



HAL
open science

Bases de pathogénicité de *Cutibacterium acnes* dans les infections sur matériel ostéo-articulaire : Corrélation entre le génotype et la réponse immune

Faten El Sayed

► To cite this version:

Faten El Sayed. Bases de pathogénicité de *Cutibacterium acnes* dans les infections sur matériel ostéo-articulaire : Corrélation entre le génotype et la réponse immune. Bactériologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLV019 . tel-02121360

HAL Id: tel-02121360

<https://theses.hal.science/tel-02121360>

Submitted on 6 May 2019

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.

Bases de pathogénicité de
Cutibacterium acnes dans les infections
sur matériel ostéo-articulaire : Corrélation
entre le génotype et la réponse immune

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants
(SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Boulogne-Billancourt, le 07 Mars 2019, par

Faten El Sayed

Composition du Jury :

- | | |
|--|---------------------------|
| Jean-Louis Gaillard
PU-PH, UVSQ - APHP
(Inserm UMR1173) | Président |
| Stéphane Corvec
MCU-PH, Université de Nantes – C.H.U de Nantes
(Inserm U1232) | Rapporteur |
| Eric Senneville
PU-PH, Université de Lille – C.H de Tourcoing | Rapporteur |
| Claire Poyart
PU-PH, Paris Descartes - APHP
(Inserm UMR1016) | Examineur |
| Thomas Bauer
PU-PH, UVSQ - APHP
(Inserm UMR1173) | Examineur |
| Martin Rottman
PU-PH, UVSQ - APHP
(Inserm UMR1173) | Directeur de thèse |

UFR DES SCIENCES DE LA SANTE – SIMONE VEIL

ANNEE 2019

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

PRESENTEE PAR EL SAYED FATEN

SOUTENUE LE 07 MARS 2019

Bases de pathogénicité de *Cutibacterium acnes*
dans les infections sur matériel ostéo-articulaire :
Corrélation entre le génotype et la réponse
immune

JURY

PRESIDENT	Professeur Jean-Louis Gaillard
RAPPORTEUR	Professeur Eric Senneville
RAPPORTEUR	Docteur Stéphane Corvec
EXAMINATEUR	Professeur Claire Poyart
EXAMINATEUR	Professeur Thomas Bauer
DIRECTEUR DE THESE	Professeur Martin Rottman

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	6
INDEX DES FIGURES	8
INDEX DES TABLEAUX	12
AVANT-PROPOS	14
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
<i>I. Cutibacterium acnes (anciennement appelé Propionibacterium acnes), la bactérie</i>	19
1. Taxonomie des Propionibactéries	19
2. Caractéristiques générales de <i>Cutibacterium acnes</i>	26
2.1. Caractéristiques biochimiques et culturales	26
2.2. Caractéristiques génétiques	28
3. Différents types de <i>C. acnes</i>	31
3.1. Historique	31
3.2. Différentes techniques de typage	31
3.2.1. Les premières techniques	31
3.2.2. Techniques de typage "band-based"	32
a) Repetitive-sequence-based PCR (Diversilab)	32
b) La technique RAPD (Random Amplification Amplified Polymerase DNA)	32
c) L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)	34
d) PCR multiplexe	34
e) MLVA ou Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis	36
3.2.3. Les techniques de typage « sequence-based »	38
a) <i>recA/tly</i>	38
b) Le ribotypage	41
c) MLST (Multi-Locus Sequence Typing)	41
d) SLST (Single-Locus Sequence Typing)	46
e) Typage par séquençage complet du génome (WGS ou whole genome sequencing)	47
3.2.4. Techniques de typage par spectrométrie de masse	49
4. Habitat naturel et pathologies associées	49
4.1. Niche écologique	49
4.2. <i>C. acnes</i> et pathologies inflammatoires	56

TABLE DES MATIERES

4.2.1.	L'acné	56
4.2.2.	Sarcoïdose	57
4.2.3.	SAPHO	59
4.2.4.	Mal de dos.....	60
4.2.5.	Cancer de la prostate	62
4.3.	<i>C. acnes</i> et infections.....	64
4.3.1.	Infections sans matériel étranger	64
4.3.2.	Infections sur matériel étranger (<i>Figure 23</i>)	66
a)	Infections sur prothèses mammaires	66
b)	Infections sur matériel cardiovasculaire.....	67
c)	Infections sur matériel ostéo-articulaire	68
5.	Pouvoir pathogène de <i>C. acnes</i>	69
5.1.	Inflammation : Voies d'activation et composants proinflammatoires de <i>C. acnes</i>	69
5.1.1.	Immunité innée.....	69
5.1.2.	Immunité adaptative.....	71
5.2.	Biofilm	73
5.3.	Persistance intracellulaire	73
5.4.	Pouvoir hémolytique	75
5.5.	Facteurs de virulence	78
5.5.1.	Christie, Atkins, Munch-Peterson facteur ou CAMP factor	78
5.5.2.	Divers facteurs de virulence	80
6.	Phylogénie, tropisme et virulence de <i>C. acnes</i>	82
6.1.	Phylotype et pathologies	82
6.2.	Phylotype et virulence.....	84
6.2.1.	Phylotype et inflammation.....	84
6.2.2.	Phylotype et biofilm	89
II.	<i>Les infections sur prothèses ostéo-articulaires</i>	89
1.	Introduction générale	89
2.	Epidémiologie microbienne	92
3.	Définition	94
4.	Classification	97
4.1.	Classification de Tsukayama (1996).....	97

TABLE DES MATIERES

4.2.	Classification de Zimmerli (2004 ; 2014)	97
III.	<i>C. acnes</i> dans les infections sur matériel ostéo-articulaire	99
1.	Epidémiologie, topographie et porte d'entrée	99
2.	Présentation clinico-biologique et terrain	100
2.1.	Données démographiques et chirurgicales	100
2.2.	Présentation clinique (Figure 32)	103
2.3.	Présentation biologique	104
2.3.1.	Biomarqueurs sériques	104
a)	Biomarqueurs sériques de l'IPOA en général	104
b)	Biomarqueurs sériques de l'IPOA à <i>C. acnes</i>	105
2.3.2.	Marqueurs biologiques et histopathologiques périprothétiques	106
3.	Diagnostic microbiologique des IPOAs à <i>C. acnes</i>	106
3.1.	Prétraitement du prélèvement	107
3.2.	Choix des milieux de culture.....	107
3.3.	Temps de détection et durée d'incubation des milieux	109
4.	Sensibilité aux antibiotiques	110
5.	Diagnostic d'une IPOA à <i>C. acnes</i>	112
6.	Physiopathologie des IPOAs à <i>C. acnes</i>	114
6.1.	Biofilm	114
6.2.	Inflammation	123
6.3.	Phylogénie de <i>C. acnes</i>	125
	PROBLEMATIQUE.....	127
	TRAVAUX PERSONNELS	131
I.	<i>Variabilité de la présentation clinique des IMOAs à C. acnes : corrélation entre le génotype et la réponse immune in vivo</i>	132
1.	Présentation.....	132
2.	Méthodologie	134
2.1.	Recueil de cas d'IMOAs à <i>C. acnes</i>	134
2.2.	Recueil d'isolats correspondant aux cas d'IMOA à <i>C. acnes inclus</i>	135
2.2.1.	Prise en charge bactériologique	135
2.2.2.	Identification et génotypage des isolats de <i>C. acnes</i>	136

TABLE DES MATIERES

3.	Corrélation entre génotype et réponse inflammatoire <i>in vivo</i>	137
3.1.	Résultats	137
3.2.	Discussion	157
3.3.	Points importants	161
II.	<i>Place de la technique SLST dans le diagnostic des IMOAs à C. acnes</i>	162
1.	Présentation.....	162
2.	Résultats et Discussion.....	167
3.	Points importants.....	170
III.	<i>Corrélation entre génotype et réponse inflammatoire in vitro</i>	171
1.	Présentation.....	171
2.	Méthodologie	172
2.1.	Isolats de <i>C. acnes</i> et préparation de lots.....	172
2.1.1.	Choix des isolats	172
2.1.2.	Préparation des lots de congélation	172
2.2.	Culture de macrophages THP-1	172
2.3.	Protocole d'infection des macrophages par <i>C. acnes</i>	173
2.4.	Dosage TNF α	174
2.5.	Analyse des données	174
3.	Résultats	177
4.	Discussion	178
5.	Points importants.....	179
IV.	<i>Variabilité des caractéristiques culturelles de C. acnes</i>	180
1.	Présentation.....	180
2.	Méthodologie et résultats	181
3.	Points importants.....	198
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	199
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	204
	ANNEXES	220

