al.* Pharmacodynamic evaluation of the activity of antibiotics against hemin- and menadione-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in models of extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 3700–11.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos travaux de recherche ont abordé les mécanismes bactériens impliqués dans la physiopathologie des IOA staphylococciques, incluant la formation de biofilm, l'internalisation par les ostéoblastes, et l'évolution vers le phénotype SCV. Les interactions entre les services de maladies infectieuses, de chirurgie orthopédique, de microbiologie et de recherche fondamentale développées dans le cadre du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, INSERM U1111) et du CRIOAC des Hospices Civils de Lyon nous ont donné l'opportunité rare de corréler résultats bactériologiques fondamentaux et données cliniques. Cette approche translationnelle a motivé l'orientation de nos travaux vers les principales problématiques rencontrées par les cliniciens lors de la prise en charge de patients atteints d'IOA : i) les mécanismes impliqués dans la **genèse de l'IOA**, via le lien complexe entre portage et survenue d'infections invasives abordé par l'étude des IOA à *S. epidermidis* ; ii) le problème du **diagnostic**, et notamment de la reconnaissance initiale du caractère chronique de l'infection, avec la place potentielle de la détection de la delta-hémolysine comme marqueur de **chronicité** lié au réservoir intra-cellulaire et à la formation de biofilm ; et iii) l'évaluation de l'action intra-cellulaire des anti-staphylococciques, abord **thérapeutique** jusqu'ici peu mis en avant par les recommandations dans le choix des stratégies de prise en charge des IOA.

Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus epidermidis*

Le premier résultat apporté par notre étude est l'absence de pouvoir discriminant des capacités d'internalisation des ostéoblastes et de formation de biofilm entre souches de *S. epidermidis* commensales ou invasives. Comme développé en introduction, de nombreuses études se sont intéressées à cette question, sans pouvoir mettre en évidence de facteur génotypique clairement associé au pouvoir invasif potentiel de certains groupes de souches de portage. L'utilisation de marqueurs phénotypiques associés aux IOA (internalisation par les ostéoblastes et formation de biofilm) n'a pas été plus discriminante. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'infection à *S. epidermidis* constituerait un évènement accidentel survenant à partir de la flore commensale, et les souches de portage et invasives une seule entité microbiologique [8]. Toutefois, l'identification des souches les plus invasives parmi les souches de portage est une problématique essentielle, pouvant avoir des conséquences cliniques pratiques en termes de prévention des IOA, et notamment pour proposer une décontamination pré-opératoire ciblée aux patients porteurs des souches les plus agressives avant une chirurgie orthopédique.

Notre étude représente par ailleurs la première évaluation de la capacité d'interaction d'une large collection de souches cliniques de *S. epidermidis* responsables d'IOA avec les ostéoblastes. Nous avons mis en évidence que l'ensemble des souches de *S. epidermidis* testées étaient caractérisées par un très faible taux d'internalisation par les cellules osseuses. Ce résultat suggère une importance moindre de ce mécanisme physiopathologique dans les IOA à *S. epidermidis* par rapport à ce qui est observé chez l'espèce *S. aureus*. En 2007, dans des conditions expérimentales proches, Khalil et al. avaient au contraire concluent à un éventuel impact de l'internalisation de *S. epidermidis* dans les cellules osseuses [198]. Toutefois, ces résultats étaient basés sur un nombre limité de souches cliniques (n=4) dont une seule isolée d'IOA. De plus, seule une souche issue d'une péritonite présentait un taux d'internalisation significatif, et restant moindre que pour *S. aureus*. Couplés au fait que l'internalisation de *S. epidermidis* ait été décrite dans divers types de cellules hôtes non phagocytaires telles que les cellules épithéliales mammaires bovines, les cellules urothéliales, ou encore les cellules endothéliales [194–196,348,349], l'ensemble de ces résultats suggèrent l'implication de spécificités liées aux souches et aux cellules cibles testées. Il serait ainsi intéressant d'évaluer les capacités d'interaction de notre collection de souches issues d'IOA dans un autre modèle d'infection cellulaire, comme de mastite bovine par exemple, et inversement de tester les souches de *S. epidermidis* décrites comme invasives pour d'autres types cellules dans notre modèle d'infection d'ostéoblastes. Ce type d'expériences permettrait de déterminer l'origine bactérienne ou cellulaire de telles spécificités d'interaction, et d'explorer les mécanismes impliqués dans l'invasion cellulaire par *S. epidermidis* restant méconnus. L'implication d'Alt, une adhésine de la famille des autolysines interagissant avec la protéine Hsc70 cellulaire, a été suggérée [196]. De façon plus générale, et comme suggéré par une étude récente comparant des souches de SCN issues de bactériémies et d'IOA, l'implication d'autres adhésines telles que Aap et Bap pourrait également être évalué dans de tels modèles [231].

Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*

La première étape de ce travail a été de caractériser le fond génétique de notre large collection de 95 souches cliniques de SASM responsables d'IOA. Cette étude était un prérequis essentiel nous permettant de relier les phénomènes phénotypiques observés avec les caractéristiques cliniques des patients inclus, écartant le rôle d'une trop forte clonalité de notre collection. Cette démarche nous a toutefois permis de décrire la **forte prévalence du clone SASM**

CC398 dans les IOA en France. La diffusion récente du clone SARM CC398, dérivé de son pendant sensible à la méticilline, autorise à évoquer le caractère également émergent du SASM CC398 [339,343]. Toutefois, une seule étude s'était jusqu'ici intéressée au fond génétique des SASM impliqués dans les IOA, rendant cette conclusion discutable [338]. De plus larges études de prévalence, tant sur le plan géographique que chronologique, sont nécessaires pour confirmer ce phénomène. Même si elle pourrait relever d'une diffusion de ce clone au sein de l'ensemble des SASM, qu'ils soient responsables de portage ou d'infections, l'autre question soulevée par cette forte prévalence au sein des souches d'IOA est celle d'un potentiel tropisme particulier pour les tissus osseux et articulaires. L'absence de facteur de virulence génotypique particulier de ce clone fait envisager le rôle des mécanismes phénotypiques associés aux IOA. Toutefois, les premiers résultats observés avec les SASM CC398 lyonnais ne semblent pas mettre en évidence de capacité particulière en termes de formation de biofilm ou d'invasion des ostéoblastes. Ces résultats restent cependant à confirmer sur une plus large collection de souches.

Depuis les premiers travaux portant sur la capacité d'internalisation de *S. aureus* au sein de cellules non phagocytaires datant du milieu des années 90, ce mécanisme est devenu une hypothèse explicative de la persistance des infections staphylococciques, notamment lors des IOA [165,167,169–171]. Les études ayant fait suite à ces premières descriptions se sont attachées à en décrire les mécanismes, mettant notamment en évidence le rôle pivot des FnBP staphylococciques comme ligand de l'intégrine α5β1 cellulaire. Il a en effet été démontré que l'interaction FnBP - intégrine α5β1 déclenchait l'internalisation passive de la bactérie via un mécanisme cellulaire actif mettant en jeux le cytosquelette d'actine [165,167]. Toutefois, l'ensemble de ces études utilisait des souches de laboratoire, adaptées aux investigations mécanistiques, mais ne permettant pas la mise en évidence de la pertinence clinique de ce phénomène. Avec l'étude des capacités d'interaction des différents clones de SARM circulants avec les ostéoblastes, Rasigade et al. avaient approché cet objectif dans notre laboratoire [324]. En effet, les résultats de cette étude mettaient en évidence que les clones de SARM hospitaliers, usuellement associés à des formes indolentes et chronique d'IOA, étaient plus internalisés et moins cytotoxiques que les SARM communautaires, classiquement responsables d'IOA aiguës et très symptomatiques. Nos résultats sont cependant les premiers à valider sur des bases cliniques l'hypothèse du **rôle de l'internalisation de *S. aureus* par les ostéoblastes dans la chronicité des IOA**, en utilisant une large collection de SASM de fond

génétique très divers, et en utilisant comme seul critère de corrélation la durée d'évolution réellement observée chez les patients.

L'interprétation du rôle du **switch phénotypique intracellulaire vers les SCV** est plus délicate. Alors que ce mécanisme a été proposé comme associé à la chronicisation des IOA, nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence significative, tant sur le versant physiopathologique que thérapeutique. Néanmoins, nos résultats ne permettent pas d'éliminer définitivement un rôle des SCV en raison de l'importante variabilité des mesures observées. En fait, il n'existe actuellement pas de définition phénotypique univoque de ce morphotype, la plupart des études se basant en effet sur la taille des colonies [213]. En utilisant une méthode de comptage informatisée à partir de photos des géloses obtenues, nous avons tenté de standardiser cette mesure. Cependant, la variabilité des résultats obtenus suggèrent qu'une définition uniquement basée sur la taille des colonies n'est probablement pas suffisante. L'utilisation des critères métaboliques définissant les SCV, et notamment l'auxotrophie pour l'hémine ou la ménadione, pourrait en partie aider à résoudre ce problème. Nous pourrions ainsi imaginer une étude similaire en se basant sur ces critères biochimiques, toutefois lourde en termes de contraintes économiques et de temps.

Un autre point essentiel de nos travaux est représenté par la **relation entre la dysfonction du système *agr* et la chronicité des IOA**. Cette observation corrobore les données obtenues par d'autres auteurs dans le cadre des bactériémies, des infections respiratoires ou encore des infections sur matériel endo-vasculaire [234–236]. Sur la base de nos résultats, ce résultat est renforcé par l'association de cette dysrégulation du système *agr* avec les mécanismes phénotypiques associés à la chronicité, et notamment l'internalisation dans les ostéoblastes et la formation de biofilm. Ce dernier point renforce également l'hypothèse proposée par certains auteurs selon laquelle la relation entre la déficience du système *agr* et la chronicité des infections staphylococciques est en partie liée à une capacité augmentée de formation de biofilm [237,238].

De plus, il a été démontré dans notre laboratoire que la fonctionnalité du système *agr* peut être évaluée par la sécrétion de delta-hémolysine, produit de la traduction de l'ARNIII, effecteur du système *agr* [236]. La détection de la delta-hémolysine peut de plus être réalisée simplement par recherche de son pic protéique spécifique en spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS). Cette technologie étant de plus en plus utilisée en routine par les laboratoires de bactériologie pour l'identification bactérienne, elle apporte un moyen simple et instantané de connaître le statut du système *agr* d'une souche de *S. aureus* responsable

d'IOA, et ce dès le diagnostic. Etant donné la corrélation entre fonctionnalité du système *agr* et chronicité des IOA staphylococciques, cette technique pourrait représenter la première méthode objective d'évaluation du degré de chronicité d'une IOA au moment du diagnostic, et donc avoir un impact majeur sur la prise en charge des patients. En effet, les recommandations actuelles sur la prise en charge des IOA sur matériel orthopédique préconisent un traitement chirurgical conservateur (lavage, parage avec conservation du matériel) pour les infections aiguës, alors qu'une ablation du matériel est nécessaire pour toute infection chronique [5,11–13]. Cependant, la distinction actuelle entre formes aiguës et chroniques est arbitraire, basée sur un délai de 3 à 4 semaines entre le début des symptômes et la prise en charge. Hors, le traitement conservateur, même en cas de respect de ces recommandations, est grevé d'un taux d'échec de plus de 20%, atteignant même 50 à 90% dans certaines séries [346,347]. L'utilisation d'un algorithme basé sur l'absence de détection de la delta-hémolysine (et donc sur l'absence d'*agr* fonctionnel) pour définir la chronicité et donc poser l'indication de retrait du matériel serait à évaluer pour tenter de diminuer l'incidence de ces échecs. En effet, dans de nombreuses situations, le caractère insidieux de l'IOA rend extrêmement difficile la détermination de la date du début des symptômes, pouvant faire considérer à tort une IOA chronique pour une forme aiguë. De plus, certaines souches ont possiblement la capacité d'acquérir très rapidement les caractéristiques phénotypiques associées à la chronicité et être responsable d'échec de traitement conservateur, même précoce.

Comme développé en introduction, les IOA regroupent un ensemble très hétérogène de situations cliniques. Le caractère rétrospectif de notre étude n'a pas permis de prendre en compte cet écueil. La problématique de la chronicité des IOA est notamment moins cruciale en cas d'IOA natives telles que les arthrites septiques que pour les infections sur matériel orthopédique, pour lesquelles le délai d'évolution semble impacter plus particulièrement la physiopathologie, la prise en charge et le pronostic. Le délai d'évolution de 4 semaines communément admis pour distinguer IOA aiguës et chroniques étant arbitraire, il ne peut sans doute pas s'appliquer avec la même pertinence à l'ensemble des formes cliniques d'IOA et semble mieux adapté aux infections sur matériel orthopédique. Toutefois, les différences observées entre IOA aiguës et chroniques en termes d'internalisation bactérienne dans les ostéoblastes et de dysfonction du système *agr* ont été confirmées par la corrélation entre ces phénomènes et les délais d'évolution bruts, n'impliquant aucune limite arbitraire d'évolution. Cependant, nos hypothèses étant basées sur notre seule étude rétrospective, incluant des patients assez hétérogènes, un travail prospectif est actuellement en cours, incluant des

patients porteurs d'une IPA mono-microbienne à *S. aureus* bénéficiant d'un traitement conservateur, et évaluant leur pronostic selon le statut *agr* de la souche isolée (Etude Delta-Os).

Enfin, la démonstration de la pertinence clinique de l'internalisation de *S. aureus* au sein des ostéoblastes dans les IOA chroniques nous a mené à réaliser une étude préliminaire sur **l'action intra-ostéoblastique des antibiotiques à action anti-staphylococciques**. En effet, à l'image du rôle de la rifampicine comme agent « anti-biofilm », l'utilisation de molécules actives en intra-cellulaire pourrait être capital dans la prise en charge des patients porteurs d'une IOA chronique afin de limiter le risque de récidives à partir du réservoir intra-cellulaire. Si d'autres études portant sur l'activité des antibiotiques contre le staphylocoque intra-cellulaire avaient déjà été menées, notre modèle est particulièrement adapté à la situation des IOA, du fait : i) de l'utilisation d'un modèle d'infection d'ostéoblastes humains, alors que la plupart des autres études s'intéressaient aux cellules mono-macrophagiques [300–302] ; et ii) à l'utilisation des posologies rencontrées en thérapeutique humaine dans le cadre des IOA [112], tenant compte des doses habituellement utilisées et de la diffusion intra-osseuse des antibiotiques, les autres études utilisant principalement les doses plasmatiques. Dans notre étude, la rifampicine, l'ofloxacine et la clindamycine sont apparues comme les molécules les plus actives. Toutefois, cette étude préliminaire demande à être renforcée par d'autres conditions expérimentales et données pharmacologiques. En particulier, nous n'avons évalué l'action des anti-staphylococciques qu'après 2h d'infection cellulaire. Hors, il a été montré qu'une persistance plus prolongée en intra-cellulaire avant mise en contact avec les antibiotiques modifiait l'action des anti-staphylococciques, possiblement du fait de modifications de la paroi bactérienne [171]. L'utilisation d'un modèle similaire avec différents temps d'incubation pré-thérapeutiques pourrait donc affiner ces résultats. Un autre projet en cours d'élaboration visera l'étude de l'action intra-cellulaire des principales associations d'antibiotiques actuellement utilisées dans le traitement des IOA, et permettra de rechercher les combinaisons les plus efficaces et synergiques contre le réservoir staphylococcique intra-cellulaire. Enfin, des études *in vivo* seraient nécessaires pour valider l'ensemble de ces données, en adaptant par exemple les modèles animaux mis en place par d'autres équipes françaises au sein de futures collaborations [350].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Garcia-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. **2011**; 25:407–21.

2. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G. Bacterial septic arthritis in adults. Lancet **2010**; 375:846–55.

3. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. Lancet **2004**; 364:369–79.

4. Zimmerli W. Clinical practice. Vertebral osteomyelitis. N. Engl. J. Med. **2010**; 362:1022–9.

5. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N. Engl. J. Med. **2004**; 351:1645–54.

6. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, et al. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. J. Hosp. Infect. **2012**; 82:40–8.

7. McHenry MC, Easley KA, Locker GA. Vertebral osteomyelitis: long-term outcome for 253 patients from 7 Cleveland-area hospitals. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2002**; 34:1342–50.

8. Otto M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. Nat. Rev. Microbiol. **2009**; 7:555–567.

9. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. J. Hosp. Infect. **2001**; 49:87–93.

10. Uçkay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F. Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis. Ann. Med. **2009**; 41:109–119.

11. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2013**; 56:e1–e25.

12. Clinical practice recommendations. Osteoarticular infections on materials (prosthesis, implant, osteosynthesis. Med. Mal. Infect. **2009**; 39:815–63.

13. 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. **2014**;

14. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. Int. J. Med. Microbiol. IJMM **2010**; 300:193–204.

15. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell. Microbiol. **2009**; 11:1034–43.

16. Arciola CR, Hänsch GM, Visai L, et al. Interactions of staphylococci with osteoblasts and phagocytes in the pathogenesis of implant-associated osteomyelitis. Int. J. Artif. Organs **2012**; 35:713–726.

17. Von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. Injury **2006**; 37 Suppl 2:S26–33.

18. Tarkowski A. Infection and musculoskeletal conditions: Infectious arthritis. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. **2006**; 20:1029–44.

19. Calhoun JH, Manring MM, Shirtliff M. Osteomyelitis of the long bones. Semin. Plast. Surg. **2009**; 23:59–72.

20. Jennin F, Bousson V, Parlier C, Jomaah N, Khanine V, Laredo J-D. Bony sequestrum: a radiologic review. Skeletal Radiol. **2011**; 40:963–975.

21. Mader JT, Shirtliff M, Calhoun JH. Staging and staging application in osteomyelitis. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **1997**; 25:1303–9.

22. Cierny G, Mader JT, Penninck JJ. A clinical staging system for adult osteomyelitis. Clin. Orthop. **2003**; :7–24.

23. Mylona E, Samarkos M, Kakalou E, Fanourgiakis P, Skoutelis A. Pyogenic vertebral osteomyelitis: a systematic review of clinical characteristics. Semin. Arthritis Rheum. **2009**; 39:10–7.

24. Ainscow DA, Denham RA. The risk of haematogenous infection in total joint replacements. J. Bone Joint Surg. Br. **1984**; 66:580–2.

25. Lalani T, Chu VH, Grussemeyer CA, et al. Clinical outcomes and costs among patients with Staphylococcus aureus bacteremia and orthopedic device infections. Scand. J. Infect. Dis. **2008**; 40:973–7.

26. Murdoch DR, Roberts SA, Fowler Jr VG Jr, et al. Infection of orthopedic prostheses after Staphylococcus aureus bacteremia. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2001**; 32:647–9.

27. Sendi P, Banderet F, Graber P, Zimmerli W. Periprosthetic joint infection following Staphylococcus aureus bacteremia. J. Infect. **2011**; 63:17–22.

28. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2012**; 54:e132–73.

29. Zimmerli W, Sendi P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. Semin. Immunopathol. **2011**; 33:295–306.

30. ELEK SD, CONEN PE. The virulence of Staphylococcus pyogenes for man; a study of the problems of wound infection. Br. J. Exp. Pathol. **1957**; 38:573–586.

31. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. J. Infect. Dis. **1990**; 162:96–102.

32. Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. J. Clin. Invest. **1984**; 73:1191–1200.

33. Primary infectious spondylitis, and following intradiscal procedure, without prothesis. Recommendations. Med. Mal. Infect. **2007**; 37:573–83.

34. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. J. Bone Joint Surg. Am. **1996**; 78:512–23.

35. McPherson EJ, Tontz W Jr, Patzakis M, et al. Outcome of infected total knee utilizing a staging system for prosthetic joint infection. Am. J. Orthop. **1999**; 28:161–5.

36. McPherson EJ, Woodson C, Holtom P, Roidis N, Shufelt C, Patzakis M. Periprosthetic total hip infection: outcomes using a staging system. Clin. Orthop. **2002**; :8–15.

37. Al-Nammari SS, Gulati V, Patel R, Bejjanki N, Wright M. Septic arthritis in haemodialysis patients: a seven-year multi-centre review. J. Orthop. Surg. **2008**; 16:54–7.

38. Geirsson AJ, Statkevicius S, Vikingsson A. Septic arthritis in Iceland 1990-2002: increasing incidence due to iatrogenic infections. Ann. Rheum. Dis. **2008**; 67:638–43.

39. Kaandorp CJ, Van Schaardenburg D, Krijnen P, Habbema JD, van de Laar MA. Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease. A prospective study. Arthritis Rheum. **1995**; 38:1819–25.

40. Shirtliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. Clin. Microbiol. Rev. **2002**; 15:527–44.

41. Urquhart DM, Hanna FS, Brennan SL, et al. Incidence and risk factors for deep surgical site infection after primary total hip arthroplasty: a systematic review. J. Arthroplasty **2010**; 25:1216–22 e1–3.

42. Lamagni T. Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. J. Antimicrob. Chemother. **2014**; 69:i5–i10.

43. OECD. Hip and knee replacement. In: Health at a Glance 2011: OECD Indicators. 2011.

44. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. J. Bone Joint Surg. Am. **2007**; 89:780–5.

45. Huddleston JI, Wang Y, Uquillas C, Herndon JH, Maloney WJ. Age and obesity are risk factors for adverse events after total hip arthroplasty. Clin. Orthop. **2012**; 470:490–6.

46. Ong KL, Kurtz SM, Lau E, Bozic KJ, Berry DJ, Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. J. Arthroplasty **2009**; 24:105–9.

47. Peel TN, Dowsey MM, Daffy JR, Stanley PA, Choong PF, Buising KL. Risk factors for prosthetic hip and knee infections according to arthroplasty site. J. Hosp. Infect. **2011**; 79:129–33.

48. Zimmerli W. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. **2006**; 20:1045–63.

49. Namba RS, Inacio MC, Paxton EW. Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56,216 knees. J. Bone Joint Surg. Am. **2013**; 95:775–82.

50. Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Bozic KJ, Berry D, Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population. Clin. Orthop. **2010**; 468:52–6.

51. D'Agostino C, Scorzolini L, Massetti AP, et al. A seven-year prospective study on spondylodiscitis: epidemiological and microbiological features. Infection **2010**; 38:102–7.

52. Grammatico L, Baron S, Rusch E, et al. Epidemiology of vertebral osteomyelitis (VO) in France: analysis of hospital-discharge data 2002-2003. Epidemiol. Infect. **2008**; 136:653–60.

53. Akiyama T, Chikuda H, Yasunaga H, Horiguchi H, Fushimi K, Saita K. Incidence and risk factors for mortality of vertebral osteomyelitis: a retrospective analysis using the Japanese diagnosis procedure combination database. BMJ Open **2013**; 3. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533214.

54. Park KH, Chong YP, Kim SH, et al. Clinical characteristics and therapeutic outcomes of hematogenous vertebral osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Infect. **2013**; Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23916563.

55. Roblot F, Besnier JM, Juhel L, et al. Optimal duration of antibiotic therapy in vertebral osteomyelitis. Semin. Arthritis Rheum. **2007**; 36:269–77.

56. Cahill JL, Shadbolt B, Scarvell JM, Smith PN. Quality of life after infection in total joint replacement. J. Orthop. Surg. **2008**; 16:58–65.

57. Bozic KJ, Ries MD. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. J. Bone Joint Surg. Am. **2005**; 87:1746–51.

58. Parvizi J, Pawasarat IM, Azzam KA, Joshi A, Hansen EN, Bozic KJ. Periprosthetic joint infection: the economic impact of methicillin-resistant infections. J. Arthroplasty **2010**; 25:103–7.

59. Ryan MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL. Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period. Br. J. Rheumatol. **1997**; 36:370–373.

60. Dubost JJ, Soubrier M, De Champs C, Ristori JM, Bussiere JL, Sauvezie B. No changes in the distribution of organisms responsible for septic arthritis over a 20 year period. Ann. Rheum. Dis. **2002**; 61:267–9.

61. Jacobsson G, Dashti S, Wahlberg T, Andersson R. The epidemiology of and risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections in western Sweden. Scand. J. Infect. Dis. **2007**; 39:6–13.

62. Sendi P, Banderet F, Graber P, Zimmerli W. Clinical comparison between exogenous and haematogenous periprosthetic joint infections caused by Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2011**; 17:1098–100.

63. Van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, et al. Reclassification of Staphylococcus aureus nasal carriage types. J. Infect. Dis. **2009**; 199:1820–6.

64. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect. Dis. **2005**; 5:751–62.

65. Berthelot P, Grattard F, Cazorla C, et al. Is nasal carriage of Staphylococcus aureus the main acquisition pathway for surgical-site infection in orthopaedic surgery? Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. **2010**; 29:373–82.

66. Skråmm I, Fossum Moen AE, Arøen A, Bukholm G. Surgical Site Infections in Orthopaedic Surgery Demonstrate Clones Similar to Those in Orthopaedic Staphylococcus aureus Nasal Carriers. J. Bone Joint Surg. Am. **2014**; 96:882–888.

67. Czaplicki AP, Borger JE, Politi JR, Chambers BT, Taylor BC. Evaluation of postoperative fever and leukocytosis in patients after total hip and knee arthroplasty. J. Arthroplasty **2011**; 26:1387–9.

68. Ghosh S, Charity RM, Haidar SG, Singh BK. Pyrexia following total knee replacement. The Knee **2006**; 13:324–7.

69. Uckay I, Agostinho A, Stern R, Bernard L, Hoffmeyer P, Wyssa B. Occurrence of fever in the first postoperative week does not help to diagnose infection in clean orthopaedic surgery. Int. Orthop. **2011**; 35:1257–60.

70. Bernard L, Lubbeke A, Stern R, et al. Value of preoperative investigations in diagnosing prosthetic joint infection: retrospective cohort study and literature review. Scand. J. Infect. Dis. **2004**; 36:410–6.

71. Honsawek S, Deepaisarnsakul B, Tanavalee A, et al. Relationship of serum IL-6, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and knee skin temperature after total knee arthroplasty: a prospective study. Int. Orthop. **2011**; 35:31–5.

72. Health Protection Agency. Investigations of prosthetic joint infection samples. Natl. Stand. Method BSOP **2009**; 44. Available at: http://www.hpa.standardmethods.org.uk/pdf.

73. Li SF, Cassidy C, Chang C, Gharib S, Torres J. Diagnostic utility of laboratory tests in septic arthritis. Emerg. Med. J. EMJ **2007**; 24:75–7.

74. Margaretten ME, Kohlwes J, Moore D, Bent S. Does this adult patient have septic arthritis? JAMA J. Am. Med. Assoc. **2007**; 297:1478–88.

75. Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. Am. J. Med. **2004**; 117:556–62.

76. Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. J. Bone Joint Surg. Am. **2008**; 90:1869–75.

77. Bedair H, Ting N, Jacovides C, et al. The Mark Coventry Award: diagnosis of early postoperative TKA infection using synovial fluid analysis. Clin. Orthop. **2011**; 469:34–40.

78. Palestro CJ, Love C, Miller TT. Infection and musculoskeletal conditions: Imaging of musculoskeletal infections. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. **2006**; 20:1197–218.

79. Santiago Restrepo C, Gimenez CR, McCarthy K. Imaging of osteomyelitis and musculoskeletal soft tissue infections: current concepts. Rheum. Dis. Clin. North Am. **2003**; 29:89–109.

80. Mudun A, Unal S, Aktay R, Akmehmet S, Cantez S. Tc-99m nanocolloid and Tc-99m MDP three-phase bone imaging in osteomyelitis and septic arthritis. A comparative study. Clin. Nucl. Med. **1995**; 20:772–8.

81. Tumeh SS, Tohmeh AG. Nuclear medicine techniques in septic arthritis and osteomyelitis. Rheum. Dis. Clin. North Am. **1991**; 17:559–83.

82. Stumpe KD, Notzli HP, Zanetti M, et al. FDG PET for differentiation of infection and aseptic loosening in total hip replacements: comparison with conventional radiography and three-phase bone scintigraphy. Radiology **2004**; 231:333–41.

83. Pigrau C, Almirante B, Flores X, et al. Spontaneous pyogenic vertebral osteomyelitis and endocarditis: incidence, risk factors, and outcome. Am. J. Med. **2005**; 118:1287.

84. Nolla JM, Ariza J, Gomez-Vaquero C, et al. Spontaneous pyogenic vertebral osteomyelitis in nondrug users. Semin. Arthritis Rheum. **2002**; 31:271–8.

85. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. N. Engl. J. Med. **1970**; 282:198–206.

86. Marschall J, Bhavan KP, Olsen MA, Fraser VJ, Wright NM, Warren DK. The impact of prebiopsy antibiotics on pathogen recovery in hematogenous vertebral osteomyelitis. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2011**; 52:867–72.

87. Schafer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2008**; 47:1403–9.

88. Font-Vizcarra L, Garcia S, Martinez-Pastor JC, Sierra JM, Soriano A. Blood culture flasks for culturing synovial fluid in prosthetic joint infections. Clin. Orthop. **2010**; 468:2238–43.

89. Von Essen R, Holtta A. Improved method of isolating bacteria from joint fluids by the use of blood culture bottles. Ann. Rheum. Dis. **1986**; 45:454–7.

90. White LM, Schweitzer ME, Deely DM, Gannon F. Study of osteomyelitis: utility of combined histologic and microbiologic evaluation of percutaneous biopsy samples. Radiology **1995**; 197:840–2.

91. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N. Engl. J. Med. **2007**; 357:654–63.

92. Mackowiak PA, Jones SR, Smith JW. Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. JAMA J. Am. Med. Assoc. **1978**; 239:2772–5.

93. Perry CR, Pearson RL, Miller GA. Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. J. Bone Joint Surg. Am. **1991**; 73:745–9.

94. Zuluaga AF, Galvis W, Jaimes F, Vesga O. Lack of microbiological concordance between bone and non-bone specimens in chronic osteomyelitis: an observational study. BMC Infect. Dis. **2002**; 2:8.

95. Bernard L, Uckay I, Vuagnat A, et al. Two consecutive deep sinus tract cultures predict the pathogen of osteomyelitis. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. **2010**; 14:e390–3.

96. Hartley JC, Harris KA. Molecular techniques for diagnosing prosthetic joint infections. J. Antimicrob. Chemother. **2014**; 69:i21–i24.

97. Bori G, Soriano A, Garcia S, Mallofre C, Riba J, Mensa J. Usefulness of histological analysis for predicting the presence of microorganisms at the time of reimplantation after hip resection arthroplasty for the treatment of infection. J. Bone Joint Surg. Am. **2007**; 89:1232–7.

98. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. J. Clin. Pathol. **1999**; 52:118–23.

99. Kobayashi N, Bauer TW, Sakai H, et al. The use of newly developed real-time PCR for the rapid identification of bacteria in culture-negative osteomyelitis. Jt. Bone Spine Rev. Rhum. **2006**; 73:745–7.

100. Valour F, Blanc-Pattin V, Freydière A-M, et al. Rapid detection of Staphylococcus aureus and methicillin resistance in bone and joint infection samples: evaluation of the GeneXpert MRSA/SA SSTI assay. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **2013**;

101. Goldenberg DL, Brandt KD, Cohen AS, Cathcart ES. Treatment of septic arthritis: comparison of needle aspiration and surgery as initial modes of joint drainage. Arthritis Rheum. **1975**; 18:83–90.

102. Goldenberg DL, Cohen AS. Acute infectious arthritis. A review of patients with nongonococcal joint infections (with emphasis on therapy and prognosis). Am. J. Med. **1976**; 60:369–77.

103. Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2006**; 12:433–9.

104. Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, et al. Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2006**; 42:471–8.

105. Martinez-Pastor JC, Munoz-Mahamud E, Vilchez F, et al. Outcome of acute prosthetic joint infections due to gram-negative bacilli treated with open debridement and retention of the prosthesis. Antimicrob. Agents Chemother. **2009**; 53:4772–7.

106. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2006**; 43:961–7.

107. Von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, et al. Recovery of small colony variants of Staphylococcus aureus following gentamicin bead placement for osteomyelitis. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **1997**; 25:1250–1.

108. Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to Staphylococcus aureus. J. Antimicrob. Chemother. **1994**; 33:959–67.

109. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. JAMA J. Am. Med. Assoc. **1998**; 279:1537–41.

110. Conterno LO, da Silva Filho CR. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. Cochrane Database Syst. Rev. **2009**; :CD004439.

111. Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, Porzsolt F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. Lancet Infect. Dis. **2001**; 1:175–88.

112. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sorgel F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. Clin. Pharmacokinet. **2009**; 48:89–124.

113. Esposito S, Leone S, Noviello S, et al. Outpatient parenteral antibiotic therapy for bone and joint infections: an italian multicenter study. J. Chemother. **2007**; 19:417–22.

114. Osmon DR, Berbari EF. Outpatient intravenous antimicrobial therapy for the practicing orthopaedic surgeon. Clin. Orthop. **2002**; :80–6.

115. Tice AD, Rehm SJ, Dalovisio JR, et al. Practice guidelines for outpatient parenteral antimicrobial therapy. IDSA guidelines. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **2004**; 38:1651–72.

116. Lazzarini L, Lipsky BA, Mader JT. Antibiotic treatment of osteomyelitis: what have we learned from 30 years of clinical trials? Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. **2005**; 9:127–38.

117. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN **2008**; 3 Suppl 3:S131–139.

118. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. Int. J. Biochem. Cell Biol. **2003**; 35:1301–1305.

119. Huitema LFA, Vaandrager AB. What triggers cell-mediated mineralization? Front. Biosci. J. Virtual Libr. **2007**; 12:2631–2645.

120. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. Ann. N. Y. Acad. Sci. **2010**; 1192:437–443.

121. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. Arch. Biochem. Biophys. **2008**; 473:201–209.

122. Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. Bone **2009**; 44:1026–1033.

123. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. Semin. Cell Dev. Biol. **2008**; 19:444–451.

124. Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. Arch. Biochem. Biophys. **2008**; 473:132–138.

125. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch. Biochem. Biophys. **2008**; 473:139–146.

126. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev. **2004**; 15:49–60.

127. Evans CA, Jellis J, Hughes SP, Remick DG, Friedland JS. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-8 secretion and the acute-phase response in patients with bacterial and tuberculous osteomyelitis. J. Infect. Dis. **1998**; 177:1582–1587.

128. Klosterhalfen B, Peters KM, Tons C, Hauptmann S, Klein CL, Kirkpatrick CJ. Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis. J. Trauma **1996**; 40:372–378.

129. García-Alvarez F, Navarro-Zorraquino M, Castro A, et al. Effect of age on cytokine response in an experimental model of osteomyelitis. Biogerontology **2009**; 10:649–658.

130. Yoshii T, Magara S, Miyai D, et al. Local levels of interleukin-1beta, -4, -6 and tumor necrosis factor alpha in an experimental model of murine osteomyelitis due to staphylococcus aureus. Cytokine **2002**; 19:59–65.

131. Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I, Hudson MC. Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. J. Infect. Dis. **1999**; 180:1912–1920.

132. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J. Immunol. Baltim. Md 1950 **1990**; 145:3297–3303.

133. Meghji S, Crean SJ, Hill PA, et al. Surface-associated protein from Staphylococcus aureus stimulates osteoclastogenesis: possible role in S. aureus-induced bone pathology. Br. J. Rheumatol. **1998**; 37:1095–1101.

134. Meghji S, Crean SJ, Nair S, et al. Staphylococcus epidermidis produces a cell-associated proteinaceous fraction which causes bone resorption by a prostanoid-independent mechanism: relevance to the treatment of infected orthopaedic implants. Br. J. Rheumatol. **1997**; 36:957–963.

135. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. J. Periodontal Res. **1991**; 26:213–217.

136. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. **1989**; 4:113–118.

137. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. J. Biol. Chem. **2000**; 275:4858–4864.

138. Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc. **2009**; 17:735–742.

139. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. Endocrinology **1988**; 123:1442–1448.

140. Zou W, Hakim I, Tschoep K, Endres S, Bar-Shavit Z. Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. J. Cell. Biochem. **2001**; 83:70–83.

141. Tsezou A, Poultsides L, Kostopoulou F, et al. Influence of interleukin 1alpha (IL-1alpha), IL-4, and IL-6 polymorphisms on genetic susceptibility to chronic osteomyelitis. Clin. Vaccine Immunol. CVI **2008**; 15:1888–1890.

142. Trouillet-Assant S, Gallet M, Nauroy P, et al. Dual Impact of Live Staphylococcus aureus on the Osteoclast Lineage, Leading to Increased Bone Resorption. J. Infect. Dis. **2014**;

143. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J. Virulence determinants in Staphylococcus aureus and their involvement in clinical syndromes. Curr. Infect. Dis. Rep. **2005**; 7:420–8.

144. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N. Engl. J. Med. **1998**; 339:520–532.

145. Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, et al. Staphylococcus aureus collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. Bone **2002**; 30:275–80.

146. Xu Y, Rivas JM, Brown EL, Liang X, Hook M. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen. J. Infect. Dis. **2004**; 189:2323–33.

147. Buck AW, Fowler VG Jr, Yongsunthon R, et al. Bonds between fibronectin and fibronectin-binding proteins on Staphylococcus aureus and Lactococcus lactis. Langmuir ACS J. Surf. Colloids **2010**; 26:10764–70.

148. Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM, Foster T. Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. J. Infect. Dis. **2001**; 184:1572–80.

149. Williams RJ 3rd, Smith RL, Schurman DJ. Septic arthritis. Staphylococcal induction of chondrocyte proteolytic activity. Arthritis Rheum. **1990**; 33:533–41.

150. Bremell T, Tarkowski A. Preferential induction of septic arthritis and mortality by superantigen-producing staphylococci. Infect. Immun. **1995**; 63:4185–7.

151. Nilsson IM, Hartford O, Foster T, Tarkowski A. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote Staphylococcus aureus virulence in murine septic arthritis. Infect. Immun. **1999**; 67:1045–9.

152. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat. Rev. Microbiol. **2005**; 3:948–958.

153. Gemmell CG, Goutcher SC, Reid R, Sturrock RD. Role of certain virulence factors in a murine model of Staphylococcus aureus arthritis. J. Med. Microbiol. **1997**; 46:208–13.

154. Greenberg DP, Bayer AS, Cheung AL, Ward JI. Protective efficacy of protein A-specific antibody against bacteremic infection due to Staphylococcus aureus in an infant rat model. Infect. Immun. **1989**; 57:1113–8.

155. Littlewood-Evans AJ, Hattenberger MR, Luscher C, Pataki A, Zak O, O'Reilly T. Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. Infect. Immun. **1997**; 65:3438–43.

156. Schlievert PM. Role of superantigens in human disease. J. Infect. Dis. **1993**; 167:997–1002.

157. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet **2002**; 359:753–9.

158. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science **2007**; 315:1130–3.

159. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. Cell Host Microbe **2013**; 13:584–594.

160. Gillet Y, Dohin B, Dumitrescu O, et al. [Osteoarticular infections with staphylococcus aureus secreting Panton-Valentine leucocidin]. Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr. **2007**; 14 Suppl 2:S102–7.

161. Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO Jr, Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous Staphylococcus aureus osteomyelitis in children. Pediatrics **2006**; 117:433–40.

162. Garzoni C, Kelley WL. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence. Trends Microbiol. **2009**; 17:59–65.

163. Kintarak S, Whawell SA, Speight PM, Packer S, Nair SP. Internalization of Staphylococcus aureus by human keratinocytes. Infect. Immun. **2004**; 72:5668–5675.

164. Park WB, Kim SH, Kang C, et al. In vitro ability of Staphylococcus aureus isolates from bacteraemic patients with and without metastatic complications to invade vascular endothelial cells. J. Med. Microbiol. **2007**; 56:1290–1295.

165. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. Mechanisms of Staphylococcus aureus invasion of cultured osteoblasts. Microb. Pathog. **1999**; 26:317–323.

166. Jevon M, Guo C, Ma B, et al. Mechanisms of internalization of Staphylococcus aureus by cultured human osteoblasts. Infect. Immun. **1999**; 67:2677–2681.

167. Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Williams AS, Nousiainen MT. Internalization of Staphylococcus aureus by cultured osteoblasts. Microb. Pathog. **1995**; 19:409–19.

168. Reilly SS, Hudson MC, Kellam JF, Ramp WK. In vivo internalization of Staphylococcus aureus by embryonic chick osteoblasts. Bone **2000**; 26:63–70.

169. Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. J. Bone Joint Surg. Am. **2005**; 87:1343–7.

170. Ellington JK, Harris M, Webb L, et al. Intracellular Staphylococcus aureus. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. J. Bone Joint Surg. Br. **2003**; 85:918–21.

171. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. Intracellular Staphylococcus aureus and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc. **2006**; 24:87–93.

172. Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, et al. Staphylococcus aureus isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. Int. J. Med. Microbiol. IJMM **2014**;

173. Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP. Staphylococcus aureus fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. Infect. Immun. **2001**; 69:2872–2877.

174. Sinha B, François PP, Nüsse O, et al. Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. Cell. Microbiol. **1999**; 1:101–117.

175. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of Staphylococcus aureus by epithelial cells. Infect. Immun. **1999**; 67:4673–4678.

176. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. Cellular invasion by Staphylococcus aureus involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. Eur. J. Cell Biol. **2000**; 79:672–679.

177. Berger TM, Hirsch E, Djonov V, Schittny JC. Loss of beta1-integrin-deficient cells during the development of endoderm-derived epithelia. Anat. Embryol. (Berl.) **2003**; 207:283–288.

178. Hoffmann C, Ohlsen K, Hauck CR. Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. Eur. J. Cell Biol. **2011**; 90:891–896.

179. Agerer F, Lux S, Michel A, Rohde M, Ohlsen K, Hauck CR. Cellular invasion by Staphylococcus aureus reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. J. Cell Sci. **2005**; 118:2189–2200.

180. Wang B, Yurecko RS, Dedhar S, Cleary PP. Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells. Cell. Microbiol. **2006**; 8:257–266.

181. Boulter E, Van Obberghen-Schilling E. Integrin-linked kinase and its partners: a modular platform regulating cell-matrix adhesion dynamics and cytoskeletal organization. Eur. J. Cell Biol. **2006**; 85:255–263.

182. Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by Staphylococcus aureus. Curr. Opin. Microbiol. **2006**; 9:5–11.

183. Alexander EH, Rivera FA, Marriott I, Anguita J, Bost KL, Hudson MC. Staphylococcus aureus - induced tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts. BMC Microbiol. **2003**; 3:5.

184. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? Cancer Treat. Rev. **2009**; 35:280–288.

185. Henderson B, Nair SP. Hard labour: bacterial infection of the skeleton. Trends Microbiol. **2003**; 11:570–577.

186. Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, et al. Multiple virulence factors are required for Staphylococcus aureus-induced apoptosis in endothelial cells. Cell. Microbiol. **2005**; 7:1087–1097.