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection
BC	Blood Culture
BHI	Brain Heart Infusion
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen
CC	Complexe Clonal
CRIOA	Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires
CRP	C-reactive Protein
DAIR	Debridement, Antibiotics, Implant Retention
DLV	Double Locus Variant
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IMOA	Infection sur Matériel Ostéo-Articulaire
IPOA	Infection sur Prothèse Ostéo-Articulaire
mAb	Monoclonal Antibody
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time Of Flight
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MLVA	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
MMP	MétalloProtéinases de Matrice
MOI	Multiplicity Of Infection
MSIS	MusculoSkeletal Infection Society
NF-kb	Nuclear Factor-kappa B

LISTE DES ABREVIATIONS

NGS	Next Generation Sequencing
PAM	Peptide AntiMicrobien
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
PSA	Prostate Specific Antigen
SAPHO	Synovite Acné Pustulose Hyperostéose Ostéite
SELDI-TOF	Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
SLST	Single Locus Sequence Typing
SLV	Single Locus Variant
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sequence Type
Tad	Tight Adhesion
TLR	Toll-Like Receptor
TLV	Triple Locus Variant
TNF	Tumor Necrosis Factor
TTD	Time To Detection
UFC	Unité Formant Colonie
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
VS	Vitesse de Sédimentation

INDEX DES FIGURES

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur la comparaison de séquences communes de 135 kb (Scholz et al., 2016).	21
Figure 2. Taille du génome et contenu en GC par espèce (Scholz et al., 2016).....	21
Figure 3. <i>Cutibacterium acnes</i> sur une coloration de Gram (x1000).....	25
Figure 4. Culture de 5 jours de <i>Cutibacterium acnes</i> sur une gélose COS à 35°C en anaérobiose.....	25
Figure 5. Le système CRISPR/ cas dans <i>Cutibacterium acnes</i> présent dans le phylotype II et III (Brüggemann et al., 2012).	27
Figure 6. Phylogénie des plasmides isolés dans des souches de <i>Cutibacterium acnes</i> de phylotypes différents (Davidsson et al., 2017).	27
Figure 7. Split tree construit sur la base des profils alléliques de 91 isolats de <i>C. acnes</i> appartenant à des STs distincts obtenus après génotypage de 285 isolats selon le schéma MLST8 (McDowell et al., 2012a).	30
Figure 8. Profils obtenus par analyse par PCR multiplexe de souches de <i>C. acnes</i> représentant les différents phylotypes connus (Barnard et al., 2015).	33
Figure 9. Spanning tree construit par une analyse MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) de 102 isolats de <i>C. acnes</i> (Hauck et al., 2015).	35
Figure 10. Arbre phylogénique construit sur la base des séquences concaténées de la <i>recA</i> et l'hémolysine <i>tly</i> (1824 pb)(A) et le séquences concaténées des gènes du MLST8 (4235 pb) (McDowell, 2017).	37
Figure 11. Répartition des gènes utilisés pour le typage par MLST9 et MLST7 sur le génome de <i>C. acnes</i> (Kilian et al., 2012).	42
Figure 12. Snapshot de la population de <i>C. acnes</i> (par <i>goeBURST</i>) sur la base des données actuelles du MLST9 contenant 156 STs différents.	42
Figure 13. Le SLST ou Single Locus Sequence Typing permet de différencier les groupes phylogénétiques de <i>C. acnes</i> (Scholz et al., 2014).	45
Figure 14. Localisation du fragment SLST sur le génome de <i>C. acnes</i> KPA121702 (Scholz et al., 2014).	45
Figure 15. Aperçu des spectres de masse de souches de <i>C. acnes</i> de référence appartenant aux phylotypes I, II et III ; zoom sur la région de <i>m/z</i> discriminante (Nagy et al., 2013).	48

INDEX DES FIGURES

<i>Figure 16. Analyse phylotypique par SELDI-TOF (Dekio et al., 2013).</i>	48
<i>Figure 17. Diversité d'échantillonnage cutané (A) (Grice et al., 2008) et localisation de C. acnes sur la peau (B) (Alexeyev et al., 2012).</i>	50
<i>Figure 18. C. acnes le long du follicule pileux en microscopie confocale Alexeyev et al., 2012; Jahns et al., 2014).</i>	50
<i>Figure 19. Distribution des différents Phyla bactériens sur les différents sites cutanés (Grice et al., 2011).</i>	52
<i>Figure 20. Variabilité topographique de l'abondance relative cutanée des Propionibactéries (Grice et al., 2009; Achermann et al., 2014).</i>	52
<i>Figure 21. Acné du visage d'un adolescent (Webster, 2002).</i>	55
<i>Figure 22. Pathogénèse de l'acné et C. acnes (Beylot et al., 2014; Moradi Tuchayi et al., 2015).</i>	55
<i>Figure 23. Diversité des infections sur matériel étranger dues à C. acnes (Portillo et al., 2013).</i>	65
<i>Figure 24. C. acnes et l'immunité.</i>	72
<i>Figure 25. Arbre phylogénétique illustrant relation entre les CAMP facteurs de C. acnes et ceux de streptocoques (Valanne et al., 2005).</i>	77
<i>Figure 26. Distribution des isolats acnéiques dans la population globale C. acnes (Analyse eBurst) (Lomholt et al., 2010).</i>	81
<i>Figure 27. Distribution des phylotypes de C. acnes en fonction des sites de recueil. Figure adaptée à partir des données de McDowell et al. (McDowell et al., 2013).</i>	81
<i>Figure 28. Comparaison de la phylogénie de C. acnes isolés de tissus cancéreux prostatiques aux isolats d'origines diverses déjà décrits dans la littérature (Mak et al., 2013).</i>	83
<i>Figure 29. Réponse relative des marqueurs de l'immunité innée (ARNm-RT-qPCR) induite par les différents phylotypes de C. acnes (Jasson et al., 2013).</i>	85
<i>Figure 30. Les phylotypes de C. acnes induisent un profil cytokinique différent (Yang et al., 2016).</i>	87
<i>Figure 31. Distribution des bactéries anaérobies dans les infections ostéo-articulaires (Walter et al., 2014).</i>	91
<i>Figure 32. Infection sur prothèse d'épaule gauche chez une patiente de 82 ans (Achermann et al., 2014).</i>	102
<i>Figure 33. Temps de détection des isolats de C. acnes en subculture (Rentenaar et al., 2018).</i>	108
<i>Figure 34. Etapes de formation et d'échappement du biofilm bactérien (Petrova et al., 2016).</i>	113
<i>Figure 35. Microscopie électronique du biofilm de la souche de référence C. acnes ATCC11827 (IA) sur une tige d'acier inoxydable (Achermann et al., 2014).</i>	115

INDEX DES FIGURES

<i>Figure 36. Agrégats de C. acnes sur un sonicat d'une prothèse de hanche associée à une culture négative (Tunney et al., 1999).</i>	115
<i>Figure 37. Observation par microscopie électronique ex vivo du biofilm de C. acnes développé sur un modèle murin d'infection d'implant fémoral et persistant 6 mois après l'infection (Shiono et al., 2016).</i>	120
<i>Figure 38. Survie de C. acnes avec ou sans implant fémoral (Shiono et al., 2016).</i>	120
<i>Figure 39. Visualisation de la région inflammatoire dans un modèle d'ostéomyélite murin à C. acnes (Shiono et al., 2016).</i>	122
<i>Figure 40. Coupe histologique d'un tibia de lapin infecté par C. acnes (Achermann et al., 2015).</i>	122
<i>Figure 41. Distribution des phylotypes (sur la base du séquençage du gène recA) de C. acnes isolés sur matériel prothétique ostéo-articulaire (Fernandez Sampedro et al., 2009).</i>	124
<i>Figure 42. Phylogénie (selon le schéma MLST9) des 34 cas d'IMOs à C. acnes.</i>	151
<i>Figure 43. Catégorisation génotypique de 24 cas d'IMOs à C. acnes et réponse inflammatoire in vivo.</i>	151
<i>Figure 44. Reclassification des 24 IMOs à C. acnes en fonction des données génotypiques et réponse inflammatoire in vivo.</i>	151
<i>Figure 45. Phylogénie (selon le schéma MLST9) des 34 cas d'IMOs à C. acnes : infections sur prothèses vs sur matériel d'ostéosynthèse.</i>	153
<i>Figure 46. STs et catégorisation génotypique des 34 cas d'IMOs à C. acnes.</i>	155
<i>Figure 47. Typage des 108 isolats de C. acnes par SLST.</i>	166
<i>Figure 48. Dendrogramme représentant la phylogénie de la population de C. acnes sur la base de la séquence nucléotidique obtenue par SLST (Source : http://medbac.dk/slst/pacnes)</i>	168
<i>Figure 49. La réponse TNFα par les macrophages THP-1 infectés par les différents isolats de C. acnes et les isolats contrôle.</i>	176
<i>Figure 50. Absence de corrélation entre la réponse inflammatoire in vitro (TNFα) et la réponse inflammatoire in vivo (CRP).</i>	176

INDEX DES TABLEAUX

INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Caractéristiques phénotypiques discriminantes des différentes espèces de l'ancien genre <i>Propionibacterium</i> sp.(Kusano et al., 1997; Aubin et al., 2016).</i>	25
<i>Tableau 2. Corrélation entre ribotypes, phylotypes et complexes clonaux obtenus par les schémas MLST8 et MLST9 (McDowell, 2017).</i>	40
<i>Tableau 3. Tableau récapitulatif des différents gènes séquencés dans les différents schémas MLST disponibles pour le typage de <i>C. acnes</i>.^a (McDowell et al., 2011)^b (Lomholt et al., 2010)^c (McDowell et al., 2012a)^d (McDowell et al., 2013).</i>	42
<i>Tableau 4. Vingt protéines constituent le sécrétome commun de <i>C. acnes</i> (Holland et al., 2010).</i>	79
<i>Tableau 5. Epidémiologie microbienne des infections sur prothèse ostéo-articulaires (Tande et al., 2014).</i>	91
<i>Tableau 6. Distribution des espèces bactériennes isolées entre 2002 et 2011 dans les prélèvements ostéo-articulaires réalisés dans les services de chirurgie orthopédique et traumatologique du centre hospitalo-universitaire de Lille, France (Titécat et al., 2013).</i>	93
<i>Tableau 7. Classification des IPOAs à <i>C. acnes</i> selon Lutz et al. (Lutz et al., 2005).</i>	111
<i>Tableau 8. Critères diagnostiques en faveur d'une IPOA à <i>C. acnes</i> selon Asseray et al. (Asseray et al., 2010).</i> 111	
<i>Tableau 9. Antigènes immunogéniques de <i>C. acnes</i> exprimés lors d'une infection chronique d'ostéomyélite de lapin (Achermann et al., 2015).</i>	118
<i>Tableau 10. Phylogénie (sur la base de MLST9) de <i>C. acnes</i> isolé de matériel d'ostéosynthèse rachidien (Spl), de prothèse ostéo-articulaire (PJI) et d'acné (AL) (Aubin et al., 2017b).</i>	124

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Le diagnostic des infections sur matériel ostéo-articulaire (IMOA) repose en grande partie sur le diagnostic microbiologique (Parvizi *et al.*, 2011; Osmon *et al.*, 2013). En effet, même si on peut lire partout qu'il n'existe pas de « gold standard », une microbiologie positive est un argument irréfutable, cliniquement et médico-légalement. Pourtant, le microbiologiste peut être amené à douter des résultats de ses cultures, et la description il y a plus de vingt ans par Tsukayama de diagnostics microbiologiques de découverte fortuite a semé le doute sur la pertinence de certaines cultures (Tsukayama *et al.*, 1996). Dans les infections chroniques évoluant à bas bruit où la clinique est pauvre, nous retrouvons principalement des bactéries peu virulentes communément commensales de la peau, telles que les staphylocoques à coagulase négative et *Cutibacterium acnes*. Ce dernier est le prototype des pathogènes « paucisymptomatiques » et est volontiers associé à ces cas où la clinique est pauvre, la biologie non contributive, et le diagnostic purement microbiologique (Zeller *et al.*, 2007; Butler-Wu *et al.*, 2011a; Renz *et al.*, 2018).

L'optimisation des techniques de culture microbiologique (Minassian *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2015; Peel *et al.*, 2016) a fait augmenter la prévalence des cas d'infections périprothétiques à *C. acnes* (Titécat *et al.*, 2013), et on s'acharne depuis à trouver des biomarqueurs qui corroborent la microbiologie. Les marqueurs de réponse inflammatoire, biochimiques, cellulaires, radiométriques ou sérologiques restent désespérément négatifs et l'infection à *C. acnes* s'apparente à une curiosité bactériologique dissociée du consensus clinico-biologique.

La pratique courante et la revue des dossiers font apparaître une dichotomie entre des cas d'infection cliniquement évidentes, où on est surpris d'isoler *C. acnes* et non un germe réputé virulent, et les cas cliniquement muets, où on isole *C. acnes* alors qu'on pensait confirmer la nature aseptique de la pathologie. L'abondante

AVANT-PROPOS

littérature sur le polymorphisme génétique de *C. acnes* était une piste légitime pour expliquer la divergence clinique de ces infections (Lomholt *et al.*, 2010; McDowell *et al.*, 2012a; Mak *et al.*, 2013; Aubin *et al.*, 2017b).

La variabilité de la présentation clinique des IMOAs à *C. acnes* et des caractéristiques culturelles de *C. acnes* est au cœur de notre problématique et la phylogénie des isolats de *C. acnes* au centre des travaux réalisés pour y répondre. Ainsi, dans la partie « travaux personnels » de ce manuscrit, nous avons tenté d'expliquer la variabilité de la présentation clinique des IMOAs à *C. acnes* par l'étude du lien entre le génotype de *C. acnes* et la réponse immune *in vivo* générée par l'hôte mais aussi par l'étude du pouvoir proinflammatoire intrinsèque d'isolats appartenant à différents génotypes de *C. acnes* à partir d'un modèle *in vitro* d'infection de macrophages humains THP-1.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera dédié à une revue bibliographique autour de *C. acnes* : Dans la première partie, nous rappellerons la classification taxonomique du genre *Cutibacterium*, la phylogénie de *C. acnes*, les différentes techniques de typage moléculaire ainsi que l'habitat naturel de *C. acnes*, sa pathogénie et les différents facteurs expliquant le pouvoir pathogène d'une bactérie initialement commensale de la peau. Après un bref rappel sur les infections sur prothèses ostéo-articulaires (IPOA) - leur épidémiologie microbienne, leur définition et leur classification – les données portant sur la présentation clinique, le diagnostic microbiologie et la physiopathologie des IMOAs à *C. acnes* seront présentées afin de mieux situer la problématique de nos travaux et d'avoir un point de comparaison pour nos résultats. Le deuxième chapitre de ce manuscrit sera consacré à la présentation de nos travaux sous la forme d'articles acceptés, soumis ou en cours de soumission. Chacun des articles sera précédé d'une brève présentation de la problématique, complété si nécessaire par la méthodologie, un complément de résultats et une discussion ciblée sur les résultats obtenus. Enfin,

AVANT-PROPOS

le chapitre final portera sur la conclusion générale et la mise en perspective de nos résultats.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. *Cutibacterium acnes* (anciennement appelé *Propionibacterium acnes*), la bactérie

Propionibacterium acnes a été observé la première fois par Paul Unna en 1896 sur des coupes histologiques de lésions acnéiques (Unna *et al.*, 2010), et cultivé la première fois *in vitro* par Raymond Sabouraud un an plus tard à partir de pustules d'acné.

1. Taxonomie des Propionibactéries

Pendant longtemps, *C. acnes* était classé dans le genre *Corynebacterium*, (*Corynebacterium acnes*) faisant partie du groupe des corynébactéries anaérobies (ex : *Corynebacterium parvum*). La 7^{ème} édition du Bergey's manual séparait en 1957 le genre *Propionibacterium* des corynébactéries anaérobies. Dans la 8^{ème} édition (1971), les corynébactéries anaérobies ont été rattachées au *Propionibacterium*, sur la base de leurs homologues ADN-ADN et leur GC%. Le genre *Propionibacterium* comporte alors 8 espèces : 4 pour les *Propionibacterium*, 4 pour les ex-corynébactéries anaérobies. Toutes ces bactéries ont la particularité de posséder la voie de fermentation acéto-propionique. Toutefois, des différences notables persistent entre elles.