187. Haslinger B, Strangfeld K, Peters G, Schulze-Osthoff K, Sinha B. Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. Cell. Microbiol. **2003**; 5:729–741.

188. Genestier A-L, Michallet M-C, Prévost G, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J. Clin. Invest. **2005**; 115:3117–3127.

189. Olivier AC, Lemaire S, Van Bambeke F, Tulkens PM, Oldfield E. Role of rsbU and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of Staphylococcus aureus in human macrophages and endothelial cells. J. Infect. Dis. **2009**; 200:1367–1370.

190. Giese B, Dittmann S, Paprotka K, et al. Staphylococcal alpha-toxin is not sufficient to mediate escape from phagolysosomes in upper-airway epithelial cells. Infect. Immun. **2009**; 77:3611–3625.

191. Giese B, Glowinski F, Paprotka K, et al. Expression of δ-toxin by Staphylococcus aureus mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β-toxin. Cell. Microbiol. **2011**; 13:316–329.

192. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. Immunol. Rev. **2011**; 240:92–104.

193. Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Krönke M, Krut O. Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. J. Biol. Chem. **2007**; 282:2695–2706.

194. Almeida RA, Oliver SP. Interaction of coagulase-negative Staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells. Microb. Pathog. **2001**; 31:205–212.

195. Oviedo-Boyso J, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Valdez-Alarcón JJ, Baizabal-Aguirre VM. TNF-alpha reduces the level of Staphylococcus epidermidis internalization by bovine endothelial cells. FEMS Microbiol. Lett. **2009**; 292:92–99.

196. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Götz F, Peters G, Heilmann C. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. Cell. Microbiol. **2010**; 12:1746–1764.

197. Vallas V, Stapleton F, Willcox MD. Bacterial invasion of corneal epithelial cells. Aust. N. Z. J. Ophthalmol. **1999**; 27:228–230.

198. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. Invasion of bone cells by Staphylococcus epidermidis. Microbes Infect. Inst. Pasteur **2007**; 9:460–465.

199. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science **1999**; 284:1318–22.

200. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J. Clin. Microbiol. **2001**; 39:2151–2156.

201. Fowler VG Jr, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesin locus ica is present in clinical isolates of Staphylococcus aureus from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. Med. Microbiol. Immunol. (Berl.) **2001**; 189:127–131.

202. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of Staphylococcus aureus surface protein SasG in adherence and biofilm formation. Microbiol. Read. Engl. **2007**; 153:2435–2446.

203. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, et al. Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. **2009**; 191:832–843.

204. O'Neill E, Humphreys H, O'Gara JP. Carriage of both the fnbA and fnbB genes and growth at 37 degrees C promote FnBP-mediated biofilm development in meticillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. J. Med. Microbiol. **2009**; 58:399–402.

205. Rice KC, Mann EE, Endres JL, et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in Staphylococcus aureus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2007**; 104:8113–8118.

206. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials **2012**; 33:5967–82.

207. Olson ME, Ruseska I, Costerton JW. Colonization of n-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive by Staphylococcus epidermidis. J. Biomed. Mater. Res. **1988**; 22:485–95.

208. Agarwal A, Singh KP, Jain A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **2010**; 58:147–60.

209. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **2008**; 52:13–22.

210. Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect. Dis. **2013**; 13:47.

211. McNamara PJ, Proctor RA. Staphylococcus aureus small colony variants, electron transport and persistent infections. Int. J. Antimicrob. Agents **2000**; 14:117–122.

212. Besier S, Zander J, Kahl BC, Kraiczy P, Brade V, Wichelhaus TA. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **2008**; 52:2183–2189.

213. Tuchscherr L, Heitmann V, Hussain M, et al. Staphylococcus aureus small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. J. Infect. Dis. **2010**; 202:1031–40.

214. Onyango LA, Hugh Dunstan R, Roberts TK, Macdonald MM, Gottfries J. Phenotypic variants of staphylococci and their underlying population distributions following exposure to stress. PloS One **2013**; 8:e77614.

215. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of Staphylococcus aureus. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **1995**; 20:95–102.

216. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat. Rev. Microbiol. **2006**; 4:295–305.

217. Rolauffs B, Bernhardt TM, von Eiff C, Hart ML, Bettin D. Osteopetrosis, femoral fracture, and chronic osteomyelitis caused by Staphylococcus aureus small colony variants (SCV) treated by girdlestone resection--6-year follow-up. Arch. Orthop. Trauma Surg. **2002**; 122:547–550.

218. Piffaut C, Lustig S, Laurent F, Chidiac C, Ferry T, Lyon BJI Study Group. Small colony variant-producing S aureus prosthesis joint infection highlighted by sonication and treated with prolonged high doses of daptomycin. BMJ Case Rep. **2013**; 2013.

219. Löffler B, Tuchscherr L, Niemann S, Peters G. Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes. Int. J. Med. Microbiol. IJMM **2014**; 304:170–176.

220. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, et al. How clonal is Staphylococcus aureus? J. Bacteriol. **2003**; 185:3307–3316.

221. Lindsay JA, Moore CE, Day NP, et al. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of Staphylococcus aureus has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. J. Bacteriol. **2006**; 188:669–676.

222. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of Staphylococcus aureus. Infect. Immun. **2002**; 70:4987–4996.

223. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. Prevalence of cna, fnbA and fnbB adhesin genes among Staphylococcus aureus isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. FEMS Microbiol. Lett. **2005**; 246:81–86.

224. Peacock SJ, Day NP, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical isolates of Staphylococcus aureus exhibit diversity in fnb genes and adhesion to human fibronectin. J. Infect. **2000**; 41:23–31.

225. Aamot HV, Blomfeldt A, Skråmm I, Müller F, Monecke S. Molecular characterisation of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus from deep surgical site infections in orthopaedic patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. **2012**; 31:1999–2004.

226. Gu J, Li H, Li M, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of Staphylococcus epidermidis. J. Hosp. Infect. **2005**; 61:342–348.

227. Yao Y, Sturdevant DE, Villaruz A, Xu L, Gao Q, Otto M. Factors characterizing Staphylococcus epidermidis invasiveness determined by comparative genomics. Infect. Immun. **2005**; 73:1856–1860.

228. Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Rydèn C, El Solh N. Screening for Staphylococcus epidermidis markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. J. Infect. Dis. **2000**; 182:351–355.

229. Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? Microbiol. Read. Engl. **2005**; 151:2465–2475.

230. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. J. Clin. Microbiol. **2004**; 42:5614–5619.

231. Giormezis N, Kolonitsiou F, Foka A, et al. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic device-associated infections: the role of biofilm formation, adhesin and toxin genes distribution. J. Med. Microbiol. **2014**;

232. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR. Peptide signaling in the staphylococci. Chem. Rev. **2011**; 111:117–151.

233. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. **1988**; 170:4365–4372.

234. Fowler VG, Sakoulas G, McIntyre LM, et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. J. Infect. Dis. **2004**; 190:1140–1149.

235. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, et al. Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in Staphylococcus aureus among bacteremic patients. Antimicrob. Agents Chemother. **2011**; 55:1082–1087.

236. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, et al. Detection of Staphylococcus aureus delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. PloS One **2012**; 7:e40660.

237. Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus. J. Infect. Dis. **2000**; 182:1688–1693.

238. Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimarães MA, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AMS. agr RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of Staphylococcus aureus. Microbiol. Read. Engl. **2008**; 154:3480–3490.

239. Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, et al. Treatment of Staphylococcus aureus biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**; 51:2226–2229.

240. Bayer MG, Heinrichs JH, Cheung AL. The molecular architecture of the sar locus in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. **1996**; 178:4563–4570.

241. Chien Y, Manna AC, Cheung AL. SarA level is a determinant of agr activation in Staphylococcus aureus. Mol. Microbiol. **1998**; 30:991–1001.

242. Chien Y, Manna AC, Projan SJ, Cheung AL. SarA, a global regulator of virulence determinants in Staphylococcus aureus, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. J. Biol. Chem. **1999**; 274:37169–37176.

243. Giraudo AT, Calzolari A, Cataldi AA, Bogni C, Nagel R. The sae locus of Staphylococcus aureus encodes a two-component regulatory system. FEMS Microbiol. Lett. **1999**; 177:15–22.

244. Giraudo AT, Cheung AL, Nagel R. The sae locus of Staphylococcus aureus controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. Arch. Microbiol. **1997**; 168:53–58.

245. Laudano JB. Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. J. Antimicrob. Chemother. **2011**; 66 Suppl 3:iii11–18.

246. Moenster RP, Linneman TW, Call WB, Kay CL, McEvoy TA, Sanders JL. The potential role of newer gram-positive antibiotics in the setting of osteomyelitis of adults. J. Clin. Pharm. Ther. **2013**; 38:89–96.

247. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveilance in Europe - Surveillance report 2011. **2012**;

248. Chang FY, Peacock JE Jr, Musher DM, et al. Staphylococcus aureus bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective multicenter study. Medicine (Baltimore) **2003**; 82:333–9.

249. Kim SH, Kim KH, Kim HB, et al. Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia. Antimicrob. Agents Chemother. **2008**; 52:192–7.

250. Tice AD, Hoaglund PA, Shoultz DA. Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis. J. Antimicrob. Chemother. **2003**; 51:1261–8.

251. Senneville E, Nguyen S. Current pharmacotherapy options for osteomyelitis: convergences, divergences and lessons to be drawn. Expert Opin. Pharmacother. **2013**; 14:723–34.

252. Saginur R, Stdenis M, Ferris W, et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. Antimicrob. Agents Chemother. **2006**; 50:55–61.

253. Byren I, Bejon P, Atkins BL, et al. One hundred and twelve infected arthroplasties treated with 'DAIR' (debridement, antibiotics and implant retention): antibiotic duration and outcome. J. Antimicrob. Chemother. **2009**; 63:1264–71.

254. Senneville E, Poissy J, Legout L, et al. Safety of prolonged high-dose levofloxacin therapy for bone infections. J. Chemother. **2007**; 19:688–93.

255. Aboltins CA, Page MA, Buising KL, et al. Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2007**; 13:586–91.

256. Nguyen S, Pasquet A, Legout L, et al. Efficacy and tolerance of rifampicin-linezolid compared with rifampicin-cotrimoxazole combinations in prolonged oral therapy for bone and joint infections. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2009**; 15:1163–9.

257. Zeller V, Dzeing-Ella A, Kitzis MD, Ziza JM, Mamoudy P, Desplaces N. Continuous clindamycin infusion, an innovative approach to treating bone and joint infections. Antimicrob. Agents Chemother. **2010**; 54:88–92.

258. Ng J, Gosbell IB. Successful oral pristinamycin therapy for osteoarticular infections due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and other Staphylococcus spp. J. Antimicrob. Chemother. **2005**; 55:1008–12.

259. Ruparelia N, Atkins BL, Hemingway J, Berendt AR, Byren I. Pristinamycin as adjunctive therapy in the management of Gram-positive multi-drug resistant organism (MDRO) osteoarticular infection. J. Infect. **2008**; 57:191–197.

260. Corti N, Sennhauser FH, Stauffer UG, Nadal D. Fosfomycin for the initial treatment of acute haematogenous osteomyelitis. Arch. Dis. Child. **2003**; 88:512–6.

261. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet **2001**; 358:135–138.

262. Nichols WW, Evans MJ, Slack MP, Walmsley HL. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol. **1989**; 135:1291–1303.

263. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through Staphylococcus aureus biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. **2005**; 49:2467–2473.

264. Rani SA, Pitts B, Beyenal H, et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. J. Bacteriol. **2007**; 189:4223–4233.

265. Gilbert P, Brown MR. Biofilms and beta-lactam activity. J. Antimicrob. Chemother. **1998**; 41:571–572.

266. Fux CA, Wilson S, Stoodley P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of Staphyloccocus aureus biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. J. Bacteriol. **2004**; 186:4486–4491.

267. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **2008**; 322:107–131.

268. Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. J. Antimicrob. Chemother. **2014**; 69:i37–i40.

269. Zheng Z, Stewart PS. Penetration of rifampin through Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. **2002**; 46:900–903.

270. Dunne WM Jr, Mason EO Jr, Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a Staphylococcus epidermidis biofilm. Antimicrob. Agents Chemother. **1993**; 37:2522–2526.

271. Giulieri SG, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. Infection **2004**; 32:222–228.

272. Barberan J, Aguilar L, Carroquino G, et al. Conservative treatment of staphylococcal prosthetic joint infections in elderly patients. Am. J. Med. **2006**; 119:993 e7–10.

273. El Helou OC, Berbari EF, Lahr BD, et al. Efficacy and safety of rifampin containing regimen for staphylococcal prosthetic joint infections treated with debridement and retention. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. **2010**; 29:961–967.

274. Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, et al. Staphylococcus aureus prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. **1997**; 24:914–9.

275. Deirmengian C, Greenbaum J, Lotke PA, Booth RE Jr, Lonner JH. Limited success with open debridement and retention of components in the treatment of acute Staphylococcus aureus infections after total knee arthroplasty. J. Arthroplasty **2003**; 18:22–26.

276. Raad I, Hanna H, Jiang Y, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant Staphylococcus bacteremic isolates embedded in biofilm. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**; 51:1656–1660.

277. Mihailescu R, Furustrand Tafin U, Corvec S, et al. High Activity of Fosfomycin and Rifampin against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Biofilm In Vitro and in an Experimental Foreign-Body Infection Model. Antimicrob. Agents Chemother. **2014**; 58:2547–2553.

278. Tang H-J, Chen C-C, Cheng K-C, et al. In vitro efficacy of fosfomycin-containing regimens against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in biofilms. J. Antimicrob. Chemother. **2012**; 67:944–950.

279. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on Staphylococcus epidermidis biofilms. Curr. Microbiol. **2011**; 63:313–317.

280. Gattringer K-B, Suchomel M, Eder M, Lassnigg AM, Graninger W, Presterl E. Time-dependent effects of rifampicin on staphylococcal biofilms. Int. J. Artif. Organs **2010**; 33:621–626.

281. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Stefani S. Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of Staphylococcus aureus : comparison with other drugs. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **2010**; 59:466–469.

282. Szczuka E, Kaznowski A. Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against Staphylococcus epidermidis in biofilm. Folia Microbiol. (Praha) **2014**;

283. Tang H-J, Chen C-C, Cheng K-C, et al. In vitro efficacies and resistance profiles of rifampin-based combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. **2013**; 57:5717–5720.

284. Gomes F, Teixeira P, Ceri H, Oliveira R. Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro Staphylococcus epidermidis biofilms. Indian J. Med. Res. **2012**; 135:542–547.

285. Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. Int. J. Mol. Sci. **2013**; 14:18488–18501.

286. Panmanee W, Taylor D, Shea CJA, et al. High-throughput screening for small-molecule inhibitors of Staphylococcus epidermidis RP62a biofilms. J. Biomol. Screen. **2013**; 18:820–829.

287. Opperman TJ, Kwasny SM, Williams JD, et al. Aryl rhodanines specifically inhibit staphylococcal and enterococcal biofilm formation. Antimicrob. Agents Chemother. **2009**; 53:4357–4367.

288. Ma Y, Xu Y, Yestrepsky BD, et al. Novel inhibitors of Staphylococcus aureus virulence gene expression and biofilm formation. PloS One **2012**; 7:e47255.

289. Abraham NM, Lamlertthon S, Fowler VG, Jefferson KK. Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in Staphylococcus aureus depending on strain background: role for clumping factor B. J. Med. Microbiol. **2012**; 61:1062–1070.

290. Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. **2004**; 48:2633–2636.

291. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. Appl. Environ. Microbiol. **2008**; 74:470–476.

292. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. Appl. Microbiol. Biotechnol. **2007**; 75:125–132.

293. Raad I, Hanna H, Dvorak T, Chaiban G, Hachem R. Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**; 51:78–83.

294. Pérez-Giraldo C, Rodríguez-Benito A, Morán FJ, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by Staphylococcus epidermidis. J. Antimicrob. Chemother. **1997**; 39:643–646.

295. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**; 51:1556–1558.

296. Lungren MP, Christensen D, Kankotia R, Falk I, Paxton BE, Kim CY. Bacteriophage K for reduction of Staphylococcus aureusbiofilm on central venous catheter material. Bacteriophage **2013**; 3:e26825.

297. Seth AK, Geringer MR, Nguyen KT, et al. Bacteriophage therapy for Staphylococcus aureus biofilm-infected wounds: a new approach to chronic wound care. Plast. Reconstr. Surg. **2013**; 131:225–234.

298. Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. J. Bone Joint Surg. Am. **2013**; 95:117–125.

299. Rahman M, Kim S, Kim SM, Seol SY, Kim J. Characterization of induced Staphylococcus aureus bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. Biofouling **2011**; 27:1087–1093.

300. Carryn S, Chanteux H, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P, Van Bambeke F, Tulkens PM. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. Infect. Dis. Clin. North Am. **2003**; 17:615–634.

301. Tulkens PM. Intracellular distribution and activity of antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. **1991**; 10:100–106.

302. Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S, Tulkens PM. Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. **2006**; 9:218–230.

303. Lemaire S, Olivier A, Van Bambeke F, Tulkens PM, Appelbaum PC, Glupczynski Y. Restoration of susceptibility of intracellular methicillin-resistant Staphylococcus aureus to beta-lactams: comparison of strains, cells, and antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. **2008**; 52:2797–2805.

304. Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM. Role of acidic pH in the susceptibility of intraphagocytic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains to meropenem and cloxacillin. Antimicrob. Agents Chemother. **2007**; 51:1627–1632.

305. Lemaire S, Fuda C, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mobashery S. Restoration of susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to beta-lactam antibiotics by acidic pH: role of penicillin-binding protein PBP 2a. J. Biol. Chem. **2008**; 283:12769–12776.

306. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, Van Bambeke F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against Staphylococcus aureus in a model of THP-1 macrophages. Antimicrob. Agents Chemother. **2006**; 50:841–851.

307. Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM. Activity of beta-lactams (ampicillin, meropenem), gentamicin, azithromycin and moxifloxacin against intracellular Listeria monocytogenes in a 24 h THP-1 human macrophage model. J. Antimicrob. Chemother. **2003**; 51:1051–1052.

308. Lemaire S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM. Activity of three {beta}-lactams (ertapenem, meropenem and ampicillin) against intraphagocytic Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus. J. Antimicrob. Chemother. **2005**; 55:897–904.

309. Kreis CA, Raschke MJ, Roßlenbroich SB, Tholema-Hans N, Löffler B, Fuchs T. Therapy of intracellular Staphylococcus aureus by tigecyclin. BMC Infect. Dis. **2013**; 13:267.

310. Sandberg A, Hessler JHR, Skov RL, Blom J, Frimodt-Møller N. Intracellular activity of antibiotics against Staphylococcus aureus in a mouse peritonitis model. Antimicrob. Agents Chemother. **2009**; 53:1874–1883.

311. Murillo O, Pachón ME, Euba G, et al. Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection caused by Staphylococcus aureus. J. Antimicrob. Chemother. **2009**; 64:1062–1066.

312. Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, et al. Antibiotic activity against small-colony variants of Staphylococcus aureus: review of in vitro, animal and clinical data. J. Antimicrob. Chemother. **2013**; 68:1455–1464.

313. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, et al. Persistent infection with small colony variant strains of Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. **1998**; 177:1023–1029.

314. Baumert N, von Eiff C, Schaaff F, Peters G, Proctor RA, Sahl H-G. Physiology and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus small colony variants. Microb. Drug Resist. Larchmt. N **2002**; 8:253–260.

315. Lannergård J, Cao S, Norström T, Delgado A, Gustafson JE, Hughes D. Genetic complexity of fusidic acid-resistant small colony variants (SCV) in Staphylococcus aureus. PloS One **2011**; 6:e28366.

316. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis patients. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **2013**; 19:77–84.

317. Begic D, von Eiff C, Tsuji BT. Daptomycin pharmacodynamics against Staphylococcus aureus hemB mutants displaying the small colony variant phenotype. J. Antimicrob. Chemother. **2009**; 63:977–981.

318. Chuard C, Vaudaux PE, Proctor RA, Lew DP. Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of Staphylococcus aureus in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. J. Antimicrob. Chemother. **1997**; 39:603–608.

319. Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, et al. Pharmacodynamic evaluation of the activity of antibiotics against hemin- and menadione-dependent small-colony variants of Staphylococcus aureus in models of extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) infections. Antimicrob. Agents Chemother. **2012**; 56:3700–3711.

320. Nguyen HA, Denis O, Vergison A, et al. Intracellular activity of antibiotics in a model of human THP-1 macrophages infected by a Staphylococcus aureus small-colony variant strain isolated from a cystic fibrosis patient: pharmacodynamic evaluation and comparison with isogenic normal-phenotype and revertant strains. Antimicrob. Agents Chemother. **2009**; 53:1434–1442.

321. Idelevich EA, Kriegeskorte A, Stubbings W, Kahl BC, Peters G, Becker K. Comparative in vitro activity of finafloxacin against staphylococci displaying normal and small colony variant phenotypes. J. Antimicrob. Chemother. **2011**; 66:2809–2813.

322. Baltch AL, Ritz WJ, Bopp LH, Michelsen P, Smith RP. Activities of daptomycin and comparative antimicrobials, singly and in combination, against extracellular and intracellular Staphylococcus aureus and its stable small-colony variant in human monocyte-derived macrophages and in broth. Antimicrob. Agents Chemother. **2008**; 52:1829–1833.

323. Valour F, Karsenty J, Bouaziz A, et al. Antimicrobial-related severe adverse events during treatment of bone and joint infection due to methicillin-susceptible Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. **2014**; 58:746–755.

324. Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Ferry T, et al. PSMs of hypervirulent Staphylococcus aureus act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. PloS One **2013**; 8:e63176.

325. Pautke C, Schieker M, Tischer T, et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. Anticancer Res. **2004**; 24:3743–3748.

326. Trouillet S, Rasigade J-P, Lhoste Y, et al. A novel flow cytometry-based assay for the quantification of Staphylococcus aureus adhesion to and invasion of eukaryotic cells. J. Microbiol. Methods **2011**; 86:145–149.

327. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. **2007**; 115:891–899.

328. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J. Microbiol. Methods **2007**; 68:605–612.

329. Liesse Iyamba JM, Seil M, Devleeschouwer M, Takaisi Kikuni NB, Dehaye JP. Study of the formation of a biofilm by clinical strains of Staphylococcus aureus. Biofouling **2011**; 27:811–821.

330. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. N. Engl. J. Med. **2004**; 350:1422–1429.

331. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in Staphylococcus epidermidis biofilms: insights into the pathophysiology of S. epidermidis biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. J. Infect. Dis. **2005**; 191:289–298.

332. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. Future Microbiol. **2010**; 5:917–933.

333. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Mol. Microbiol. **1996**; 20:1083–1091.

334. Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. J. Clin. Epidemiol. **1994**; 47:1245–51.

335. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa Typing Method for Discriminating among Staphylococcus aureus Isolates: Implications for

Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. J. Clin. Microbiol. **2004**; 42:792–799.

336. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrügge C, et al. Characterization of clonal relatedness among the natural population of Staphylococcus aureus strains by using spa sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. J. Clin. Microbiol. **2008**; 46:2805–2808.

337. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of Staphylococcus aureus isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **2008**; 53:237–251.

338. Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Molecular fingerprinting of Staphylococcus aureus from bone and joint infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. **2010**; 29:457–463.

339. Price LB, Stegger M, Hasman H, et al. Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. mBio **2012**; 3.

340. Verkade E, Kluytmans J. Livestock-associated Staphylococcus aureus CC398: animal reservoirs and human infections. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. **2014**; 21:523–530.

341. Van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, et al. Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus sequence type 398 in pigs and humans. Emerg. Infect. Dis. **2008**; 14:479–483.

342. Chroboczek T, Boisset S, Rasigade J-P, et al. Clonal complex 398 methicillin susceptible Staphylococcus aureus: a frequent unspecialized human pathogen with specific phenotypic and genotypic characteristics. PloS One **2013**; 8:e68462.

343. Valentin-Domelier A-S, Girard M, Bertrand X, et al. Methicillin-susceptible ST398 Staphylococcus aureus responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? PloS One **2011**; 6:e28369.

344. Tristan A, Rasigade J-P, Ruizendaal E, et al. Rise of CC398 lineage of Staphylococcus aureus among Infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. PloS One **2012**; 7:e51172.

345. Stegger M, Lindsay JA, Moodley A, Skov R, Broens EM, Guardabassi L. Rapid PCR detection of Staphylococcus aureus clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying sau1-hsdS1. J. Clin. Microbiol. **2011**; 49:732–734.

346. Zürcher-Pfund L, Uçkay I, Legout L, Gamulin A, Vaudaux P, Peter R. Pathogen-driven decision for implant retention in the management of infected total knee prostheses. Int. Orthop. **2013**; 37:1471–1475.

347. Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, et al. A Large Multicenter Study of Methicillin–Susceptible and Methicillin–Resistant Staphylococcus aureus Prosthetic Joint Infections Managed With Implant Retention. Clin. Infect. Dis. **2013**; 56:182–194.

348. Anaya-López JL, Contreras-Guzmán OE, Cárabez-Trejo A, et al. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. Res. Vet. Sci. **2006**; 81:358–361.

349. Pils S, Schmitter T, Neske F, Hauck CR. Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry. J. Microbiol. Methods **2006**; 65:301–310.

350. Gatin L, Saleh-Mghir A, Tasse J, Ghout I, Laurent F, Crémieux A-C. Ceftaroline-Fosamil Efficacy against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Rabbit Prosthetic Joint Infection Model. Antimicrob. Agents Chemother. **2014**; 58:6496–6500.

ANNEXES

ANNEXE 1 – Valorisation scientifique du travail de thèse

1. Communications orales

1. ECCMID 2014 (Barcelone) : Antimicrobial activity against intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus*: a new therapeutic concept for bone and joint infection?
F. Valour, N. Riffard, S. Trouillet-Assant, J.P. Rasigade, C. Chidiac, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent

2. ICAAC 2013 (Denver) : High prevalence of CC398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in bone and joint infection
F. Valour, J. Tasse, S. Trouillet-Assant, J.P. Rasigade, M. Bès, B. Lamy, E. Chanard, P. Verhoeven, J.W. Decousser, F. Vandenesch, T. Ferry, on behalf of the Lyon BJI study group

3. ECCMID 2013 (Berlin) : Unexpectedly high prevalence of the emerging CC398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clonal complex in bone and joint infections
F. Valour, J. Tasse, S. Trouillet-Assant, J.P. Rasigade, M. Bès, E. Chanard, B. Lamy, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent

4. RICAI 2013 (Paris) : Action intra-ostéoblastique des anti-staphylococciques : un nouveau paramètre à prendre en compte dans le traitement des infections ostéo-articulaires ?
F. Valour, N. Riffard, S. Trouillet-Assant, J.P. Rasigade, C. Chidiac, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent, pour le Lyon BJI study group

5. RICAI 2013 (Paris) : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline de complexe clonal CC398 : émergence dans les infections ostéo-articulaires en lien avec une forte prévalence du portage nasal
F. Valour, J. Tasse, S. Trouillet-Assant, J.P. Rasigade, B. Lamy, E. Chanard, B. Mallet, P. Verhoven, J.W. Decousser, H. Marchandin, M. Bès, C. Chidiac, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent, pour le Lyon BJI study group

6. ISSSI 2012 (Lyon) : Bone cell invasion and intracellular virulence of *Staphylococcus aureus*: differential behavior of CA-and HA-MRSA clones

J.P. Rasigade, S. Trouillet, J. Ranfaing, F. Valour, T. Ferry, J. Etienne, F. Vandenesch, F. Laurent

7. SOFCOT 2012 (Paris) : Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline : première démonstration de la corrélation entre délai d'évolution et persistance intra-ostéoblastique
F. Valour, J.P. Rasigade, S. Trouillet, A. Bouaziz, H. Meugnier, S. Lustig, T. Ferry, F. Laurent

8. ICAAC 2011 (Chicago) : Physiopathology of *Staphylococcus epidermidis* orthopedic device infections: role of internalization in osteoblasts and biofilm formation
F. Valour, S. Trouillet, J.P. Rasigade, S. Lustig, E. Chanard, S. Tigaud, F. Vandenesch, J. Etienne, T. Ferry, F. Laurent

9. RICAI 2011 (Paris) : Mécanismes physiopathologiques des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus epidermidis* : interaction avec les ostéoblastes et formation de biofilm
F. Valour, S. Trouillet, J.P. Rasigade, T. Ferry, S. Lustig, E. Chanard, J. Etienne, F. Vandenesch, F. Laurent

2. Communications affichées

10. ICAAC 2012 (Chicago) : Intra-osteoblastic persistence of methicillin-susceptible *S. aureus*: an adaptative mechanism of bone and joint infections chronicity
F. Valour, J.P. Rasigade, S. Trouillet, J. Gagnaire, A. Bouaziz, M. Bes, H. Meugnier, S. Lustig, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent

11. ISSSI 2012 (Lyon) : Intra-osteoblastic persistence of methicillin-susceptible *S. aureus*: an adaptative mechanism of bone and joint infections chronicity
F. Valour, J.P. Rasigade, S. Trouillet, J. Gagnaire, A. Bouaziz, M. Bes, H. Meugnier, S. Lustig, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent

12. ECCMID 2012 (Londres) : Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bone and joint infections: chronic evolution is associated with bacterial ability to invade and persist within bone cells

F. Valour, J.P. Rasigade, S. Trouillet, A. Bouaziz, H. Meugnier, S. Lustig, F. Vandenesch, J. Etienne, T. Ferry, F. Laurent

13. SOFCOT 2011 (Paris) - Prix du meilleur poster : Infections ostéo-articulaires sur matériel à *S. epidermidis* : rôle de l'internalisation par les ostéoblastes
F. Valour, S. Trouillet, J.P. Rasigade, T. Ferry, S. Lustig, S. Tigaud, F. Vandenesch, J. Etienne, F. Laurent

ANNEXE 2 – Autres travaux issus de la cohorte de patients porteurs d'une IOA à SASM du CRIOAC de Lyon

La base de données cliniques nécessaire à l'interprétation des résultats microbiologiques fondamentaux présentés dans ce travail a donné lui à une analyse propre, portant sur deux problématiques cliniques de la prise en charge des patients porteurs d'IOA. Comme développé plus haut, ces patients bénéficient d'une double antibiothérapie prolongée, initialement intra-veineuse, et utilisant de fortes posologies. La tolérance de ce traitement médical lourd a peut été évalué. Nous avons donc souhaité reporter les effets secondaires survenant en cours d'antibiothérapie chez les patients porteurs d'une IOA à SASM. Par ailleurs, la plupart des études sur les IOA staphylococciques portant sur les IPA à SARM, nous nous sommes intéressés aux facteurs pronostics des IOA natives à SASM, restant la situation clinique la plus fréquemment rencontrée. Ces deux objectifs ont donné lieu aux deux articles scientifiques reproduits ci-après, et aux communications affichées suivantes :

14. ICAAC 2013 (Dever) : Antibiotic-related serious adverse events during treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bone and joint infections
F. Valour, J. Karsenty, A. Bouaziz, F. Ader, M. Tod, S. Lustig, F. Laurent, C. Chidiac, T. Ferry, on behalf of the Lyon BJI study group

15. ICAAC 2013 (Denver) : An early referral to infectious disease specialist improve the prognosis of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* native bone and joint infections
F. Valour, A. Bouaziz, F. Laurent, S. Lustig, C. Chidiac, T. Ferry, on behalf of the Lyon BJI study group

16. JNI 2013 (Clermont-Ferrand) : Effets secondaires liés à l'antibiothérapie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
F. Valour, J. Karsenty, M. Tod, F. Laurent, C. Chidiac, T. Ferry (Lyon BJI study Group)

17. JNI 2013 (Clermont-Ferrand) : Une consultation spécialisée précoce en infectiologie améliore le pronostic des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline sans matériel
F. Valour, A. Bouaziz, F. Laurent, S. Lustig, C. Chidiac, T. Ferry (Lyon BJI study group)

AAC
Journals.ASM.org

Antimicrobial-Related Severe Adverse Events during Treatment of Bone and Joint Infection Due to Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*

Florent Valour,[a,b] Judith Karsenty,[a] Anissa Bouaziz,[a] Florence Ader,[a,b] Michel Tod,[c] Sébastien Lustig,[d] Frédéric Laurent,[b,e,f] René Ecochard,[g] Christian Chidiac,[a,b] Tristan Ferry,[a,b] on behalf of the Lyon BJI Study Group

Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France[a]; Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1111, International Center for Research in Infectious Diseases, Lyon, France[b]; Pharmacie Hospitalière et Pharmacovigilance, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France[c]; Chirurgie Orthopédique, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France[d]; Laboratoire de Bactériologie, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France[e]; Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France[f]; Service de Biostatistiques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France[g]

Prolonged antimicrobial therapy is recommended for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) bone and joint infections (BJI), but its safety profile and risk factors for severe adverse events (SAE) in clinical practice are unknown. We addressed these issues in a retrospective cohort study (2001 to 2011) analyzing antimicrobial-related SAE (defined according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events) in 200 patients (male, 62%; median age, 60.8 years [interquartile range {IQR}, 45.5 to 74.2 years]) with MSSA BJI admitted to a reference regional center with acute (66%) or chronic arthritis (7.5%), osteomyelitis (9.5%), spondylodiscitis (16%), or orthopedic device-related infections (67%). These patients received antistaphylococcal therapy for a median of 26.6 weeks (IQR, 16.8 to 37.8 weeks). Thirty-eight SAE occurred in 30 patients (15%), with a median time delay of 34 days (IQR, 14.75 to 60.5 days), including 10 patients with hematologic reactions, 9 with cutaneomucosal reactions, 6 with acute renal injuries, 4 with hypokalemia, and 4 with cholestatic hepatitis. The most frequently implicated antimicrobials were antistaphylococcal penicillins (ASP) (13 SAE/145 patients), fluoroquinolones (12 SAE/187 patients), glycopeptides (9 SAE/101 patients), and rifampin (7 SAE/107 patients). Kaplan-Meier curves and stepwise binary logistic regression analyses were used to determine the risk factors for the occurrence of antimicrobial-related SAE. Age (odds ratio [OR], 1.479 for 10-year increase; 95% confidence interval [CI], 1.116 to 1.960; $P = 0.006$) appeared to be the only independent risk factor for SAE. In patients receiving ASP or rifampin, daily dose (OR, 1.028; 95% CI, 1.006 to 1.051; $P = 0.014$) and obesity (OR, 8.991; 95% CI, 1.453 to 55.627; $P = 0.018$) were associated with the occurrence of SAE. The high rate of SAE and their determinants highlighted the importance of the management and follow-up of BJI, with particular attention to be paid to older persons, especially for ASP dosage, and to rifampin dose adjustment in obese patients.

Bone and joint infections (BJI), including septic arthritis, osteomyelitis, and orthopedic device-related infections (ODI), constitute difficult-to-treat clinical entities, as they chronically evolve and frequently cause a relapse in infection (1–4). *Staphylococcus aureus* is the leading cause of BJI, accounting for approximately 50% of cases, and it is particularly associated with treatment failure due to its various virulence factors, including its great ability to form biofilms (5–7). These concerns have led to the recommendation of a prolonged antimicrobial course in *S. aureus* BJI, frequently in combination to avoid the acquisition of drug resistance, with initial administration via the intravenous route and at a high dosage (8–10). It is well known that the prolonged use of antimicrobial combinations is associated with an increased toxicity risk (11), but only limited and conflicting data are found in the literature concerning the prevalence and predictive factors of antimicrobial-related adverse events (AE) occurring during the treatment of BJI. A recent meta-analysis concluded that the incidences of AE are 16.1% for mild AE and 7.7% for moderate and severe AE (12), but some studies found the incidence of AE can reach rates as high as 50% of the patients (13, 14). We aimed to describe the occurrence of and risk factors for antimicrobial-related AE in a retrospective cohort study that included patients admitted to a regional reference center with methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) BJI.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statements. This study received the approval of the French South-East ethics committee with the reference number CAL2011-021. In accordance with French legislation, written informed patient consent was not required for any part of the study.

Inclusion criteria and data collection. All patients with MSSA BJI who followed up in our institution between 2001 and 2011 were enrolled in a retrospective cohort study. Patients with diabetic foot- and decubitus ulcer-related BJI were excluded because of the particular pathophysiology proceeded by contiguity with bone exposition and implicating diabetes-associated vascular disease and peripheral neuropathy, leading to a specific management of these infections. For each patient, data were collected from medical records, nursing charts, and biological software in an anonymous standardized case report form.

Definitions. BJI diagnosis was based upon the existence of clinical and biological evidences of infection and at least one reliable bacteriological

Received 17 September 2013 Returned for modification 19 October 2013
Accepted 10 November 2013
Published ahead of print 18 November 2013
Address correspondence to Tristan Ferry, tristan.ferry@univ-lyon1.fr.
Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AAC.02032-13

sample that was positive for MSSA (i.e., percutaneous joint fluid aspiration, surgical sample, and/or blood culture). BJI were classified according to (i) the existence of an orthopedic implant (i.e., osteosynthetic material, joint prosthesis, or external fixator) and (ii) the time from the initiation of infection symptoms to diagnosis, with infections defined as acute (infection lasting for ≤4 weeks) or chronic.

The Charlson comorbidity index was calculated as previously described (15). Immunosuppression was defined as (i) steroid therapy of >10 mg of prednisone per day or the equivalent for ≥3 months, (ii) immunosuppressive drug therapy during the two months before BJI onset, or (iii) current chemotherapy or radiotherapy treatment.

Every adverse event (AE) occurring during follow-up was classified according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) (National Cancer Institute, 2003). Severe adverse events (SAE) corresponded to CTCAE grades 3 to 5. The role of the antimicrobial agents in AE occurrence was left to the judgment of the clinician, with the help of a pharmacovigilance specialist in doubtful cases. The risk factors analyzed for SAE included age, a Charlson comorbidity index of ≥2, obesity (body mass index [BMI] > 30 kg/m^2), denutrition (BMI < 18 kg/m^2), BJI type, mechanism, and presentation (i.e., acute or chronic, fever, fistula, abscess, biological inflammatory syndrome), time delay from diagnosis to infectious disease specialist referral, and the antibiotic administration characteristics (route, duration, and doses).

Statistical analysis. Descriptive statistics were used to estimate the frequencies of the study variables, described as effectives (%) for dichotomous values and medians (interquartile range [IQR]) for continuous values. For the percentage calculation of each variable, the number of missing values was excluded from the denominator. Nonparametric statistical methods were used to compare the study groups (chi-square test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney U test, as appropriate). Kaplan-Meier curves were compared between the groups using the log-rank test. Stepwise binary logistic regression analysis was used to determine the risk factors for the first antimicrobial-related SAE. After checking the variables for interactions, variables with medical meaning and with *P* values obtained in the univariate analysis of <0.15 were included in the final multivariate model, adopting a ratio of 10 events per independent variable to avoid overfitting. A *P* value of <0.05 was considered significant. All analyses were performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Two hundred eleven patients with MSSA BJI were identified. After excluding diabetic foot-related ($n = 3$) and decubitus ulcer-related ($n = 1$) BJI and medical records with insufficient data ($n = 7$), 200 patients were included in the analysis.

Demographic characteristics, underlying conditions, and BJI presentation. There were 124 male (62%) patients. The median age was 60.8 years (IQR, 45.5 to 74.2 years), with 103 patients (51.5%) >60 years of age. The mean Charlson comorbidity index was ≥2 in 61 patients (30.5%). The patient comorbidities are detailed in Table 1.

There were 15 native joint infections (7.5%), 19 osteomyelitis cases (9.5%), 32 spondylodiscitis cases (16%), and 134 orthopedic device infections (67%). The orthopedic device infections included 76 prosthetic-joint infections (PJI) (consisting of 41 in the hip, 32 in the knee, 2 in the shoulder, and 1 in an ankle implant). The median time delay from symptoms to diagnosis was 1.3 weeks (IQR, 0.3 to 7.2 weeks), defining 66 (33%) cases as chronic BJI. Laboratory testing disclosed an inflammatory syndrome in 188 patients (94%), with a median maximal plasmatic C-reactive protein (CRP) level of 162.0 mg/liter (IQR, 80.0 to 298.9 mg/liter) and a white blood cell count of 10,810 cells/mm^3 (IQR, 8,200 to 14,300 cells/mm^3). Blood cultures were positive for MSSA in 70 of the 111 (63.1%) patients in whom they were realized, including primitive bacteremia with bone and joint metastatic septic focus and bacteremia resulting from BJI itself. Infection was considered by a clinician to be hematogenous in 74 cases (37%).

Treatments and outcomes. All but 12 patients were hospitalized, with an initial mean stay of 3.4 weeks (IQR, 1.6 to 7.0 weeks). Surgical treatment was performed in 164 cases (82%), consisting of an orthopedic implant removal in 84 patients (65.6%), with no residual material in 70 cases (52.2%). The advice of an infectious disease specialist was sought in all cases, with a median time delay from microbiological diagnosis of 1.0 week (IQR, 0.0 to 3.0 weeks). The mean total duration of antibiotic therapy was 26.6 weeks (IQR, 16.8 to 37.8 weeks). All patients received initial combination therapy for a median duration of 24.6 weeks (IQR, 14.1 to 31.1 weeks). Intravenous administration of antibiotics was used in 182 patients (91%) for a median duration of 7.4 weeks (IQR, 4.9 to 14.4 weeks). The clinical outcome was favorable in 117 cases (59.7%), with a median follow-up time of 85.0 weeks (IQR, 49.0 to 154.4 weeks). Treatment failure rate was higher for those with an ODI ($P < 0.001$) (Table 1).

Description of antimicrobial-related adverse events and analysis of risk factors. Ninety patients (45%) presented with at least one antimicrobial-related AE. Because of a declaration of bias toward mild side effects (CTCAE grade 1 to 2) due to the retrospective nature of the study, only the 38 SAE recorded in 30 patients (15%) were analyzed. They corresponded to 10 hematologic disorders (8 neutrophil count decreases, including 3 febrile neutropenia cases, 1 pancytopenia case, and 1 anemia case), 9 allergic reactions (5 generalized maculopapular rashes, 3 Stevens-Johnson syndrome cases, and 1 anaphylactic shock case), 6 acute renal injuries, 4 hypokalemia cases, 4 hepatic disorders (3 cholestatic hepatitis cases and 1 acute hepatic failure case), 3 upper digestive tract disorders (2 severe vomiting cases and 1 duodenal ulcer case), and 3 nervous system disorders (1 cognitive disturbance case and 1 ototoxicity case) (Table 2). They included 27 grade 3 SAE, 10 grade 4 SAE, and 1 grade 5 SAE. The most frequently involved antimicrobials were antistaphylococcal penicillins ($n = 13$), fluoroquinolones ($n = 12$), glycopeptides ($n = 9$), and rifampin ($n = 7$) (Table 3). In 14 cases (46.7%), these SAE were not attributed to a particular antibiotic. They occurred a median of 34.0 days (IQR, 14.75 to 60.5 days) after the initiation of the involved antimicrobial(s), during initial hospitalization stay ($n = 23$), in a rehabilitation center ($n = 11$), or after patients were discharged home ($n = 4$). Eighteen patients (60%) were admitted to the hospital or had a prolonged initial hospital stay due to the occurrence of SAE, with a median duration stay of 8.0 days (IQR, 4.0 to 29.0 days), that led to an increase in initial hospitalization stay ($P = 0.003$). Thirty SAE (78.9%) led to a disruption in treatment. In cases of acute renal failure or hypokalemia, a dose adjustment, hydration regimen, and/or potassium supplementation were started. The SAE resolved in all but two cases: one patient with acute renal failure due to a regimen of an antistaphylococcal penicillin with an aminoglycoside progressed to chronic renal failure, and one patient (80-year-old male with a Charlson comorbidity index of 6 and preexisting chronic renal failure) died from acute renal failure that occurred while receiving a combination therapy of ofloxacin and pristinamycin.

In univariate analysis, age (OR, 1.451 for a 10-year increase in age; 95% confidence interval [CI], 1.134 to 1.857; $P = 0.003$)

TABLE 1 Demographic characteristics, underlying conditions, and BJI presentation of the 200 included patients[a]

Patient data[b]	Total ($n = 200$)	Patient group	
		Chronic BJI ($n = 66$)	ODI[c] ($n = 134$)
Sex (male)	124 (62)	46 (69.7)	82 (61.2)
Age (median [IQR]) (yr)	60.8 (45.5–74.2)	55.8 (42.0–72.2)	60.8 (44.5–75.3)
Comorbidity			
Charlson score (IQR)	0.0 (0.0–2.0)	0.0 (0.0–2.0)	0.0 (0.0–2.0)
Obesity (BMI > 30)	39 (20)	6 (9.4)[d]	26 (20.0)
Denutrition (BMI < 18)	9 (4.6)	6 (9.4)	6 (4.6)
Diabetes	27 (13.5)	8 (12.1)	16 (11.9)
Immunodepression	23 (11.5)	4 (6.1)	15 (11.2)
Nephropathy	28 (14)	9 (13.6)	18 (13.4)
Hepatopathy	5 (2.5)	0 (0)	3 (2.2)
Chronic pulmonary disease	30 (15)	5 (7.6)[d]	18 (13.4)
Chronic heart failure	23 (11.5)	4 (6.1)	18 (13.4)
Chronic inflammatory disease	24 (12)	6 (9.1)	17 (12.7)
Neoplasm/hemopathy	21 (10.5)	5 (7.6)	14 (10.4)
Dementia	7 (3.5)	1 (1.5)	6 (4.5)
BJI type			
Arthritis	15 (7.5)	2 (3.0)	NA[e]
Osteomyelitis	19 (9.5)	16 (24.2)[d]	NA
Vertebral osteomyelitis	32 (16)	10 (15.2)	NA
Orthopedic device infection	134 (67)	38 (57.6)	NA
Joint prosthesis	76 (56.7)	17 (44.7)[d]	76 (56.7)
Osteosynthesis	48 (35.8)	20 (52.6)	48 (35.8)
Vertebral osteosynthesis	10 (7.5)	1 (2.6)	10 (7.5)
BJI mechanism			
Hematogenous (for clinician)	74 (37)	15 (22.7)[d]	34 (25.4)[f]
Inoculation	121 (60.5)	48 (72.7)[d]	99 (73.9)[f]
Contiguity	5 (2.5)	3 (4.5)	1 (0.7)
BJI diagnosis			
Fever	125 (62.5)	20 (30.3)[d]	82 (61.2)
Fistula	86 (43.4)	42 (63.6)[d]	68 (50.7)[f]
Abscess	78 (39)	25 (37.9)	45 (33.6)[f]
Chronic BJI (>4 wk)	66 (33)	NA	38 (28.4)[f]
Polymicrobial BJI	31 (15.5)	15 (22.7)	21 (15.7)
Biological inflammatory syndrome	188 (94)	59 (89.4)	130 (97.0)[f]
No. with positive blood culture/no. of total cultures (% positive)	70/111 (63.1)	8/23 (34.8)[d]	35/65 (53.8)[f]
Initial hospitalization (median [IQR]) (wk)	3.4 (1.6–7.0)	2.0 (1.0–3.9)[d]	2.9 (1.5–6.0)
Surgical treatment	164 (82)	54 (81.8)	127 (94.8)[f]
Antibiotic use			
Delay from diagnosis to specialist referral (median [IQR]) (wk)	1.0 (0.0–3.0)	0.0 (−0.3–3.0)[d]	1.1 (0.0–2.8)
Total treatment duration (median [IQR]) (wk)	26.6 (16.8–37.8)	24.7 (17.7–40.5)	26.0 (15.6–37.6)
Intravenous treatment	182 (91)	57 (86.4)	123 (91.8)
Intravenous treatment duration (median [IQR]) (wk)	7.4 (4.9–14.4)	7.1 (4.6–14.7)	7.4 (4.7–14.7)
Antimicrobial combination therapy	200 (100)	66 (100)	134 (100)
Combination therapy duration (median [IQR]) (wk)	24.6 (14.1–31.1)	22.2 (14.2–31.0)	23.0 (13.7–31.0)
Favorable clinical outcome	117 (59.7)	41 (62.1)	68 (51.9)[f]

[a] The results are presented as no. (%) unless otherwise noted. For the percentage calculation of each variable, the number of missing values was excluded from the denominator. Nonparametric statistical methods were used to compare groups (chi-square test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney U test, as appropriate).
[b] IQR, interquartile range; BMI, body mass index; BJI, bone and joint infection.
[c] ODI, orthopedic device infection.
[d] Significant difference compared to acute bone and joint infections ($P < 0.05$).
[e] NA, not applicable.
[f] Significant difference compared to native bone and joint infections ($P < 0.05$).

TABLE 2 Description of the 38 SAE[a] occurring in 30 patients during antimicrobial course

Type of SAE (*n*)	Subtype of SAE (*n*)	CTCAE[b] grade	Antimicrobial(s) involved (*n*)	Time from treatment initiation to SAE (median [IQR]) (days)
Hematologic disorders (10)	Neutrophil count decrease (5), febrile neutropenia (3), anemia (1), pancytopenia (1)	Grade 3 (5), grade 4 (5)	β-Lactams (7), fluoroquinolones (1), glycopeptides (1), fosfomycin (1), linezolid (1)	26.0 (13.25–35.0)
Allergic reactions (9)	Maculopapular rash (5), Stevens-Johnson syndrome (3), anaphylactic shock (1)	Grade 3 (5), grade 4 (4)	Glycopeptides (5), fluoroquinolones (6), rifampin (4), β-lactams (3), macrolide group (1)	20.0 (11.0–22.0)
Renal disorders (6)	Acute kidney injury (6)	Grade 3 (4), grade 4 (1), grade 5 (1)	β-Lactams (4), aminoglycosides (4), fluoroquinolones (4), glycopeptides (3), macrolide group (1)	2.0 (1.25–7.25)
Metabolic disorders (4)	Hypokalemia (4)	Grade 3 (4)	Fosfomycin (4)	21.0 (15.75–21.0)
Hepatobiliary disorders (4)	Blood bilirubin increase (2), blood GGT[c] increase (1), hepatic failure (1)	Grade 3 (4)	β-Lactams (3), rifampin (1), fluoroquinolones (1), fusidic acid (1), cotrimoxazole (1)	43.5 (18.0–65.75
Gastrointestinal disorders (3)	Vomiting (2), duodenal ulcer (1)	Grade 3 (3)	Rifampin (2), macrolide group (1)	7.0 (4.0–86.0)
Nervous system disorders (2)	Cognitive disturbance (1), ototoxicity (1)	Grade 3 (2)	β-Lactams (1), fosfomycin (1)	7.0 (4.5–9.5)

[a] SAE, severe adverse event.
[b] CTCAE, Common Terminology Criteria for Adverse Events.
[c] GGT, gamma glutamyl transpeptidases.

and a hematogenous BJI mechanism (OR, 2.207; 95% CI, 1.007 to 4.835; $P = 0.048$) were significantly associated with the occurrence of antimicrobial-related SAE (Table 4). Clinically relevant and noninteracting factors with a P value of <0.15 in the univariate model were included in the multivariate analysis, which pinpointed age (OR, 1.383 for 10-year increase; 95% CI, 1.075 to 1.775; $P = 0.011$) as the only independent risk factor for antistaphylococcal therapy-related toxicity (Table 4 and Fig. 1).

Antistaphylococcal penicillin-related severe adverse events. One hundred forty-five patients (72.5%) received intravenous antistaphylococcal penicillin at a median daily dose of 146.3 mg/kg of body weight (IQR, 131.6 to 171.4 mg/kg) for 44.0 days (IQR, 22.0 to 64.0 days). Sixty-six patients (45.5%) received a daily dose of >150 mg/kg, including 6 patients who were considered to be overdosed (received >200 mg/kg/day). The 13 SAE detailed in Table 3 occurred in a median time from initiation of antistaphylococcal penicillin treatment of 23.0 days (IQR, 5.0 to 52.0 days). Of note, another antimicrobial known to be nephrotoxic (i.e., an aminoglycoside and/or a glycopeptide) was associated with antistaphylococcal penicillin in the 4 observed cases of acute renal failure.

In the univariate analysis, the noninteracting factors associated with SAE occurrence were age (OR, 1.652 for a 10-year increase in age; 95% CI, 1.116 to 2.446; $P = 0.012$), a hematogenous BJI mechanism (OR, 8.198; 95% CI, 1.746 to 38.483; $P = 0.008$), and daily dose (OR, 1.016; 95% CI, 0.998 to 1.034; $P = 0.087$) (Fig. 2). All these factors were found to be independently associated with the occurrence of antistaphylococcal penicillin-related SAE in multivariate analysis, with ORs of 1.817 (95% CI, 1.170 to 2.820; $P = 0.008$), 5.927 (95% CI, 1.039 to 33.811; $P = 0.045$), and 1.028 (95% CI, 1.006 to 1.051; $P = 0.014$) for age, hematogenous BJI mechanism, and daily dose, respectively. Fistula, which was detected as a protective factor in univariate analysis (OR, 0.132; 95% CI, 0.017 to 1.049; $P = 0.056$), was not significantly associated with a risk of SAE in the final model.

Glycopeptide-related severe adverse events. Glycopeptides were used in 102 patients (51%) for a median of 23.0 days (IQR, 6.3 to 48.0 days), mostly as empirical therapy before a definitive bacteriological diagnosis was made ($n = 33$ [32.4%]), with the total duration of treatment being ≤15 days in all these cases. Other reasons to use glycopeptides were a previous allergic reaction to other antistaphylococcal antibiotics ($n = 28$ [27.5%]), a polymicrobial infection ($n = 23$ [22.5%]), and difficult venous access ($n = 13$ [12.7%]). The antibiotics teicoplanin ($n = 63$ [61.8%]) and vancomycin ($n = 39$, 38.2%) were administered at a median dose of 5.6 mg/kg/day (IQR, 4.7 to 6.7 mg/kg/day) and 25.6 mg/kg/day (IQR, 23.2 to 32.0 mg/kg/day), respectively. Nine SAE (8.8%) occurred in these patients (Table 3), with a median time delay of 20.0 days (IQR, 2.0 to 20.0 days). Of note, 5 presumed allergic reactions were reported in patients who presented with a diffuse cutaneous rash, which might correspond to a vancomycin-induced nonspecific histamine release ("red

TABLE 3 Description of the SAE observed for the main antimicrobials used[a]

Antimicrobial(s) (*n*)	Type of SAE[a] (*n*)	CTCAE[b] grade (*n*)	Time from treatment initiation to SAE (median [IQR]) (days)
β-Lactams (17): ASP[c] (13), others (4)	Hematologic disorders (7), acute kidney injuries (4), allergic reactions (3), hepatobiliary disorders (2), cognitive disturbance (1)	Grade 3 (13), grade 4 (4)	28.0 (7.0–63.0)
Fluoroquinolones (10)	Allergic reactions (6), acute kidney injuries (2), hematologic disorders (1), hepatobiliary disorders (1)	Grade 3 (3), grade 4 (6), grade 5 (1)	20.0 (12.5–49.25)
Glycopeptides (9)	Allergic reactions (5), acute kidney injuries (3), hematologic disorders (1)	Grade 3 (5), grade 4 (3)	20.0 (2.0–20.0)
Rifampin (7)	Allergic reactions (4), vomiting (2), blood bilirubin increase (1)	Grade 4 (3), grade 3 (4)	20.0 (20.0–24.5)

[a] SAE, severe adverse event.
[b] CTCAE, Common Terminology Criteria for Adverse Events.
[c] ASP, antistaphylococcal penicillin.

TABLE 4 Risk factor analysis for antimicrobial-related severe adverse events[a]

Patient data	SAE[b] ($n = 30$)	No SAE ($n = 170$)	P	Univariate analysis		Multivariate analysis	
				OR (95% CI)[c]	P	OR (95% CI)	P
Sex (male)	15 (50)	109 (64.1)	0.142	0.560 (0.256–1.222)	0.145	0.678 (0.300–1.533)	0.350
Age (median [IQR]) (yr)	67.4 (62.1–80.1)	57.4 (43.6–72.5)	0.001	1.451 (1.134–1.857)[d]	0.003	1.382 (1.075–1.775)[d]	0.011
Age > 60 yr	24 (80)	79 (46.5)	<0.001				
Comorbidity							
Charlson score ≥2	10 (33.3)	51 (30.0)	0.714	1.167 (0.510–2.667)	0.715		
Obesity (BMI > 30)	8 (26.7)	31 (18.8)	0.283	1.572 (0.640–3.860)	0.324		
Denutrition (BMI < 18)	1 (3.3)	8 (4.7)	0.885	0.677 (0.082–5.617)	0.718		
Diabetes	3 (10)	24 (14.1)	0.749	0.676 (0.190–2.403)	0.545		
Immunodepression	4 (13.3)	19 (11.2)	0.975	1.223 (0.385–3.884)	0.733		
Nephropathy	5 (16.7)	23 (13.5)	0.865	1.278 (0.445–3.675)	0.649		
Hepatopathy	2 (6.7)	3 (1.8)	0.341	3.976 (0.636–24.872)	0.140	2.791 (0.429–18.147)	0.283
Chronic pulmonary disease	8 (26.7)	22 (12.9)	0.052	2.446 (0.970–6.168)	0.058		
Chronic heart failure	4 (13.3)	19 (11.2)	0.975	1.223 (0.385–3.884)	0.733		
Chronic inflammatory disease	4 (13.3)	20 (11.8)	0.950	1.154 (0.365–3.649)	0.808		
Neoplasm/hemopathy	3 (10)	18 (10.6)	0.821	0.938 (0.259–3.405)	0.923		
Dementia	0 (0)	7 (4.1)	0.522	NC[d]	NC[d]		
BJI type							
Arthritis	3 (10)	12 (70.6)	0.852	1.463 (0.387–5.528)	0.575		
Osteomyelitis	3 (10)	16 (9.4)	0.813	1.069 (0.292–3.921)	0.919		
Vertebral osteomyelitis	6 (20)	26 (15.3)	0.705	1.385 (0.516–3.716)	0.518		
Orthopedic device infection	18 (60)	116 (68.2)	0.377	0.698 (0.314–1.552)	0.378		
Prosthetic-joint infection	15 (50)	61 (35.9)	0.142				
Osteosynthesis	1 (3.3)	43 (25.3)	0.015				
Vertebral osteosynthesis	2 (6.7)	8 (4.7)	1.000				
External fixator	0 (0)	3 (1.8)	0.933				
Other	0 (0)	1 (0.6)	0.356				
Bone and joint infection mechanism							
Hematogenous (for clinician)	16 (53.3)	58 (34.1)	0.044	2.207 (1.007–4.835)	0.048	1.372 (0.554–3.400)	0.494
Inoculation	13 (43.3)	108 (63.5)	0.037	0.439 (0.200–0.964)	0.040		
Contiguity	1 (3.3)	4 (2.4)	0.751	1.431 (0.154–13.262)	0.752		
BJI diagnosis							
Fever	23 (76.7)	102 (60)	0.082	2.190 (0.891–5.388)	0.088		
Fistula	8 (26.7)	78 (46.4)	0.050	0.429 (0.181–1.017)	0.055	0.366 (0.233–1.710)	0.0.366
Abscess	11 (36.7)	67 (39.4)	0.776	0.890 (0.398–1.988)	0.776		
Chronic BJI (>4 wk)	8 (26.7)	58 (34.1)	0.424	0.702 (0.294–1.675)	0.425		
Polymicrobial BJI	6 (20)	25 (14.7)	0.642	1.450 (0.539–3.903)	0.462		
Biological inflammatory syndrome	29 (96.7)	159 (93.5)	0.802	2.006 (0.249–16.140)	0.513		
No. with positive blood culture/no. of total cultures (% positive)	14/21 (66.7)	56/90 (62.2)	0.704	1.214 (0.446–3.309)	0.704		
Initial hospitalization (median [IQR]) (wk)	7.1 (3.4–9.3)	3.0 (1.6–5.9)	0.003				
Surgical treatment	24 (80.0)	139 (81.8)	0.818	0.892 (0.336–2.367)	0.819		
Antibiotic use							
Delay from diagnosis to specialist referral (median [IQR]) (wk)	0.6 (0.0–1.6)	1.0 (0.0–3.3)	0.226	1.002 (0.998–1.006)	0.282		
Intravenous treatment	29 (96.7)	153 (90)	0.406	3.222 (0.413–25.167)	0.265		
Antimicrobial combination therapy	30 (100)	170 (100)	NC[e]	NC	NC		
Favorable clinical outcome	18 (60)	99 (59.6)	0.856				

[a] Results are presented as no. (%) unless otherwise noted. For the percentage calculation of each variable, the number of missing values was excluded from the denominator. Risk factors were assessed using a logistic binary regression model. Noninteracting variables with a P value of <0.15 in univariate analysis were included in the final model.
[b] SAE, severe adverse events.
[c] Odds ratio (95% confidence interval).
[d] Odds ratio expressed for a 10-year increase in age.
[e] NC, not calculable.

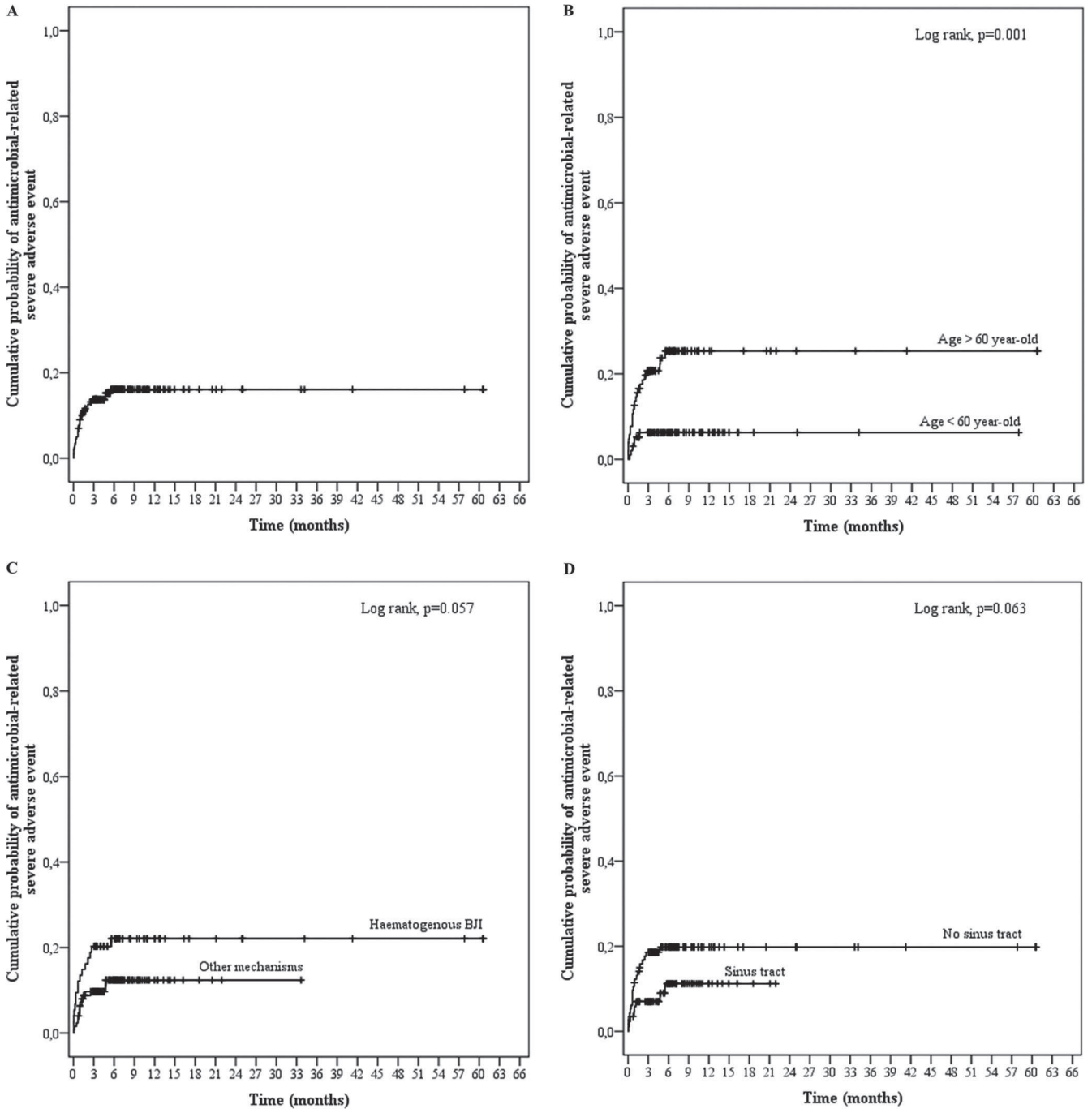


FIG 1 Kaplan-Meier curves for the cumulative risk of antimicrobial-related severe adverse events (SAE) for all patients (A) and according to age (B), BJI mechanism (C), and the presence of a sinus tract (D).

man syndrome"). In a univariate logistic regression model, only age tended to be associated with glycopeptide-related SAE (OR, 1.388; 95% CI, 0.901 to 2.139; $P = 0.137$). Baseline renal function, estimated by the glomerular filtration rate (Cockcroft-Gault formula) was not associated with glycopeptide-related SAE (OR, 1.008; 95% CI, 0.996 to 1.021; $P = 0.205$).