Jusqu'en 2016, *C. acnes* s'appelait *Propionibacterium acnes*. Il appartenait au genre *Propionibacterium* de l'Ordre *Propionibacteriales*, de la classe *Actinobacteria*, du phylum *Acintobacteria*. Dans le genre *Propionibacterium*, on retrouvait : 1) les propionibactéries dites « classiques » soit *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidifaciens*, *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Propionibacterium australiense*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium microaerophilum*,

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Propionibacterium olivae, *Propionibacterium damnosum*, et *Propionibacterium propionicum*. Il s'agissait d'espèces isolées principalement de produits laitiers. 2) les propionibactéries dites "cutanées" : *P. acnes*, *Propionibacterium avidum* et *Propionibacterium granulosum*. Les 3 espèces de ce groupe font partie intégrante du microbiote cutané humain. Une nouvelle espèce cutanée a été proposée par Butler-Wu *et al.* en 2011 (Butler-Wu *et al.*, 2011b). Il s'agit de *Propionibacterium humerusii*, décrit à partir d'un isolat clinique initialement identifié comme *P. acnes* et recueilli dans un prélèvement peropératoire huméral chez un patient opéré pour un descellement de sa prothèse d'épaule. Cette nouvelle espèce n'a jamais été validée taxonomiquement bien que des publications ultérieures valident indirectement l'existence de cette espèce (Brüggemann *et al.*, 2012; Scholz *et al.*, 2016). En 2016, Aubin *et al.* décrivaient une nouvelle espèce dans ce groupe- la cinquième-, *Propionibacterium namnetense* (Aubin *et al.*, 2016). Cette nouvelle espèce a été décrite également à partir d'un isolat clinique initialement identifié comme *P. acnes* et recueilli dans un prélèvement peropératoire d'un patient opéré pour une suspicion d'infection ostéo-articulaire, en l'occurrence une ostéite de tibia sur fixateur externe. Cette nouvelle espèce n'a pas été pour l'instant citée dans d'autres publications. Cependant l'identification de deux nouvelles espèces dans la population de *Propionibacterium* isolées de prélèvements ostéo-articulaires profonds renforce l'idée de la nécessité majeure de mieux étudier la génomique de ce genre dans l'environnement ostéo-articulaire, encore peu méconnue relativement à la population cutanée et acnéique des propionibactéries.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

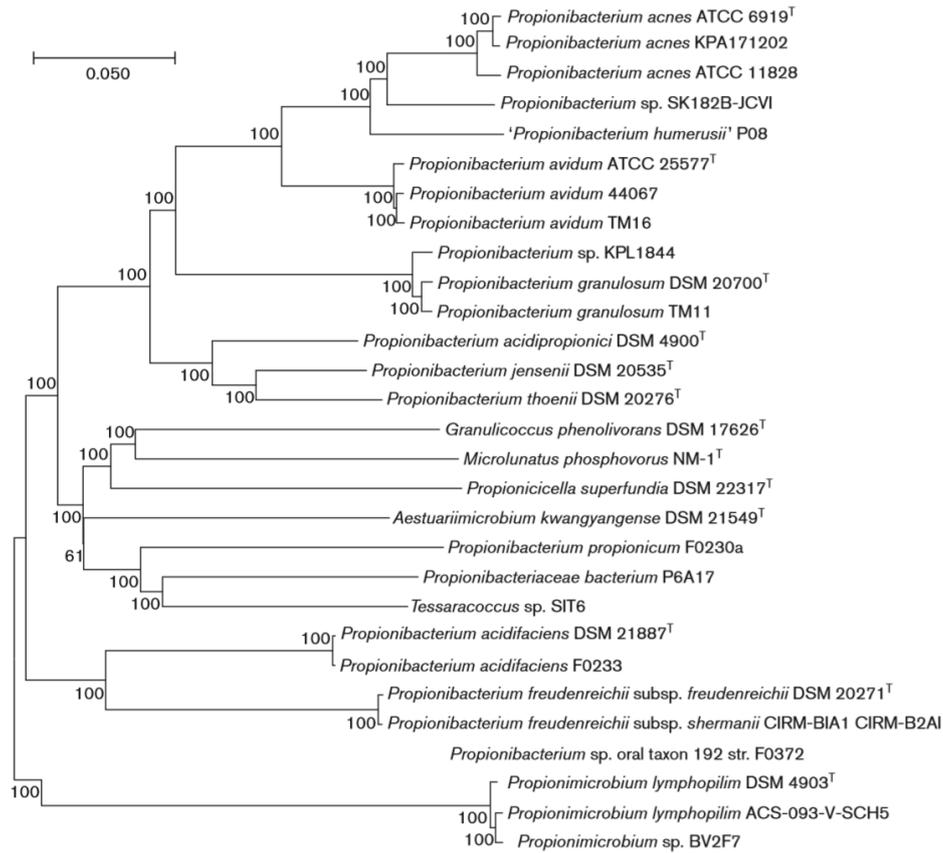


Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur la comparaison de séquences communes de 135 kb (Scholz et al., 2016).

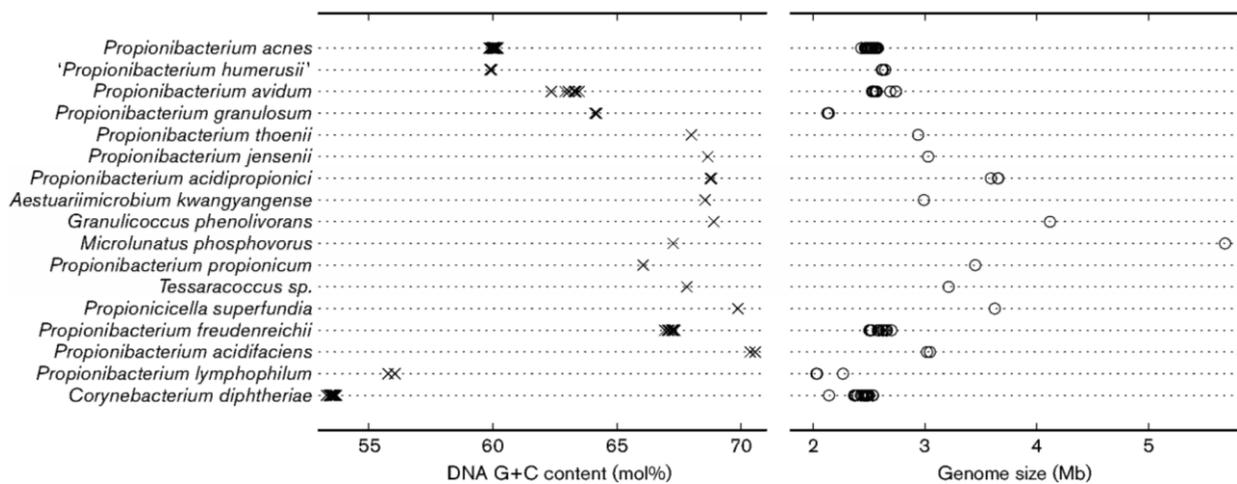


Figure 2. Taille du génome et contenu en GC par espèce (Scholz et al., 2016).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Récemment, Scholz *et al.* ont réussi à mieux expliquer la relation inter-espèces dans le genre *Propionibacterium* à l'aide de l'analyse génomique (Scholz *et al.*, 2016). L'analyse phylogénétique d'une large base de données de séquences communes (135 kb) de plus de 30 génomes a clairement souligné la nature non monophylétique de ce genre et que la classification actuelle ne reflète pas les distances phylogénétiques relative à l'espèce type *P. freudenreichii* (Figure 1). En effet, les travaux de Scholz *et al.* ont montré que les propionibactéries cutanées forment un groupe monophylétique ou clade distinct alors que les propionibactéries dites « classiques » correspondent à deux groupes monophylétiques distincts. Les données concernant le pourcentage de l'appariement GC et la taille du génome renforcent l'idée de séparer le genre en plusieurs clades (Figure 2). En effet, les espèces cutanées avaient un pourcentage d'appariement GC plus bas de 5 à 10% (66.1–70.6 mol%), particulièrement bas pour les espèces *P. acnes* et *P. humerusii*, et une séquence génomique plus petite que les autres propionibactéries, à l'exception de *P. freudenreichii*.

Ainsi, Scholz *et al.* ont proposé de reclasser les espèces de l'ancien genre *Propionibacterium* en 4 genres distincts :

- Le genre *Propionibacterium* comprenant les espèces suivantes : *Propionibacterium freudenreichii* (espèce type), *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Propionibacterium acidifaciens* et *Propionibacterium australiense*.

- Le nouveau genre *Acidipropionibacterium* comprenant les espèces suivantes : *Propionibacterium jensenii* (espèce type), *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium microaerophilum*, *Propionibacterium damnosum* et *Propionibacterium olivae*.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- Le nouveau genre *Cutibacterium* comprenant les espèces suivantes : *Propionibacterium acnes* (espèce type), *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum* et *Propionibacterium humerusii*.
- le nouveau genre *Pseudopropionibacterium* comprenant une seule espèce : *Propionibacterium propionicum* (espèce type).

A noter que les espèces du nouveau genre *Propionibacterium* sont caractérisées par l'acide méso-2,6-diaminopimélique comme acide aminé diagnostique dans le peptidoglycane, le genre *Acidipropionibacterium* par l'acide ll-2,6-diaminopimélique (Goodfellow *et al.* 2012), le genre *Cutibacterium* par l'acide ll-2,6-diaminopimélique avec certaines souches utilisant l'acide méso-2,6-diaminopimélique.