Fluoroquinolone-related severe adverse events. One hundred eighty-seven patients (93.5%) received fluoroquinolones for a median duration of 112.5 days (IQR, 65.8 to 184.5 days). The main antibiotic used was ofloxacin ($n = 167$ [89.3%]), mainly at a dose of 200 mg twice a day ($n = 96$ [57.5%]) or 200 mg three times a day ($n = 58$ [34.7%]), resulting in a median daily dose of 400.0 mg (IQR, 400 to 600 mg). Ten SAE occurred in these patients, with a median time delay of 20.0 days (IQR, 12.5 to 49.25 days) (Table 3 and Fig. 3). In the univariate analysis, the factors associated with fluoroquinolone-related SAE were age (OR, 1.445; 95% CI, 0.960 to 2.174; $P = 0.078$), a Charlson score of ≥2 (OR, 2.804; 95% CI, 0.750 to 10.489), and hepatopathy (OR, 14.500; 95% CI, 2.116 to

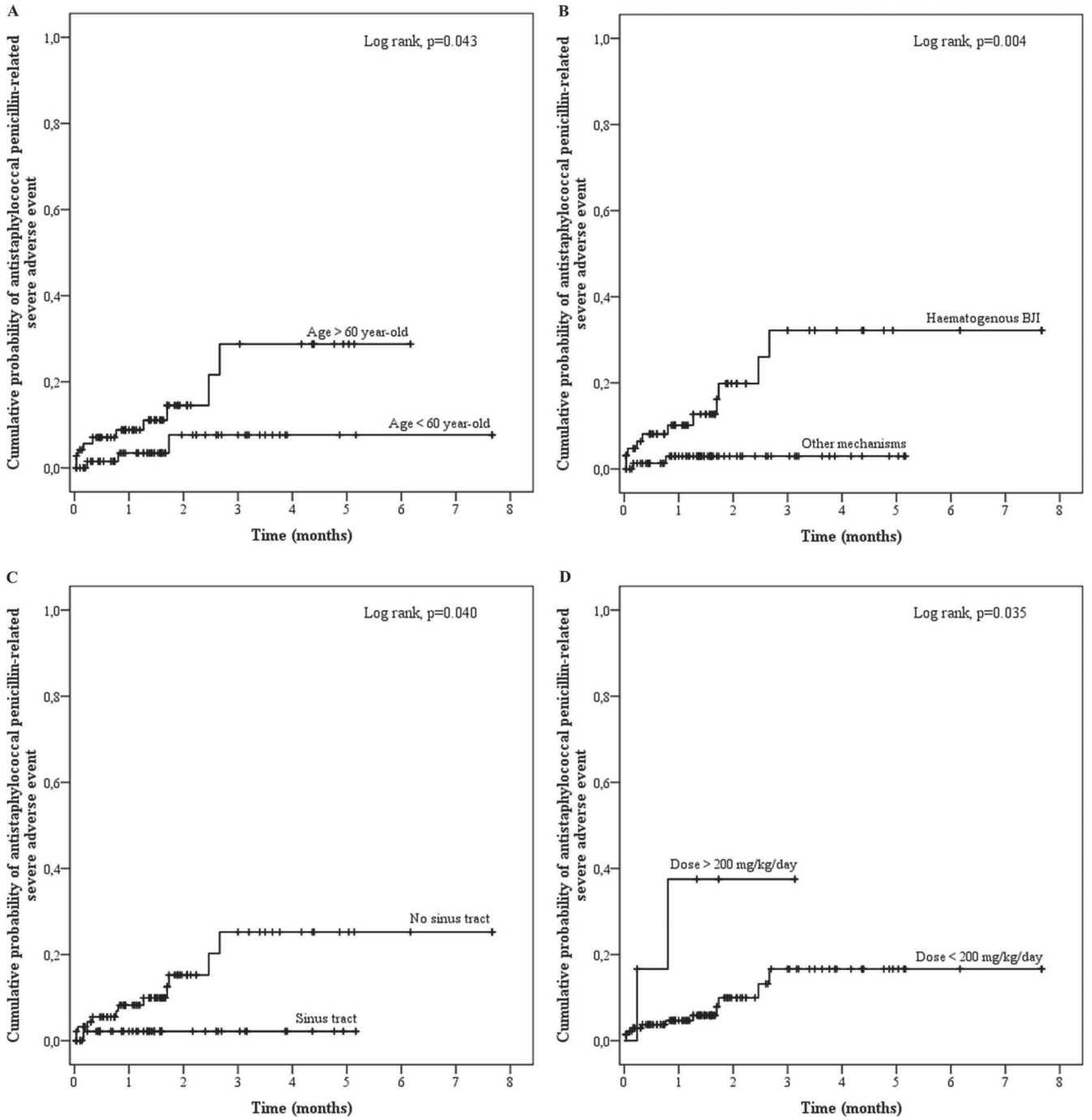


FIG 2 Kaplan-Meier curves for the cumulative risk of antistaphylococcal penicillin-related severe adverse events (SAE) according to age (A), BJI mechanism (B), the presence of a sinus tract (C), and the daily dose (D).

99.344; $P = 0.006$). None of these variables was significantly associated with SAE in the final multivariate model.

Rifampin-related SAE. Rifampin was prescribed in 107 patients (53.5%) for a median of 101.0 days (IQR, 39.5 to 187.5 days). Rifampin was mainly used at a dose of 600 mg ($n = 60$ [56.1%]) or 900 mg ($n = 23$ [21.5%]) twice a day, for a median daily dose of 18.8 mg/kg (IQR, 16.2 to 21.2 mg/kg). Seven SAE occurred in these patients, with a time delay of 20.0 days (IQR, 20.0 to 24.5 days), and were associated with female sex (OR, 4.257; 95% CI, 0.786 to 23.054; $P = 0.093$) and obesity (OR, 12.969; 95% CI, 2.311 to 72.783; $P = 0.004$) (Table 3 and Fig. 4). After multivariate analysis, only obesity was found to be independently associated with rifampin-related SAE, with an OR of 8.991 (95% CI, 1.453 to 55.627; $P = 0.018$). Indeed, the weights of the patients suffering from rifampin-induced SAE (median, 90.0 kg [IQR, 44.0 to 104.0 kg]) were significantly higher than those receiving rifampin and were without SAE (71.5 kg [IQR, 63.0 to 81.6 kg]; $P = 0.016$). The daily dose of rifampin was significantly higher in the

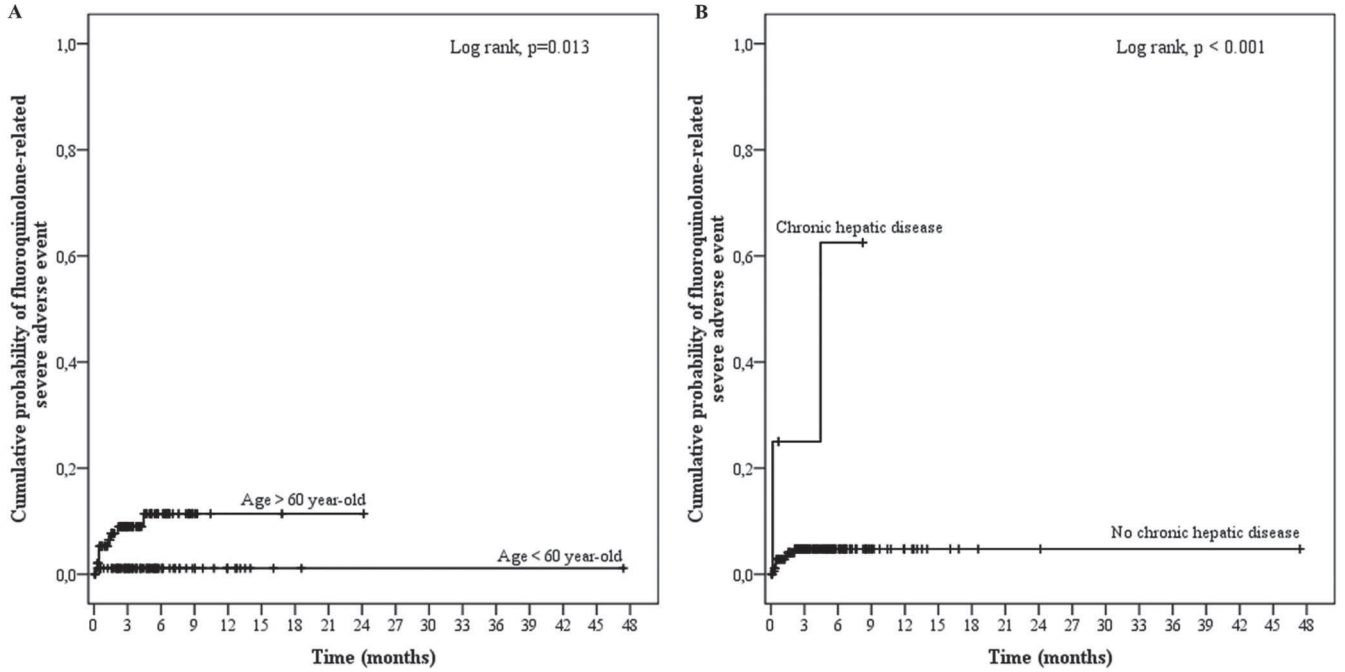


FIG 3 Kaplan-Meier curves for the cumulative risk of fluoroquinolone-related severe adverse events (SAE) according to age (A) and the existence of chronic hepatic disease (B).

obese patients (1,500 mg; IQR, 1,200 to 1,800 mg) than in the normal-weight patients (1,200 mg; IQR, 1,200 to 1,500 mg; $P = 0.021$) but did not appear in the regression model analysis to be directly linked to the occurrence of SAE.

DISCUSSION

This retrospective cohort study of 200 patients with MSSA BJI provides the largest published set of data regarding the tolerance of prolonged antimicrobial use for the treatment of BJI. The demographic characteristics of patients with BJI and the clinical presentation of BJI were similar to what is usually described, with a predominance of male patients and a median age of 60 years old (1–4, 16, 17). The main difference between our study and the current recommendations or recent published data is a longer duration of treatment, justified by the high rate of difficult-to-treat BJI, i.e., infections occurring in

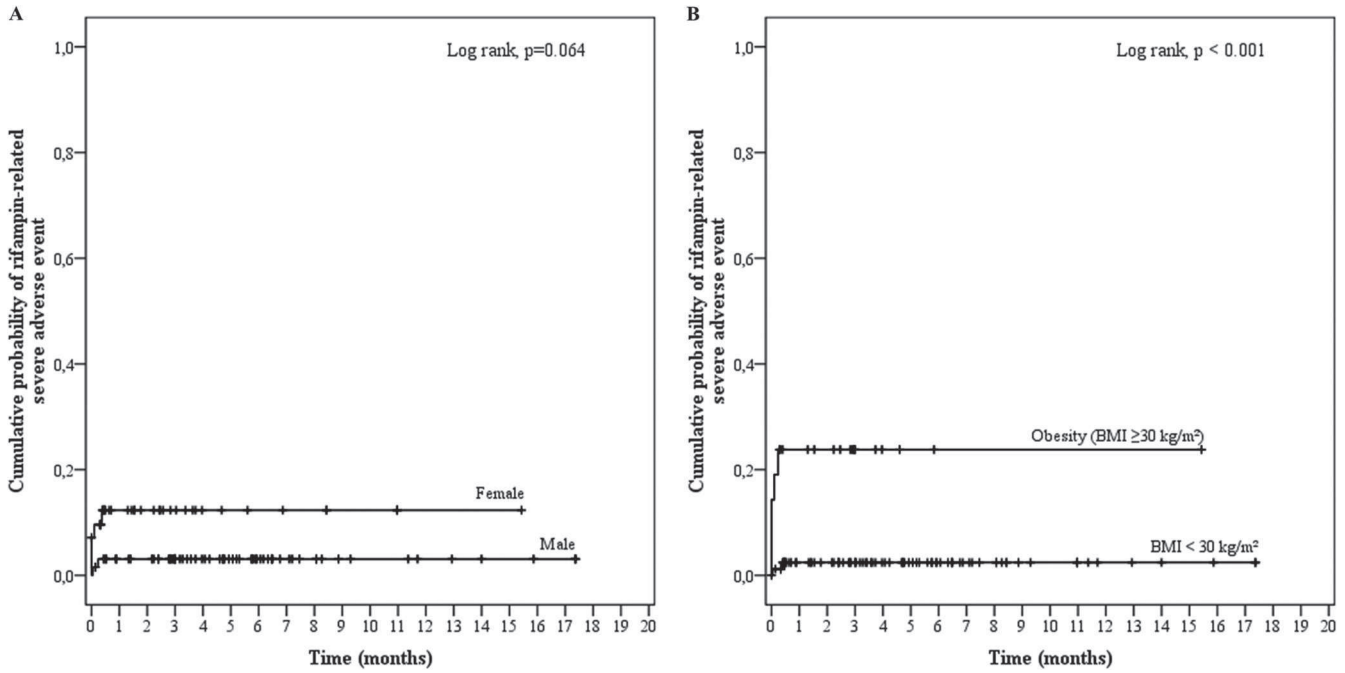


FIG 4 Kaplan-Meier curves for the cumulative risk of rifampin-related severe adverse events (SAE) according to sex (A) and body mass index (BMI) (B).

debilitated patients, the presence of bacteremia (>60%) or sinus tract or local abscess (39%), and for orthopedic device infections, a high rate of incomplete device removal (48%) or delayed surgical management (6, 18–20); also, these BJI were caused by *S. aureus*, which is known to be an independent risk factor of treatment failure (6, 7). The complicated nature of the included BJI was confirmed by the high rate of treatment failure (40%) despite prolonged antimicrobial combination therapy.

Our results pinpointed a high rate of SAE (15% of patients), consistent with the few other reports existing in the literature. In the Cochrane meta-analysis run in 2013 (12), the global incidence rates of mild and moderate-to-severe AE were 16.1% and 7.7%, respectively, with no difference between the oral and parenteral routes for antimicrobial administration. A similar antimicrobial-related toxicity rate was observed in the study of Pulcini et al. (14), including 129 patients receiving antimicrobial therapy for a mean of 205 days (SD, 200), initially intravenously administered for 133 days (SD, 100), with 18 patients (16%) experiencing antimicrobial-related adverse events.

In most cases, these antimicrobial-related SAE led to a disruption in treatment. Although our study failed to disclose any difference in terms of therapeutic success, treatment interruption can adversely affect patient outcomes due to the use of less suitable antibiotics or an earlier switch to oral therapy. In addition, the occurrence of AE led to patient hospitalization in 60% of cases for a median duration of 1 week, resulting in an increase in the overall cost of care.

Severe AE occurrence was independently associated with age and prolonged treatment duration. Since the age and underlying conditions of patients cannot be modified, these results stress the need to develop clinical trials aiming to reduce the treatment duration for these infections. Although our results failed to link the occurrence of SAE with an early referral to an infectious disease specialist, an early interaction between surgeons, microbiologists, and infectious disease clinicians might help reduce the incidence of antimicrobial-related SAE, in addition to being cost-efficient regarding the improvement of antibiotic therapy quality in BJI (21, 22). For instance, Pestotnik et al. (23) showed a decrease by 30% in the incidence of AE after the application of a computer-assisted antimicrobial prescription support based on clinician recommendations.

β-Lactams, and especially antistaphylococcal penicillins, were the most frequent antimicrobials involved in SAE occurrence, for which the daily dose appeared to be an independent risk factor. Allergic reactions (i.e., mucocutaneous events) were unexpectedly low ($n = 3$), but data collection and the CTCAE classification did not allow for specification of the mechanisms of the other observed AE. Antistaphylococcal penicillins are well known for inducing allergic interstitial nephritis characterized by acute and often severe renal failure, as well as dose-dependent hypersensitivity hepatitis (24–26), which can correspond to the acute renal failure cases ($n = 4$) and hepatobiliary disorders ($n = 2$) observed in our series. Hematologic reactions ($n = 7$) are also frequently immune-mediated and can consist of neutropenia, hemolytic anemia, or acute thrombopenia (25, 27).

Concerning rifampin, obesity was retained as the only independent risk factor for SAE incidence. Since rifampin daily dose alone was not linked with SAE, it appeared to be significantly higher in obese patients, probably due to a weight-guided dose adjustment. Little is known about the use of antimicrobials, especially rifampin, in obese patients, in whom drug pharmacokinetics may greatly vary due to differences in tissue distribution, protein binding, metabolism, and clearance of antimicrobials (28). The rifampin dose adjustment made for obese patients may point to the benefit of using the ideal body weight instead of the total weight, as has been described for many antimicrobials (29, 30).

Some limitations of our study should be addressed. Its retrospective observational design resulted in a reporting bias with a risk of underestimating minor AE. We tried to minimize this risk by studying SAE only. Another pitfall lies in the lack of information about other medications associated with antimicrobial therapy, as polymedication is a well-known risk factor for drug-related AE (31). In the same way, the heterogeneity of patient management and the frequent modifications of antimicrobial regimens during treatment prevented us from analyzing the risk of SAE associated with different antibiotics, which pertains to all patients in the study. Although a recent meta-analysis failed to disclose any difference in terms of AE occurrence between different antimicrobial regimens during the treatment of osteomyelitis (12), more powerful studies are needed.

In conclusion, the SAE rate was high (15%) in this cohort of patients with complicated MSSA BJI requiring long-term antimicrobial therapy. Clinicians should be aware of the risk of SAE in elderly and debilitated patients, especially when calculating antistaphylococcal penicillin dosages and rifampin dose adjustment in obese patients. These findings warrant the development of studies aimed at reducing the antimicrobial treatment length in BJI.

ACKNOWLEDGMENTS

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

We report no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Lew DP, Waldvogel FA.** 2004. Osteomyelitis. Lancet **364:**369–379. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5.
2. **Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G.** 2010. Bacterial septic arthritis in adults. Lancet **375:**846–855. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61595-6.
3. **Zimmerli W.** 2010. Clinical practice. Vertebral osteomyelitis. N. Engl. J. Med. **362:**1022–1029. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcp0910753.
4. **Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE.** 2004. Prosthetic-joint infections. N. Engl. J. Med. **351:**1645–1654. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra040181.
5. **Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME.** 2008. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **52:**13–22. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x.
6. **Byren I, Bejon P, Atkins BL, Angus B, Masters S, McLardy-Smith P, Gundle R, Berendt A.** 2009. One hundred and twelve infected arthroplasties treated with 'DAIR' (debridement, antibiotics and implant retention): antibiotic duration and outcome. J. Antimicrob. Chemother. **63:**1264–1271. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp107.