Cette nouvelle reclassification de l'ancien genre *Propionibacterium* est maintenant largement reconnue et utilisée par la communauté scientifique. On parlera désormais de *Cutibacterium acnes* et non de *Propionibacterium acnes*.

Des auteurs ont tenté de classer l'espèce *C. acnes* en différentes sous espèces sur la base de résultats de typage moléculaire et de microscopie électronique :

En 2015, Dekio *et al.* ont proposé que les différents phylotypes de *C. acnes* – définis ultérieurement dans le manuscrit- correspondent à des sous-espèces différentes : les phylotypes I et II de *C. acnes* correspondent à une première sous-espèce *P. acnes subsp. acnes* et que le phylotype III correspond à la sous-espèce *P. acnes subsp. elongatum* (Dekio *et al.*, 2015). En 2016, McDowell *et al.* ont proposé en plus de séparer les phylotypes I et II, en *C. acnes subsp. acnes* et *C. acnes subsp. defendens*, respectivement, sur la base de différences phylogénétiques, mais aussi sur un

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

pourcentage d'hybridation ADN-ADN inférieur à 80 % entre les deux types (McDowell *et al.*, 2016).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

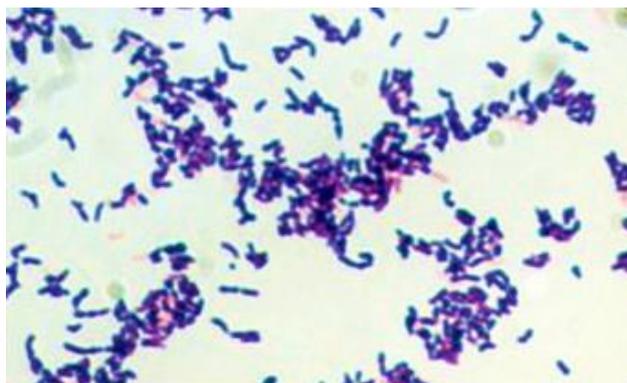


Figure 3. *Cutibacterium acnes* sur une coloration de Gram (x1000)



Figure 4. Culture de 5 jours de *Cutibacterium acnes* sur une gélose COS à 35°C en anaérobiose

Tableau 1. Caractéristiques phénotypiques discriminantes des différentes espèces de l'ancien genre *Propionibacterium* sp. (Kusano *et al.*, 1997; Aubin *et al.*, 2016).

Bactéries	Acidification		Hydrolyse de l'esculine	Production d'indole	Réduction des nitrates	Hydrolyse de la gélatine	Hémolyse
	Sucrose	Maltose					
<i>C. acnes</i>	-	-	-	+	+	+	d
<i>C. avidum</i>	+	+	+	-	-	+	+
<i>C. granulosum</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. freudenreichii</i>	-	-	+	-	d	-	-
<i>A. jensenii</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>A. thoenii</i>	+	+	+	-	-	-	+
<i>A. acidipropionici</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>A. lymphophilum</i>	d	+	-	-	d	-	-

+ : 90 % ou plus de souches positives ; - : 90 % ou plus de souches négatives ; d : 11-89 % de souches positives.

2. Caractéristiques générales de *Cutibacterium acnes*

2.1. Caractéristiques biochimiques et culturales

C. acnes, comme toutes les espèces des Propionibactéries est un bacille à Gram positif non sporulé anaérobie aérotoleérant. Les bacilles peuvent s'observer isolés, en paires, groupes ou le plus souvent branchés (Figure 3).

C. acnes produit de l'acide lactique, l'acide propionique et l'acide acétique à partir du glucose. La présence d'acide acétique et d'acide propionique, détectés par chromatographie en phase gazeuse, est caractéristique de cette bactérie. En l'absence de glucose, la majorité des souches sont catalase positive et indole positive (capable de convertir le tryptophane en indole) (Kusano *et al.*, 1997; Aubin *et al.*, 2016) (Tableau 1). *C. acnes* réduit les nitrates en nitrites. En fonction de la capacité à fermenter le ribose, l'érythrol et le sorbitol, cinq biotypes différents ont été identifiés (Kishishita *et al.*, 1979).

La croissance de *C. acnes* est optimale en présence de moins de 21% d'oxygène. *C. acnes* peut cultiver sur différents milieux de culture, aussi bien solides (gélose au sang, gélose au sang cuit) que liquides (B.H.I ou Bouillon Cœur cerveau, milieu Schaedler, ou les flacons d'hémocultures) en anaérobiose ou en aérobie avec 5% de CO₂. Les colonies sur gélose au sang à plus de 72 heures de culture sont de 1 à 2 mm de diamètre, circulaires, opaques, jaunâtres légèrement en pointe (Figure 4) (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). Il s'agit d'un germe à croissance lente, plus lente que les bactéries anaérobies stricts, avec un temps de division d'environ 5 heures (Hall *et al.*, 1994). La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C alors que le pH optimal se situe entre 6.0 et 7.0 (Korting *et al.*, 1992).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

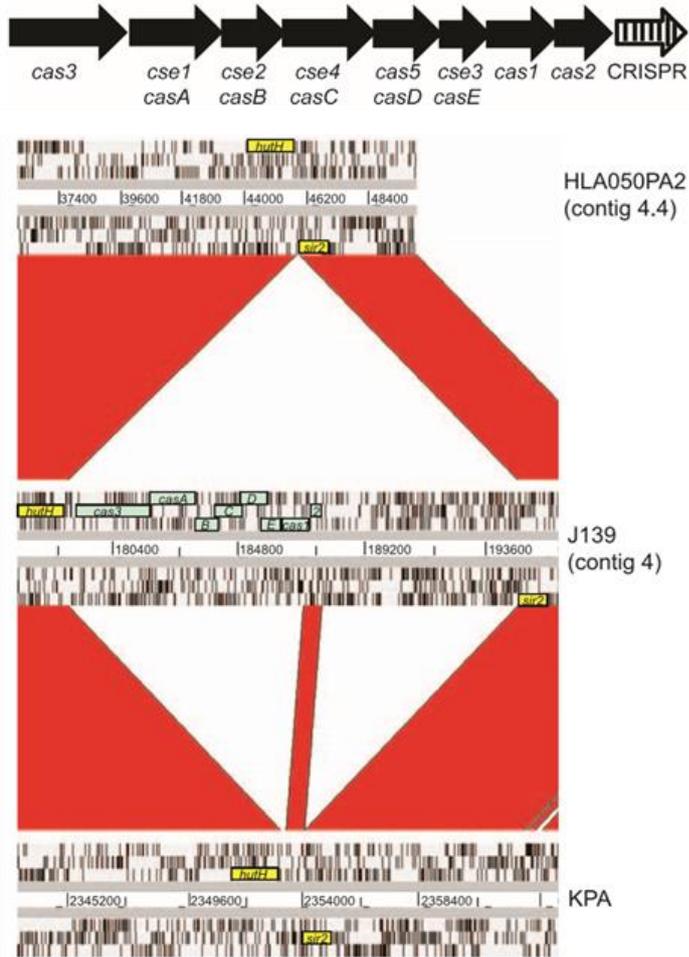


Figure 5. Le système CRISPR/ cas dans *Cutibacterium acnes* présent dans le phylotype II et III (Brüggemann *et al.*, 2012).

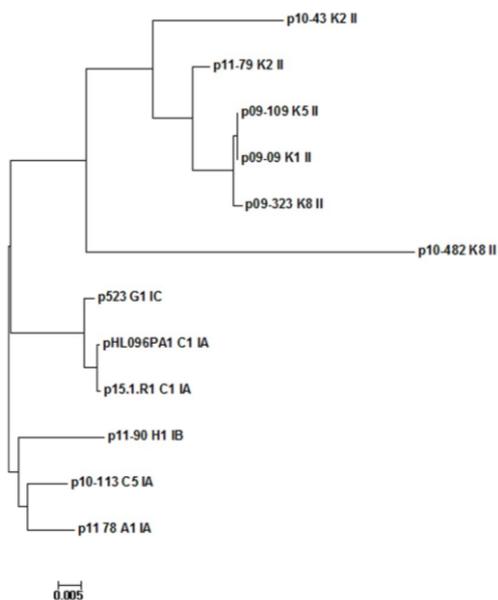


Figure 6. Phylogénie des plasmides isolés dans des souches de *Cutibacterium acnes* de phylotypes différents (Davidsson *et al.*, 2017).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.2. Caractéristiques génétiques

Le génome de *C. acnes* a été séquencé pour la première fois en 2004 par Brüggeman *et al.* (Brüggemann *et al.*, 2004). Depuis, plus de 190 génomes ont été séquencés partiellement ou totalement. Aujourd'hui, on sait que la taille du génome de *C. acnes* est de 2,5 Mpb qui code pour en moyenne 2577 cadres de lecture. Le taux de GC est de 60 %. La population de *C. acnes* reste très clonale avec un génome qui montre une grande stabilité. La partie variable du génome de *C. acnes* représente environ 15 % du génome entier (Tomida *et al.*, 2013).

Seules les souches de phylotype II et III possèdent le système CRISPR/cas (Brüggemann *et al.*, 2012). Ce système immunitaire adaptatif de découverte récente est composé de courtes séquences palindromiques répétées (CRISPR) et de gènes associés (*cas*). Ceci confère aux isolats une résistance à l'acquisition aux éléments génétiques mobiles tels que les phages, les plasmides et les transposons. Ceci peut être à l'origine de la diversité observée dans des régions génétiques des souches appartenant exclusivement au phylotype I (Figure 5).

Un plasmide de grande taille a été détecté dans des isolats de type I et de type II de *C. acnes*. La taille du plasmide (de 47 kb à 57 kb) ainsi que le contenu en GC% (61,7 % à 63 %) varie d'une souche à l'autre (Davidsson *et al.*, 2017). Les plasmides présentent de grandes similarités et seraient linéaires. Ils seraient présents d'une façon inconstante aussi bien dans les isolats de type I et de type II. Pour l'instant, aucun plasmide n'a été détecté dans des isolats de type III. Le plasmide présent dans les isolats de type II de *C. acnes* serait différent du plasmide présent dans le type I. La phylogénie des plasmides serait corrélée à celle du phylotype de l'isolat (Figure 6) (Davidsson *et al.*, 2017). La fréquence du *tad* (tight adhesion) locus, identifié dès la

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

première description d'un plasmide chez *C. acnes* (Kasimatis *et al.*, 2013), serait différente en fonction du phylotype concerné (Davidsson *et al.*, 2017). Ce locus a été démontré comme responsable chez d'autres bactéries de la production de pili (Tomich *et al.*, 2007). Il jouerait ainsi un rôle dans la capacité de la bactérie à améliorer son adhérence et sa capacité à former un biofilm (Kachlany *et al.*, 2000; Schreiner *et al.*, 2003).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

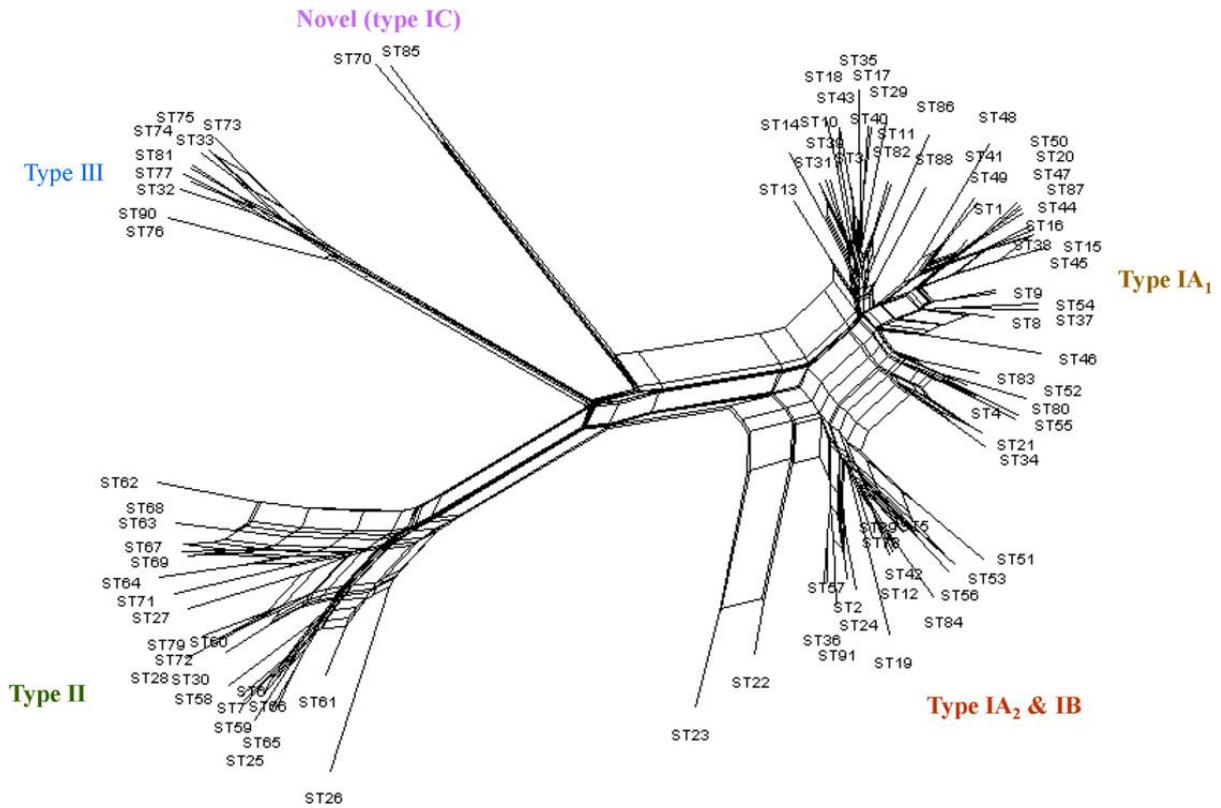


Figure 7. Split tree construit sur la base des profils alléliques de 91 isolats de *C. acnes* appartenant à des STs distincts obtenus après génotypage de 285 isolats selon le schéma MLST8 (McDowell *et al.*, 2012a).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Différents types de *C. acnes*

3.1. Historique

Au fil des années, l'arbre phylogénétique de *C. acnes* a évolué constamment avec l'évolution des diverses techniques de typage moléculaire.

Historiquement, *C. acnes* a été classé en deux groupes distincts : Type I et Type II, sur la base de tests d'agglutination sérologique et d'analyse de sucres composant la paroi bactérienne (Cummins *et al.*, 1973). En 2005, un sous-groupe phylogénétique du type I présentait des caractéristiques atypiques par la technique de typage par anticorps monoclonaux (mAb). L'analyse des séquences nucléotidiques *recA* a confirmé que les types I et II constituent bien deux groupes phylogénétiques distincts (McDowell *et al.*, 2005) et a permis la dichotomie du type I en deux sous-groupes distincts : IA et IB. En 2005, 3 phylotypes de *C. acnes* existent : type IA, IB, et II. En 2011, le schéma MLST proposé par McDowell *et al.* a permis de diviser le phylotype IA en IA1 et IA2 (McDowell *et al.*, 2011). Le phylotype III a été rapporté en 2008, sur la base de ses caractéristiques morphologiques, moléculaires et d'immunofixation (mAb) atypiques (McDowell *et al.*, 2008). Le phylotype IC a été identifié à partir du séquençage du génome complet d'une souche acnéique de *C. acnes* résistante aux cyclines et à la clindamycine (McDowell *et al.*, 2012b).

Aujourd'hui, la population globale de *C. acnes* est divisée en six phylotypes distincts : IA1, IA2, IB, IC, II et III (Figure 7).

3.2. Différentes techniques de typage

3.2.1. Les premières techniques

Les premières techniques développées pour distinguer les différents groupes de *C. acnes* étaient basées sur l'immunofluorescence avec des anti-séras polyclonaux

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

(Holmberg *et al.*, 1973), sur la sensibilité aux bactériophages (Webster *et al.*, 1978), ainsi que sur la capacité de fermentation de plusieurs sucres notamment le ribose, le sorbitol et l'érythrol (Kishishita *et al.*, 1979).