7. **Lee J, Kang CI, Lee JH, Joung M, Moon S, Wi YM, Chung DR, Ha CW, Song JH, Peck KR.** 2010. Risk factors for treatment failure in patients with prosthetic joint infections. J. Hosp. Infect. **75:**273–276. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2010.03.012.
8. **Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, Hanssen A, Wilson WR, Infectious Diseases Society of America.** 2013. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. **56:**e1–e25. http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis803.
9. **Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF).** 2007. Primary infectious spondylitis, and following intradiscal procedure, without prothesis [sic]. Recommendations. Med. Mal Infect. **37:**573–583. (In French.) http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2007.03.007.
10. **Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT), Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP), Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR), Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFCOT), Société Française d'Hygiéne Hospitalière (SFHH), Société Française de Médecine Nucléaire (SFMN), Société Française de Médecine Physique et de Réadaptation (SOFMER), Société Française de Microbiologie (SFM), Société Française de Radiologie (SFR-Rad), Société Française de Rhumatologie (SFR-Rhu).** 2009. Recommendations for clinical practice. Osteo-articular infection therapy according to materials used (prosthesis, implants, osteosynthesis). Med. Mal. Infect. **39:**745–774. (In French.)
11. **Hagihara M, Crandon JL, Nicolau DP.** 2012. The efficacy and safety of antibiotic combination therapy for infections caused by Gram-positive and Gram-negative organisms. Expert. Opin. Drug Saf. **11:**221–233. http://dx.doi.org/10.1517/14740338.2012.632631.
12. **Conterno LO, Turchi MD.** 2013. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. Cochrane Database Syst. Rev. **9:**CD004439. http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD004439.pub3.
13. **Hoffman-Terry ML, Fraimow HS, Fox TR, Swift BG, Wolf JE.** 1999. Adverse effects of outpatient parenteral antibiotic therapy. Am. J. Med. **106:**44–49. http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(98)00362-3.
14. **Pulcini C, Couadau T, Bernard E, Lorthat-Jacob A, Bauer T, Cua E, Mondain V, Chichmanian RM, Dellamonica P, Roger PM.** 2008. Adverse effects of parenteral antimicrobial therapy for chronic bone infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **27:**1227–1232. http://dx.doi.org/10.1007/s10096-008-0570-y.
15. **Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J.** 1994. Validation of a combined comorbidity index. J. Clin. Epidemiol. **47:**1245–1251. http://dx.doi.org/10.1016/0895-4356(94)90129-5.
16. **Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer AI, Gaborit C, Rosset P, Rusch E, Bernard L.** 2012. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. J. Hosp. Infect. **82:**40–48. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2012.04.025.
17. **Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, Porzsolt F.** 2001. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. Lancet Infect. Dis. **1:**175–188. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00094-9.
18. **Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, Hanssen AD, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Osmon DM.** 1997. *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. Clin. Infect. Dis. **24:**914–919. http://dx.doi.org/10.1093/clinids/24.5.914.
19. **Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, Steckelberg JM, Harmsen SW, Mandrekar JN, Osmon DR.** 2006. Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. Clin. Infect. Dis. **42:**471–478. http://dx.doi.org/10.1086/499234.
20. **Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezèque H, Beltrand E, Roselé B, d'Escrivan T, Loïez C, Caillaux M, Yazdanpanah Y, Maynou C, Migaud H.** 2011. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. **53:**334–340. http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir402.
21. **Bauer S, Bouldouyre MA, Oufella A, Palmari P, Bakir R, Fabrequettes A, Gros H.** 2012. Impact of a multidisciplinary staff meeting on the quality of antibiotherapy prescription for bone and joint infections in orthopedic surgery. Med. Mal. Infect. **42:**603–607. http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2012.09.005.
22. **Uçkay I, Vernaz-Hegi N, Harbarth S, Stern R, Legout L, Vauthey L, Ferry T, Lübbeke A, Assal M, Lew D, Hoffmeyer P, Bernard L.** 2009. Activity and impact on antibiotic use and costs of a dedicated infectious diseases consultant on a septic orthopaedic unit. J. Infect. **58:**205–212. http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2009.01.012.
23. **Pestotnik SL, Classen DC, Evans RS, Burke JP.** 1996. Implementing antibiotic practice guidelines through computer-assisted decision support: clinical and financial outcomes. Ann. Intern. Med. **124:**884–890. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-89-4-497. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-124-10-199605150-00004.
24. **Onorato IM, Axelrod JL.** 1978. Hepatitis from intravenous high-dose oxacillin therapy: findings in an adult inpatient population. Ann. Intern. Med. **89:**497–500. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-89-4-497.
25. **Lagacé-Wiens P, Rubinstein E.** 2012. Adverse reactions to β-lactam antimicrobials. Expert. Opin. Drug Saf. **11:**381–399. http://dx.doi.org/10.1517/14740338.2012.643866.
26. **Ditlove J, Weidmann P, Bernstein M, Massry SG.** 1977. Methicillin nephritis. Medicine (Baltimore) **56:**483–491.
27. **Olaison L, Belin L, Hogevik H, Alestig K.** 1999. Incidence of beta-lactam-induced delayed hypersensitivity and neutropenia during treatment of infective endocarditis. Arch. Intern. Med. **159:**607–615. http://dx.doi.org/10.1001/archinte.159.6.607.
28. **Pai MP, Bearden DT.** 2007. Antimicrobial dosing considerations in obese adult patients. Pharmacotherapy. **27:**1081–1091. http://dx.doi.org/10.1592/phco.27.8.1081.
29. **Wurtz R, Itokazu G, Rodvold K.** 1997. Antimicrobial dosing in obese patients. Clin. Infect. Dis. **25:**112–118. http://dx.doi.org/10.1086/514505.
30. **Falagas ME, Karageorgopoulos DE.** 2010. Adjustment of dosing of antimicrobial agents for bodyweight in adults. Lancet **375:**248–251. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60743-1.
31. **Dequito AB, Mol PG, van Doormaal JE, Zaal RJ, ven den Bemt PM, Haaijer-Ruskamp FM, Kosterink JG.** 2011. Preventable and non-preventable adverse drug events in hospitalized patients: a prospective chart review in the Netherlands. Drug Saf. **34:**1089–1100. http://dx.doi.org/10.2165/11592030-000000000-00000.

Valour et al. BMC Infectious Diseases 2014, 14:443
http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/443

BMC Infectious Diseases

RESEARCH ARTICLE Open Access

Determinants of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* native bone and joint infection treatment failure: a retrospective cohort study

Florent Valour[1,2*], Anissa Bouaziz[1], Judith Karsenty[1], Florence Ader[1,2], Sébastien Lustig[2,3], Frédéric Laurent[2,4], Christian Chidiac[1,2], Tristan Ferry[1,2] and on behalf of the Lyon BJI study group

Abstract

Background: Although methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) native bone and joint infection (BJI) constitutes the more frequent clinical entity of BJI, prognostic studies mostly focused on methicillin-resistant *S. aureus* prosthetic joint infection. We aimed to assess the determinants of native MSSA BJI outcomes.

Methods: Retrospective cohort study (2001–2011) of patients admitted in a reference hospital centre for native MSSA BJI. Treatment failure determinants were assessed using Kaplan-Meier curves and binary logistic regression.

Results: Sixty-six patients (42 males [63.6%]; median age 61.2 years; interquartile range [IQR] 45.9–71.9) presented an acute (n = 38; 57.6%) or chronic (n = 28; 42.4%) native MSSA arthritis (n = 15; 22.7%), osteomyelitis (n = 19; 28.8%) or spondylodiscitis (n = 32; 48.5%), considered as "difficult-to-treat" in 61 cases (92.4%). All received a prolonged (27.1 weeks; IQR, 16.9–36.1) combined antimicrobial therapy, after surgical management in 37 cases (56.1%). Sixteen treatment failures (24.2%) were observed during a median follow-up period of 63.3 weeks (IQR, 44.7–103.1), including 13 persisting infections, 1 relapse after treatment disruption, and 2 super-infections. Independent determinants of treatment failure were the existence of a sinus tract (odds ratio [OR], 5.300; 95% confidence interval [CI], 1.166–24.103) and a prolonged delay to infectious disease specialist referral (OR, 1.134; 95% CI 1.013–1.271).

Conclusions: The important treatment failure rate pinpointed the difficulty of cure encountered in complicated native MSSA BJI. An early infectious disease specialist referral is essential, especially in debilitated patients or in presence of sinus tract.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Bone and joint infection, Treatment failure

Background

Bone and joint infections (BJIs) constitute difficult-to-treat clinical entities, known to be associated to significant morbidity and mortality rates. Most of the current literature on BJI concerns orthopaedic device infections and/or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). However, native infections represent the most frequent clinical form of BJI, accounting for approximately 70% of cases, and are mainly caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) [1]. With a respective incidence of 4–10, 10 and 2.4 per 100,000 person-year, septic arthritis, osteomyelitis and vertebral osteomyelitis are associated with a mortality rate of 2-10%, and a risk of permanent loss of joint function of 40% [2,3]. It has recently been shown that the setting of a systematic infectious disease specialist consultation in a septic orthopaedic surgery unit allows a better adjustment of empirical antimicrobial therapy [4]. However, risk factors for treatment failure have

* Correspondence: florent.valour@chu-lyon.fr
[1]Service des maladies infectieuses et tropicales, Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, Lyon, France
[2]Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1111, International Centre for Research in Infectious diseases, Lyon, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Valour et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

poorly been studied. We addressed this question in a retrospective cohort study.

Methods

All patients with native MSSA BJI were enrolled in a monocentric retrospective cohort study (2001–2011) in the reference center for the management of complex BJI of the Lyon University Hospitals, France. To be included, patients should present clinical evidences of infection and at least one reliable bacteriological sample positive for MSSA including percutaneous joint fluid aspiration, surgical sample, and/or blood culture, excluding patients with diabetic foot- and decubitus ulcer-related BJI because of the specific management of these infections. The time from initiation of symptoms of infection to diagnosis defined acute (infection lasting for ≤ 4 weeks) and chronic (infection lasting for > 4 weeks) infections [5]. The modified Charlson comorbidity index was calculated as previously described [6]. Immunosuppression was defined as: i) steroid therapy > 10 mg of prednisone per day or equivalent; ii) immunosuppressive drug during the two last months before BJI onset; or iii) chemotherapy. Treatment failure included i) persisting infection under appropriate antimicrobial therapy; and/or ii) relapse after antimicrobial therapy disruption.

Data were collected from medical records, nursing charts and biological software in an anonymous standardized case report form. Frequencies of the study variables were described as effectives (%) for dichotomous variables, and medians (interquartile range [IQR]) for continuous values. For the percentage calculation of each variable, the number of missing values was excluded from the denominator. Non-parametric statistical methods were used to compare the study groups (Khi2, Fisher exact test, Mann–Whitney U test), as appropriate. Kaplan-Meier curves were compared between groups using the log-rank test. Stepwise binary logistic regression was used to determine risk factors for treatment failure. After checking variables for interactions, variables with medical meaning and p values obtained in univariate analysis < 0.15 were included in the final multivariate model. A value of $p < 0.05$ was taken as significant. All analyses were performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

This study received the approval of the French South-East ethics committee with the reference number CAL2011-21. In accordance with the French legislation, written informed patient consent was not required for any part of the study.

Results

After exclusion of 4 diabetic foot- or decubitus ulcer-related infections and 7 patients with numerous missing values, 66 patients were enrolled in the analysis (42 males; 63.6%), with a median age of 61.2 years (IQR, 45.9–71.9). Demographic characteristics, comorbidities and BJI presentation are summarized in Table 1. Of note, 61 (92.4%) of included BJI were considered as difficult-to-treat, including chronic BJI (n = 28; 42.4%), local abscess (n = 33; 50.0%), sinus tract (n = 18; 27.3%), bacteraemia (n = 35; 53.0%) and/or associated infective endocarditis (n = 4; 6.1%). Importantly, in comparison with arthritis, osteomyelitis were more often chronic (n = 16 (84.2%) versus n = 2 (13.3%); $p < 10^{-3}$), and sinus tract (n = 13 (68.4%) versus n = 2 (13.3%); p = 0.002) and abscesses (n = 10 (52.6%) versus n = 2 (13.3%); p = 0.030) were more frequent.

A surgical management was performed in 37 cases (56.1%). All patients received antimicrobial therapy for 27.1 weeks (IQR, 16.9–36.1), initially administrated intravenously in 59 patients (89.4%) for 7.1 weeks (IQR, 4.9–11.7). All patients received a combined antistaphylococcal therapy during almost all treatment duration (25.6 weeks; IQR, 15.0-32.1). The antimicrobial were chosen according to recommendations and microbiological susceptibility testing in all cases, with respect of contraindications (i.e., drug interactions, previous adverse events …). The main used molecules, doses and duration are presented in Table 2. Of note, 25 patients (37.9%) received glycopeptides, given as initial empirical therapy (n = 4; for a total duration ≤ 14 days), a previous allergic reaction to other antistaphylococcal antibiotics (n = 12), a polymicrobial infection (n = 5), or difficult venous access (n = 4, then using subcutaneous teicoplanin).

Treatment failure was observed in 16 cases (24.2%) during a median follow-up period of 63.3 weeks (IQR, 44.7–103.1): i) 13 patients (19.7%) with persistent infection including 9 patients requiring new surgery performed in a delay of 11.6 weeks (IQR, 5.3–25.6) after antimicrobial treatment initiation; ii) one relapse occurring 13.7 weeks after treatment disruption; and iii) 2 super-infections (one with *Staphylococcus epidermidis*, and one with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus intermedius*). Final evolution was favourable in 12 of the 16 patients with initial treatment failure. Three patients had to be amputated. Five patients (7.6%) died during follow-up, without sepsis-related death. Of note, one fatal pulmonary embolism linked with prolonged bed rest occurred. At the end of follow-up, 24 patients (38.1%) presented functional sequels, consisting in chronic pain and/or loss of function.

Patients presenting a treatment failure did not differ from those with favourable outcome regarding their baseline characteristics, with the exception of a higher prevalence of diabetes (37.5% versus 10%; p = 0.018) and a higher number of patients presenting a modified Charlson comorbidity index > 2 (75.0% versus 44.0%; p = 0.044). There was no difference between the two groups regarding the use of the main administered antimicrobials (Table 2).

Table 1 Patient's characteristics and risk factors for native methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bone and joint infection treatment failure

Risk factor for treatment failure	Total (n = 66)	Treatment failure (n = 16)	Favourable outcome (n = 50)	p	Univariate analysis	
					OR (95%CI)	p
Demographic characteristics						
Sex (male)	42 (63.6%)	10 (62.5%)	32 (64.0%)	0.913	0.938 (0.292-3.006)	0.938
Age (years)	61.2 (45.9-71.9)	61.2 (48.5-69.6)	60.4 (43.5-76.5)	0.828	1.119 (0.820-1.525)*	0.479
Comorbidity						
Modified Charlson score	3.0 (0.0-5.0)	4.0 (2.5-5.0)	2.0 (0.0-4.0)	0.163	1.093 (0.907-1.318)	0.351
Modified Charlson score > 2	34 (51.5%)	12 (75.0%)	22 (44.0%)	0.044	3.818 (1.081-13.486)	0.037
Obesity (BMI > 30 kg/m^2)	13 (20.0%)	3 (20.0%)	10 (20.0%)	1.000	1.000 (0.236-4.231)	1.000
Denutrition (BMI < 18 kg/m^2)	3 (4.6%)	1 (6.7%)	2 (4.0%)	1.000	1.714 (0.145-20.332)	0.669
Diabetes	11 (16.7%)	6 (37.5%)	5 (10.0%)	0.018	5.400 (1.372-21.260)	0.016
Immunodepression	8 (12.1%)	3 (18.8%)	5 (10.0%)	0.390	2.077 (0.437-9.871)	0.358
Nephropathy	10 (15.2%)	3 (18.8%)	7 (14.0%)	0.695	1.418 (0.320-6.277)	0.646
Hepatopathy	2 (3.0%)	2 (12.5%)	0 (0%)	0.056	NC	NC
Chronic pulmonary disease	12 (18.2%)	4 (25.0%)	8 (16.0%)	0.465	1.750 (0.449-6.825)	0.420
Chronic heart failure	5 (7.6%)	0 (0%)	5 (10.0%)	0.325	NC	NC
Chronic inflammatory disease	7 (10.6%)	2 (12.5%)	5 (10.0%)	1.000	1.286 (0.224-7.370)	0.778
Neoplasm, hemopathy	7 (10.6%)	1 (6.3%)	6 (12.0%)	0.674	0.489 (0.054-4.397)	0.523
Dementia	1 (1.5%)	1 (6.3%)	0 (0%)	0.242	NC	NC
BJI type						
Arthritis	15 (22.7%)	3 (18.8%)	12 (24.0%)	0.747	0.731 (0.178-3.003)	0.731
Osteomyelitis	19 (28.8%)	8 (50.0%)	11 (22.0%)	0.054	3.545 (1.082-11.615)	0.037
Vertebral osteomyelitis	32 (48.5%)	5 (31.3%)	27 (54.0%)	0.195	0.387 (0.117-1.279)	0.120
BJI mechanism						
Haematogenous	40 (60.6%)	8 (50.0%)	32 (64.0%)	0.480	0.563 (0.180-1.754)	0.321
Inoculation	22 (33.3%)	7 (43.8%)	15 (30.0%)	0.475	1.815 (0.570-5.779)	0.313
Contiguity	4 (6.1%)	1 (6.3%)	3 (6.0%)	1.000	1.044 (0.101-10.806)	0.971
BJI diagnosis						
Fever	43 (65.2%)	10 (62.5%)	33 (66.0%)	1.000	0.859 (0.267-2.764)	0.798
Fistula	18 (27.3%)	7 (43.8%)	11 (22.0%)	0.112	2.758 (0.836-9.092)	0.096
Abscess	33 (50.0%)	7 (43.8%)	26 (52.0%)	0.775	0.718 (0.231-2.229)	0.566
Chronic BJI (evolution > 4 weeks)	28 (42.4%)	8 (50.0%)	20 (40.0%)	0.680	1.500 (0.484-4.651)	0.483
Delay from symptoms to diagnosis (weeks)	2.1 (0.0-10.3)	2.6 (0.0-34.4)	2.1 (0.5-9.8)	0.905	1.026 (0.996-1.057)	0.095
Polymicrobial BJI	10 (15.2%)	3 (18.8%)	7 (14.0%)	0.695	1.418 (0.320-6.277)	0.646
Infective endocarditis	4 (6.1%)	0 (0%)	4 (8.0%)	0.565	NC	NC
Biological inflammatory syndrome	58 (87.9%)	16 (100%)	42 (84.0%)	0.183	NC	NC
Maximal CRP value (mg/L)	152.7 (52.0-317.8)	145.0 (75.3-317.3)	154.7 (52.0-325.9)	0.994	1.000 (0.996-1.004)	0.931
Maximal WBC count value (/mm^3)	10,200 (7,720-14,920)	11,000 (10,200-16,280)	9,710 (7,350-14,770)	0.100	1.058 (0.961-1.164)	0.251
Maximal neutrophil count value (/mm^3)	7,600 (5,200-11,970)	9,300 (6,740-13,470)	7,380 (5,200-11,400)	0.292	1.056 (0.957-1.165)	0.277
Chronic sepsis on pathological examination	9/21 (47.4%)	2/3 (66.7%)	7/16 (43.8%)	0.582	2.571 (0.192-34.473)	0.476
Surgical treatment	37 (56.1%)	11 (68.8%)	26 (52.0%)	0.377	2.031 (0.615-6.701)	0.245
Delay from symptoms to surgery (days)	3 (0–12.5)	0 (0–9)	4 (0–12)	0.402	0.999 (0.994-1.004)	0.632
Antibiotic use						
Delay from diagnosis to specialist referral (days)	4.9 (0.0-23.1)	6.3 (0.7-91.0)	4.9 (0.0-18.5)	0.445	1.102 (1.003-1.211)	0.043

Table 1 Patient's characteristics and risk factors for native methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bone and joint infection treatment failure *(Continued)*

i.v.treatment	59 (89.4%)	13 (81.3%)	46 (92.0%)	0.347	0.377 (0.075-1.901)	0.237
i.v.treatment duration (weeks)	7.1 (4.9-11.7)	9.1 (5.3-16.4)	7.0 (4.6-9.4)	0.297	1.037 (0.986-1.091)	0.156
Bitherapy	66 (100%)	16 (100%)	50 (100%)	1.000	NC	NC
Bitherapy duration (weeks)	25.6 (15.0-32.1)	27.0 (17.4-38.5)	25.1 (15.1-31.1)	0.533	1.016 (0.983-1.050)	0.345
Initial anti-staphylococcal bitherapy	53 (81.5%)	12 (75.0%)	41 (83.7%)	0.719	0.585 (0.150-2.285)	0.441
Initial anti-MSSA bitherapy	40 (61.5%)	8 (50.0%)	32 (65.3%)	0.480	0.531 (0.169-1.666)	0.278
Biological follow-up						
1 month CRP level	13.0 (3.6-36.0)	13.3 (7.4-70.4)	11.0 (3.2-31.9)	0.296	1.006 (0.994-1.018)	0.315
Decrease in CRP level at 1 month < 50%	9 (13.8%)	4 (26.7%)	5 (10.0%)	0.204	3.273 (0.752-14.245)	0.114
1 month CRP level < 10 mg/L	29 (44.6%)	5 (33.3%)	24 (48.0%)	0.377	0.542 (0.162-1.814)	0.320

Results are presented as n (%) for dichotomic variables compared using Chi-square or Fisher exact tests, and median (interquartile range) for continuous variables, compared using Mann–Whitney U-test. Risk factors for treatment failure were assessed using logistic binary regression.
*For a 10-year increase in age.
BJI, Bone and joint infection; CI, Confidence interval; BMI, Body mass index; CRP, C-reactive protein; i.v., Intravenous; MSSA, Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus; NC, Not calculable; OR, Odds ratio; WBC, White blood cells.