3.2.2. Techniques de typage "band-based"

a) Repetitive-sequence-based PCR (Diversilab)

La technique Rep-PCR (Diversilab) a été mise au point et développée par bioMérieux pour *C. acnes*. Elle est basée sur l'amplification par PCR de plusieurs séquences répétitives et non codantes du génome. Les produits d'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse et le profil électrophorétique obtenu pour chaque souche permet de comparer les souches entre elles. Cette technique a été évaluée sur des isolats cliniques de *C. acnes* d'origines diverses et semble avoir un pouvoir discriminant satisfaisant (Davidsson *et al.*, 2012; Aubin *et al.*, 2017b) pour IA,IB,IC,II et III mais ne permet pas de discriminer IA1 et IA2. Cependant, cette technique n'est plus commercialisée.

b) La technique RAPD (Random Amplification Amplified Polymerase DNA)

La technique RAPD, appliquée en 2003 à *C. acnes*, fait partie des premières techniques moléculaires développées pour le typage de cette bactérie (Perry *et al.*, 2003). Bien qu'elle présente l'avantage de ne nécessiter aucune connaissance moléculaire de *C. acnes*, cette technique présente aujourd'hui peu d'intérêt en raison de son manque de reproductibilité et surtout sa capacité de distinguer uniquement le phylotype I et II (Cebrián *et al.*, 2017).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

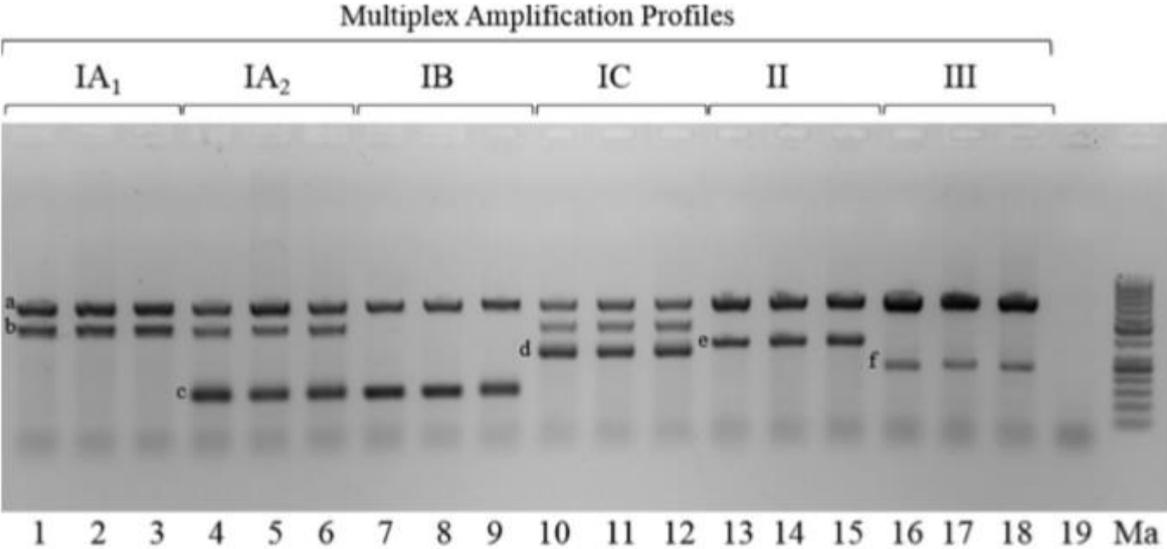


Figure 8. Profils obtenus par analyse par PCR multiplexe de souches de *C. acnes* représentant les différents phylotypes connus (Barnard *et al.*, 2015).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

c) L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Cette technique a été développée la première fois pour *C. acnes* en 2005 (Oprica *et al.*, 2005). Elle permet de classer la population globale de *C. acnes* en 4 groupes distincts. Elle permet de différencier les phylotypes IA, IB, II et III (Lomholt *et al.*, 2010). En plus d'être une technique, lourde, peu reproductible, nécessitant des moyens techniques et humains importants, elle ne permet pas de distinguer les phylotypes IA1 et IA2. De plus, aucun consensus n'existe sur la dénomination des groupes PFGE. Cette technique est exceptionnellement utilisée pour *C. acnes* (Nakase *et al.*, 2014).

d) PCR multiplexe

En 2015, Barnard *et al.* ont développé une technique de PCR multiplexe pour le typage de *C. acnes* (Barnard *et al.*, 2015). Cette technique est basée sur l'amplification simultanée de six loci et la migration de leurs produits de PCR (Figure 8). Le choix des 6 loci était basé sur les connaissances obtenues grâce à la technique MLST et le séquençage complet de plusieurs génomes de *C. acnes*. Les 6 loci amplifiés se situent dans des régions codantes :

- l'ARNr16S, commun à tous les phylotypes de *C. acnes*.
- *recA*, gène de ménage, dont la séquence amplifiée est spécifique du phylotype III
- *sodA*, gène codant la superoxyde dismutase A, dont la séquence amplifiée est spécifique des phylotypes IA2 et IB
- *ATPase*, ABC-type peptide uptake operon, présent chez les souches de phylotypes IA1, IA2 et IC.
- *AtpD*, gène de ménage, dont la séquence amplifiée est spécifique du phylotype II.

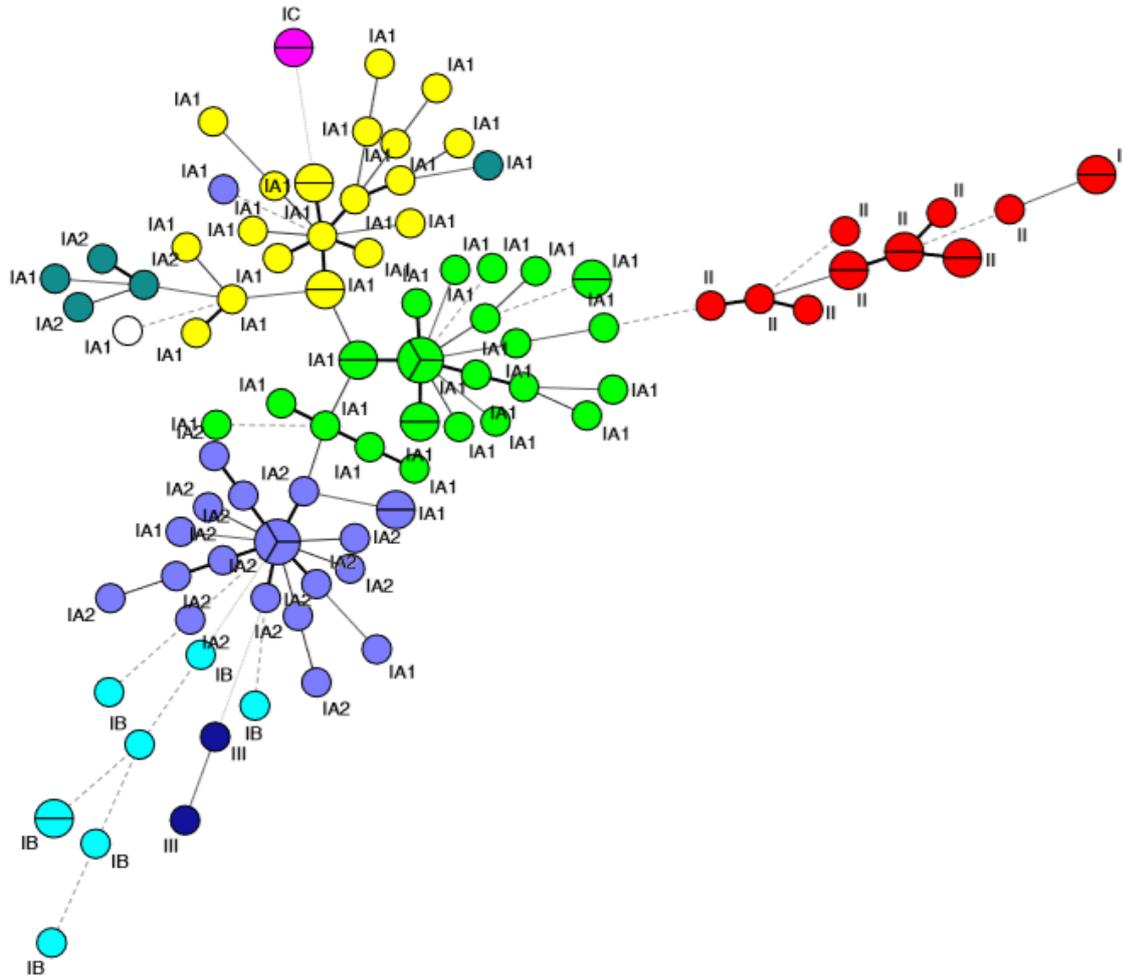


Figure 9. **Spanning tree construit par une analyse MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) de 102 isolats de *C. acnes* (Hauck et al., 2015).**

Arbre construit sur la base de l'analyse *in silico* de 102 isolats de *C. acnes*. Une couleur identique est attribuée aux isolats appartenant au même phylotype. La taille du cercle et le nombre de barres correspondent aux échantillons possédant le même génotype. Le phylotype obtenu par MLST8 est indiqué à côté de chaque échantillon.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- Toxine de la famille Fic, faisant partie du système toxine/antitoxine, présente uniquement chez les souches de phylotype IC.