Table 2 Main antimicrobial used in the 66 included patients with native methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* native bone and joint infection

	All patients (n = 66)	Treatment failure (n = 16)	Favorable outcome (n = 50)	p
i.v anti-staphylococcal penicillin	49 (74.2%)	11 (68.8%)	38 (76.0%)	0.743
Dose (mg/kg/day)	144.6 (133.3-169.0)	141.2 (133.3-150.0)	144.9 (133.6-172.7)	0.606
Duration (weeks)	6.0 (3.0-8.0)	6.7 (4.1-12.2)	5.2 (2.7-7.4)	0.250
Glycopeptides	25 (37.9%)	7 (43.8%)	18 (36.0%)	0.768
Vancomycine,	10 (15.2%)	1 (6.3%)	9 (18.0%)	0.430
Dose (mg/kg/day)	26.0 (20.3-30.5)	25	27.0 (19.2-31.3)	NC
Teicoplanin	22 (33.3%)	6 (37.5%)	16 (32.0%)	0.764
Dose (mg/kg/day)	5.7 (4.1-7.0)	7.2 (5.4-8.4)	5.2 (3.9-6.5)	0.197
Duration	3.4 (2.6-7.6)	3.4 (1.9-16.1)	3.9 (2.8-6.7)	0.832
Aminoglycosides	38 (57.6%)	9 (56.3%)	29 (58.0%)	1.000
Rifampin	36 (54.5%)	9 (56.3%)	27 (54.0%)	1.000
Dose (mg/kg/day)	18.8 (14.6-21.2)	18.0 (14.6-21.4)	18.8 (15.2-20.8)	0.841
Duration (weeks)	20.3 (2.7-34.6)	27.5 (11.8-53.1)	16.0 (2.7-25.3)	0.334
Fluoroquinolones	62 (93.9%)	15 (93.8%)	47 (94.0%)	1.000
Ofloxacin dose (mg/kg/day)	6.7 (5.8-7.5)	7.1 (6.3-7.5)	6.35 (5.7-7.3)	0.240
Duration (weeks)	14.6 (8.0-27.6)	17.0 (10.9-31.9)	14.6 (7.6-24.4)	0.397
Macrolid group	46 (69.7%)	10 (62.5%)	36 (72.0%)	0.538
Clindamycin	17 (25.8%)	6 (37.5%)	11 (22.0%)	0.324
Pristinamycin	33 (50.0%)	5 (31.3%)	28 (56.0%)	0.150
Linezolid	6 (9.1%)	1 (6.3%)	5 (10.0%)	1.000
Fucidic acid	4 (6.1%)	1 (6.3%)	3 (6.0%)	1.000
Fosfomycin	13 (19.7%)	4 (25.0%)	9 (18.0%)	0.719
Cotrimoxazole	2 (3.0%)	1 (6.3%)	1 (2.0%)	0.429

i.v: intravenous.
Difference between the two groups were assessed using Chi-square test or Fisher exact test for dichotomic variables, and Mann–Whitney U-test for continuous variables.

The delay from diagnosis to infectious disease specialist advice (i.e. first phone contact, consultation or hospitalization) tended to have been higher for patients with treatment failure (6.3 days; IQR, 0.7–91.0; p = 0.445), and especially for those with persistent infection (7.7 days; IQR, 0.4–161.0; p = 0.217) than for patients with favourable outcome. In univariate analysis, diabetes (Odd ratio [OR], 5.4; 95% confidence interval [CI], 1.372–21.260; p = 0.016), osteomyelitis (OR, 3.545; 95% CI, 1.082–11.615; p = 0.037), and a prolonged delay for infectious disease specialist referral (OR, 1.102; 95% CI, 1.003–1.211; p = 0.043) were associated with treatment failure (Table 1, Figure 1). Non-interacting and clinically relevant factors included in the multivariate logistic regression model were a modified Charlson comorbidity index > 2 (OR, 3.322; 95% CI, 0.753–14.661; p = 0.113), the existence of a sinus tract (OR,

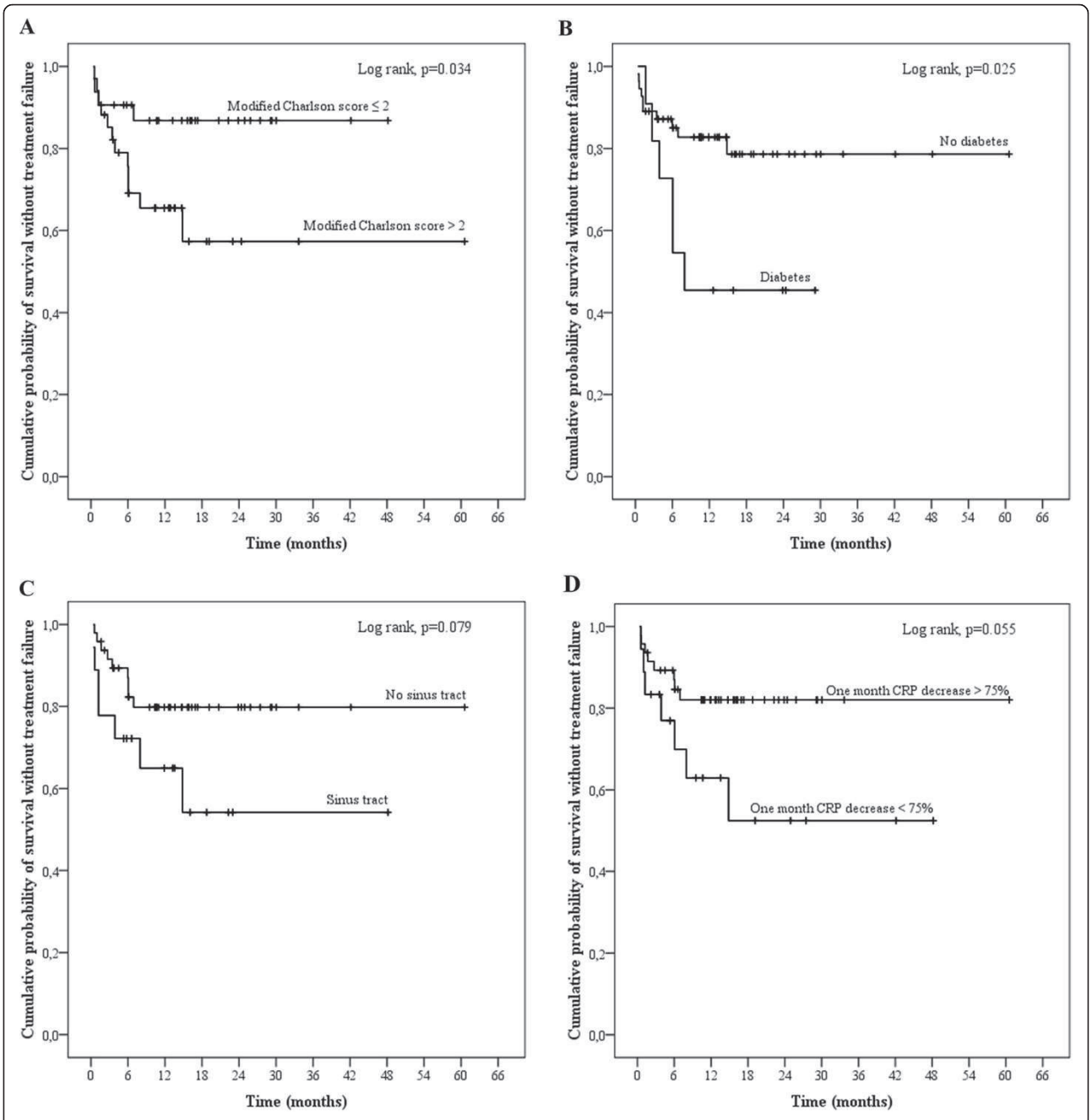


Figure 1 Kaplan-Meier curves for the cumulative risk of treatment failure. Kaplan-Meier curves for the cumulative risk of treatment failure are presented according to the modified Charlson comorbidity index (panel **A**), the presence of diabetes (panel **B**) or sinus tract (panel **C**), and the 1-month CRP level (panel **D**). Groups were compared using the log-rank test.

5.300; 95% CI, 1.166–24.103; p = 0.031), a delayed referral to infectious disease specialist (OR, 1.134; 95% CI, 1.013–1.271; p = 0.029), and a decreased in CRP level at 1 month < 75% (OR, 3.183; 95% CI, 0.727–13.936; p = 0.124).

Discussion

In this retrospective cohort study including patients with native MSSA BJI, we pinpointed an important rate of unfavourable outcome, including a treatment failure rate reaching one quarter of patients and high proportion of functional sequels. These results should be interpreted in light of the high prevalence of difficult-to-treat infections enrolled in the study, due to the particular recruitment of our institution, a reference centre for the management of complex BJI. Moreover, the implication of *S. aureus* is known to be associated with a poorer outcome of native and device-associated septic arthritis [7-9]. However, these findings are consistent with the few available data in the literature [2,10]. Most of studies focusing on native staphylococcal BJI outcome were large epidemiologic investigations, based on national health surveillance programs, and consequently not design to assess precise outcome but only mortality. In a previous study, Wieland et al. disclosed a treatment failure rate of 12.2% among 41 native MSSA BJI [11]. Although these authors provided no detailed information about the type of patient recruitment, the short treatment court duration (43 days) and the low amount of patient requiring nursing home or rehabilitation facility (11%) allow supposing that common forms of BJI were more represented. In our particular patient population requiring long-term antimicrobial therapy, independent risk factors for treatment were the presence of a sinus tract and a delayed referral to infectious disease specialist. Fistula has already been associated with poor outcome in prosthetic-joint infection and vertebral osteomyelitis [12,13]. Our findings confirmed that this clinical evidence for chronic infection is associated with treatment failure of native BJI. Diabetes was associated with a higher risk of treatment failure in univariate analysis but was excluded from the final model because the parameter was included in the Charlson comorbidity score calculation. However, it is a well-known risk factor for treatment failure [14]. Interestingly, we observed a trend in a higher treatment failure rate in bone infections (50.0%) compared to arthritis (18.8%). This difference probably lies in the higher rate of chronic infections, sinus tracts and abscesses among the osteomyelitis cases. Indeed, in the study by Wieland and colleagues, these two BJI types harboured the same outcome [11].

The impact of a referral to infectious disease specialist has been evaluated in several studies, which showed a benefit in terms of early adaptation of the initial empirical therapy after bacteriological results, and regarding dosages and duration of antimicrobials [4,15]. However, these series failed to highlight an improvement of BJI outcome. Nevertheless, Bauer and colleagues showed a decrease from 25 to 18% of treatment failure rate after the instauration of a weekly multidisciplinary staff meeting in their institution, even if this difference was not significant [15].

Some studies had found other determinants of poor outcome in native BJI, including advanced age, a raised white cell count at presentation, the presence of an abscess, a delayed initiation of antimicrobial treatment, a pre-existing joint disease which may delay diagnosis [9,13,16-18]. We failed to found any association between outcome and the nature of antimicrobial therapy, and especially with the use of glycopeptides used as empirical therapy, for polymicrobial infection, or in patients with beta-lactam allergy. Indeed, vancomycin therapy has been associated with a poor outcome in MSSA bacteraemia, due to its slow bactericidal activity [19,20]. One study including a majority of MSSA native osteomyelitis also suggested that vancomycin-treated infections were nearly three-times more likely to recur [21]. Contrary to prosthetic-joint infections, the use of rifampin did not appear as a protective factor in our study, possibly because of the less important implication of biofilm in absence of orthopaedic device. Finally, if the optimal treatment duration of BJI is unknown, a longer antimicrobial therapy did not appear as a protective factor. Prolonged antimicrobial therapy observed in our study is partly explained by the complicated nature of the included BJI. Another explanation lies in the retrospective nature of the study, which included patients in a 10-year period. Even in the absence of controlled randomized trial, the absence of evidence regarding the benefit of prolonged treatment lead to progressively decrease treatment duration in our population, without increasing failure rate over years (data not shown). Prospective controlled studies are needed to confirm the feasibility of shorter treatments. However, some studies had suggested that reducing treatment duration was associated with an increased risk of treatment failure, notably in vertebral osteomyelitis [22].

Conclusions

MSSA native BJI are associated with a high rate of treatment failure and sequel, despite the use of prolonged antimicrobial therapy. A multidisciplinary approach is required, with an early referral to infectious disease specialist, especially in debilitated patients or in presence of a sinus tract.

Abbreviations

BJI: Bone and joint infection; CI: Confidence interval; IQR: Interquartile range; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA: Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; OR: Odds ratio.

Competing interests
This work was supported by the French Ministry of Health, the French Ministry of Education and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. There is no conflict of interest, for all authors.

Authors' contributions
FV participated in the design of the study and the acquisition and interpretation of data, performed the statistical analysis, and drafted the manuscript. AB, JK and SL participated in the acquisition and interpretation of data and helped to draft the manuscript. FA, FL and CC participated in the design of the study, and helped to statistical analysis and to draft the manuscript. TF conceived of the study, participated in its design and coordination, helped to statistical analysis and to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements
Lyon Bone and Joint Infection Study Group: Physicians – Florence Ader, François Biron, André Boibieux, Anissa Bouaziz, Evelyne Braun, Christian Chidiac, Fatiha Daoud, Tristan Ferry, Judith Karsenty, Johanna Lippman, Patrick Miailhes, Thomas Perpoint, Dominique Peyramond, Marie-Paule Vallat, Florent Valour; Surgeons – Cédric Barrey, Pierre Breton, Fabien Boucher, Romain Desmarchelier, Michel-Henry Fessy, Olivier Guyen, Christophe Lienhart, Sébastien Lustig, Alain-Ali Mojallal, Philippe Neyret, Franck Trouillet, Gualter Vaz; Microbiologists – Frédéric Laurent, Jean-Philippe Rasigade, François Vandenesch; Nuclear Medicine – Emmanuel Deshayes, Francesco Giammarile, Marc Janier, Isabelle Morelec; PK/PD specialists – Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle, Michel Tod; Clinical Research Assistant – Marion Martinez

Author details
[1]Service des maladies infectieuses et tropicales, Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, Lyon, France. [2]Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1111, International Centre for Research in Infectious diseases, Lyon, France. [3]Chirurgie orthopédique, Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, Lyon, France. [4]Laboratoire de bactériologie, Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

Received: 5 April 2014 Accepted: 12 August 2014
Published: 16 August 2014

References

1. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer AI, Gaborit C, Rosset P, Rusch E, Bernard L: **Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes.** *J Hosp Infect* 2012, **82:**40–48.
2. Garcia-Arias M, Balsa A, Mola EM: **Septic arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011, **25:**407–421.
3. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G: **Bacterial septic arthritis in adults.** *Lancet* 2010, **375:**846–855.
4. Uckay I, Vernaz-Hegi N, Harbarth S, Stern R, Legout L, Vauthey L, Ferry T, Lübbeke A, Assal M, Lew D, Hoffmeyer P, Bernard L: **Activity and impact on antibiotic use and costs of a dedicated infectious diseases consultant on a septic orthopaedic unit.** *J Infect* 2009, **58:**205–212.
5. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB: **Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections.** *J Bone Joint Surg Am* 1996, **78:**512–523.
6. Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J: **Validation of a combined comorbidity index.** *J Clin Epidemiol* 1994, **47:**1245–1251.
7. Azzam KA, Seeley M, Ghanem E, Austin MS, Purtill JJ, Parvizi J: **Irrigation and debridement in the management of prosthetic joint infection: traditional indications revisited.** *J Arthroplasty* 2010, **25:**1022–1027.
8. Byren I, Bejon P, Atkins BL, Angus B, Masters S, McLardy-Smith P, Gundle R, Berendt A: **One hundred and twelve infected arthroplasties treated with 'DAIR' (debridement, antibiotics and implant retention): antibiotic duration and outcome.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **63:**1264–1271.
9. Dubost JJ, Fis I, Denis P, Lopitaux R, Soubrier M, Ristori JM, Bussiere JL, Sirot J, Sauvezie B: **Polyarticular septic arthritis.** *Medicine (Baltimore)* 1993, **72:**296–310.
10. Weston VC, Jones AC, Bradbury N, Fawthrop F, Doherty M: **Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982–1991.** *Ann Rheum Dis* 1999, **58:**214–219.
11. Wieland BW, Marcantoni JR, Bommarito KM, Warren DK, Marschall J: **A retrospective comparison of cetriaxone versus oxacillin for osteoarticular infections due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.** *Clin infect Dis* 2012, **54:**585–590.
12. Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, Steckelberg JM, Harmsen SW, Mandrekar JN, Osmon DR: **Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components.** *Clin Infect Dis* 2006, **42:**471–478.
13. McHenry MC, Easley KA, Locker GA: **Vertebral osteomyelitis: long-term outcome for 253 patients from 7 Cleveland-area hospitals.** *Clin Infect Dis* 2002, **34:**1342–1350.
14. Gomez J, Rodriguez M, Banos V, Martinez L, Claver MA, Ruiz J, Simarro E, Canovas JA, Medina M, Clavel M: **Orthopedic implant infection: prognostic factors and influence of long-term antibiotic treatment on evolution. Prospective study, 1992–1999.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003, **21:**232–236.
15. Bauer S, Bouldouyre MA, Oufella A, Palmari P, Bakir R, Fabreguettes A, Gros H: **Impact of a multidisciplinary staff meeting on the quality of antibiotherapy prescription for bone and joint infections in orthopedic surgery.** *Med Mal Infect* 2012, **42:**603–607.
16. D'Agostino C, Scorzolini L, Massetti AP, Carnevalini M, d'Ettorre G, Venditti M, Vullo V, Orsi GB: **A seven-year prospective study on spondylodiscitis: epidemiological and microbiological features.** *Infection* 2010, **38:**102–107.
17. Gupta MN, Sturrock RD, Field M: **A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2001, **40:**24–30.
18. Tarkowski A: **Infection and musculoskeletal conditions: Infectious arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20:**1029–1044.
19. Chang FY, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, MacDonald BB, Mylotte JM, O'Donnell A, Wagener MM, Yu VL: ***Staphylococcus aureus* bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective multicenter study.** *Medicine (Baltimore)* 2003, **82:**333–339.
20. Kim SH, Kim KH, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, Choe KW: **Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52:**192–197.
21. Tice AD, Hoaglund PA, Shoultz DA: **Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **51:**1261–1268.
22. Priest DH, Peacock JE Jr: **Hematogenous vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* in the adult: clinical features and therapeutic outcomes.** *South Med J* 2005, **98:**854–862.

doi:10.1186/1471-2334-14-443
Cite this article as: Valour *et al.*: Determinants of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* native bone and joint infection treatment failure: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2014 **14**:443.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

DIPLOME NATIONAL DE DOCTORAT (Arrêté du 7 août 2006)

Nom de famille et prénom de l'auteur : VALOUR Florent

Titre de la thèse : Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* : Epidémiologie moléculaire et corrélation entre expression clinique et interactions hôte – bactérie

Résumé de la thèse : Le genre *Staphylococcus*, première étiologie des infections ostéo-articulaires (IOA), est associé à des formes particulièrement difficiles à traiter. Trois mécanismes phénotypiques ont été rattachés à ce fort taux de chronicité et de rechutes, permettant l'adaptation bactérienne à la vie au sein du tissu osseux et un échappement au système immunitaire de l'hôte et à l'action des antibiotiques : la formation de biofilm, la persistance des staphylocoques dans les ostéoblastes, et l'évolution vers le morphotype de *small colony variant* (SCV).

Longtemps considéré comme simple commensal cutanéo-muqueux, *S. epidermidis* est désormais reconnu comme un agent étiologique majeur des IOA sur matériel. Or, si le portage est universel, l'infection est un phénomène rare. A ce jour, aucun facteur génotypique n'a pu être associé au pouvoir invasif de certaines souches de portage. Notre travail a permis de montrer l'absence de pouvoir discriminant des capacités d'internalisation des ostéoblastes et de formation de biofilm entre souches commensales et invasives. Par ailleurs, un très faible taux d'internalisation de *S. epidermidis* dans les ostéoblastes a été mis en évidence, suggérant une importance moindre de ce mécanisme dans la physiopathologie des IOA à *S. epidermidis* par rapport aux IOA à *S. aureus*.

Les principales études ayant porté sur les capacités d'interaction de *S. aureus* avec les ostéoblastes et de formation de biofilm ont cherché à en explorer les mécanismes à partir de souches de laboratoire ou de souches représentatives de quelques clones de *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM). Dans notre cas, nous avons souhaité étudier une large collection de souches cliniques de *S. aureus* (n=95) sensible à la méticilline (SASM) responsables d'IOA aiguës ou chroniques.

La caractérisation des fonds génétiques de cette collection, puis en élargissant notre étude à des collections de différents villes françaises, a d'abord permis de décrire une forte prévalence du clone émergent de SASM CC398 dans les IOA en France.

L'étude des souches de la collection des Hospices Civils de Lyon dans notre modèle *ex vivo* d'infection d'ostéoblastes a permis de valider l'hypothèse impliquant l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules osseuses dans la chronicisation des IOA. Le switch intra-cellulaire vers le phénotype SCV et la formation de biofilm n'étaient en revanche pas discriminants. Un autre résultat important est la mise en évidence d'une corrélation entre la dysfonction du système *agr*, principal régulateur de l'expression des facteurs de virulence staphylococciques, et la chronicité des IOA, en lien avec de plus fortes capacités d'internalisation et de formation de biofilm. La fonctionnalité d'*agr* pouvant être évaluée par la détection en spectrométrie de masse de la delta-hémolysine, produit de la traduction de l'ARNIII, effecteur du système *agr*, cette technique pourrait ainsi représenter la première méthode objective d'évaluation du degré de chronicité d'une IOA au moment du diagnostic, et donc avoir un impact majeur sur la prise en charge des patients. Une étude prospective est actuellement en cours pour valider ce marqueur de chronicité.

Enfin, la démonstration de la pertinence clinique de l'internalisation de *S. aureus* au sein des ostéoblastes dans les IOA chroniques nous a conduit à étudier l'action intra-ostéoblastique des anti-staphylococciques. En effet, l'identification et l'utilisation de molécules actives sur le réservoir intra-cellulaire pourrait permettre d'optimiser les schémas thérapeutiques afin de prévenir l'apparition de récidives. Nos résultats ont permis de mettre en évidence des profils d'activité très différents, la rifampicine, l'ofloxacine et la clindamycine étant les molécules les plus actives. Ces données préliminaires doivent toutefois être renforcées par des études pharmacologiques et cliniques plus larges.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus* ; *Staphylococcus epidermidis* ; Infections ostéo-articulaires ; Ostéoblastes ; Internalisation ; Biofilm ; Small colony variants