L'amplification combinée de 5 loci spécifiques à un ou deux phylotypes – le locus ARNr16S étant commun à tous les phylotypes- permet d'avoir un profil de migration spécifique par phylotype. Le profil de migration obtenu permet ainsi d'attribuer un phylotype à chacun des isolats. Pendant longtemps, jusqu'à l'avènement du SLST (Single-Locus Sequence Typing), cette technique a été considérée comme la plus efficiente (coût et temps technique les plus réduits). Aujourd'hui, elle reste une bonne alternative au SLST pour les laboratoires ne disposant pas de moyens techniques de séquençage.

e) [MLVA ou Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis](#)

La technique MLVA est une méthode de typage bactérien basée sur les VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) présents à différents loci. Ces loci hypervariables correspondent à des séquences courtes répétées d'ADN qui varient d'une souche à l'autre au sein d'une même espèce bactérienne. Un schéma MLVA de *C. acnes* basé sur l'analyse de 13 VNTRs (MLVA₁₃) a été proposé par Hauck *et al.* (Hauck *et al.*, 2015). Ce schéma inclut 10 grands VNTRs de 14 à 31 pb et 3 petits VNTRs de 6 pb. La technique MLVA génère un profil allélique correspondant au nombre de répétitions à chaque locus permettant de déduire un numéro global pour le type MLVA. Les VNTRs sélectionnés pour *C. acnes* se situent dans des régions intergéniques et dans des gènes codant des adhésines, des PLP, des protéines liant le fibrinogène ... Avec le schéma MLVA13, les résultats de typage (Figure 9) étaient, à quelques exceptions près, concordants avec les résultats phylogéniques basés sur

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

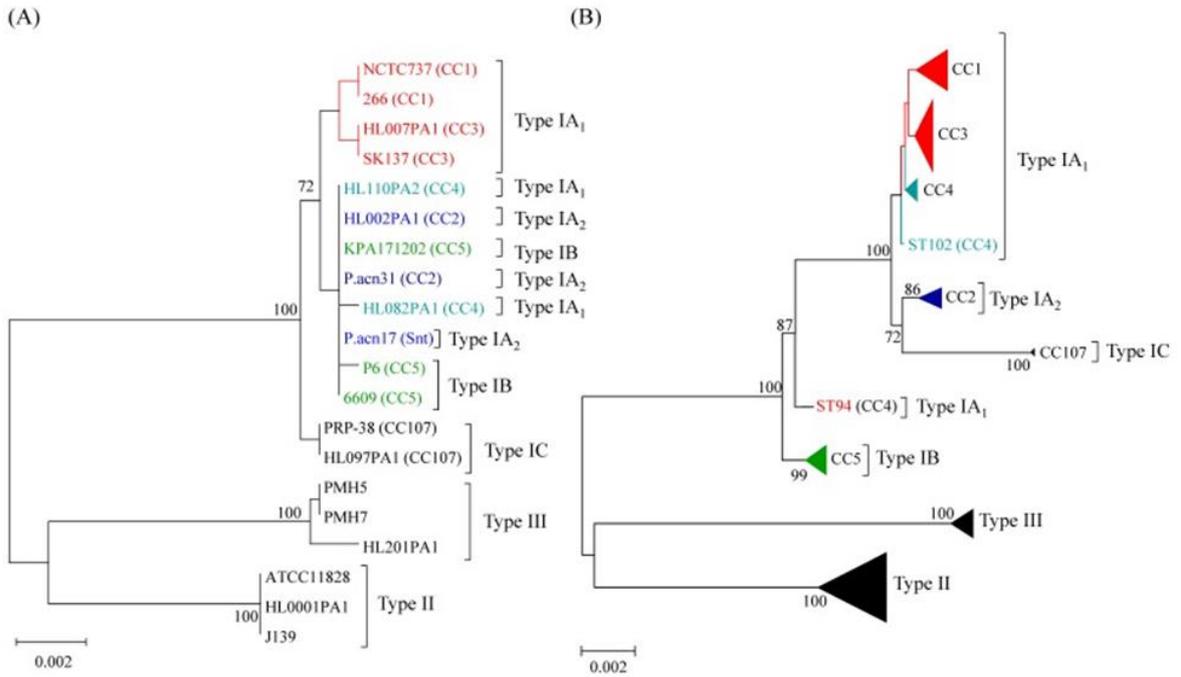


Figure 10. **Arbre phylogénique construit sur la base des séquences concaténées de la *recA* et l'hémolysine *tly*(1824 pb)(A) et le séquences concaténées des gènes du MLST8 (4235 pb) (McDowell, 2017).**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

l'analyse du génome complet de 102 isolats de *C. acnes*. Les rares difficultés de discrimination étaient uniquement observées entre des isolats de phylotype IA1 et IA2.

Le principal avantage de cette technique est son coût faible, sa facilité de réalisation mais les limites de cette technique restent la reproductibilité et la stabilité des marqueurs VNTRs qui restent à évaluer par d'autres équipes. A notre connaissance, aucune équipe n'a utilisé à ce jour ce schéma pour le typage de *C. acnes*.

3.2.3. Les techniques de typage « sequence-based »

a) *recA/tly*

Le typage de *C. acnes* par le séquençage de la *recA* et/ou *tly* a été proposé en 2005 par McDowell *et al.* (McDowell *et al.*, 2005). Il a été largement utilisé par les différentes équipes car contrairement aux premières techniques moléculaires proposées, il s'agissait de techniques reproductibles, ne nécessitant pas de moyens humains et techniques spécifiques. Son utilisation a permis assez rapidement de mieux comprendre la phylogénie de *C. acnes* et de confirmer certaines différences phénotypiques. Cependant, l'avènement des nouvelles techniques de typage, notamment le MLST, a pointé les failles du typage par *recA* et *tly* : Ces derniers ne permettent pas en effet de distinguer certains isolats de type IB de certains isolats du type IA1 (CC4-MLST8 ; CC31-MLST9) et du type IA2 (McDowell, 2017) (Figure 10). Cette « confusion » peut être expliquée en grande partie par des événements de transfert horizontaux et des événements de recombinaison homologue ayant lieu dans la région où se situent la *recA* et *tly*, notamment dans la sous population de *C. acnes* appartenant au type I. Malgré cette limite, le séquençage de *recA* et *tly* pourrait être

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

considéré comme une technique de typage pour les isolats de *C. acnes* appartenant aux phylotypes II, IC et III.

Tableau 2. **Corrélation entre ribotypes, phylotypes et complexes clonaux obtenus par les schémas MLST8 et MLST9 (McDowell, 2017).**

		MLST ₈	MLST ₉
Ribotype	Phylogroup	Clonal Complex	Clonal Complex
1, 5, 532	IA ₁	CC1	CC18
1, 4, 5	IA ₁	CC3	CC3
8	IA ₁	CC4	CC31
3, 16	IA ₂	CC2	CC28
1	IB	CC5	CC36
5	IC	CC107	Singletons
2, 6	II	CC6/CC72	CC60
9	III	CC77	ND

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

b) Le ribotypage

Un schéma de ribotypage pour *C. acnes*, basé sur l'analyse de l'ARNr 16S (~1450 pb) a été décrit par Fitz-Gibbon *et al.* en 2013 (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013). Un seul SNP permet de définir un nouveau ribotype, sachant qu'une étude génomique par la méthode Sanger, sur des ADN poolés à partir d'unités pilo-sébacées de nez de sujets acnéiques et sains a mis en évidence la présence de plus de 11000 ribotypes différents de *C. acnes*, bien qu'une proportion restreinte de ribotypes paraisse être prédominante. Bien que le gène codant pour l'ARNr 16S corresponde à une région hautement conservée au sein d'une même espèce, le ribotypage de *C. acnes* permet de distinguer les phylotypes I, II, et III entre eux ; de différencier le phylotype IA1 du phylotype IA2. Cependant, la principale limite de cette technique est qu'elle ne permet pas de distinguer les phylotypes IB et IC : Ces derniers appartiennent aux ribotypes 1 et 5, respectivement, des ribotypes partagés également par des isolats du phylotype IA1 (Tableau 2).

c) MLST (Multi-Locus Sequence Typing)

Le typage MLST ou Multi-Locus Sequence Typing a été considéré depuis le début des années 2000 comme la technique la plus appropriée pour établir un lien entre des clones au sein d'une espèce bactérienne et des pathologies données, toutes espèces bactériennes confondues. La méthode MLST est basée sur l'analyse de la séquence nucléotidique de plusieurs loci, le plus souvent situés dans des gènes de ménage. La combinaison du profil allélique de l'ensemble des loci permet de déterminer le séquence type (ST) d'une souche bactérienne. Ainsi, les arbres phylogénétiques et les complexes clonaux (CCs) sont construits pour illustrer les distances génétiques existant entre les différents STs et identifier les sous-groupes, respectivement. Cette méthode fournit des résultats pertinents et reproductibles permettant d'évaluer la

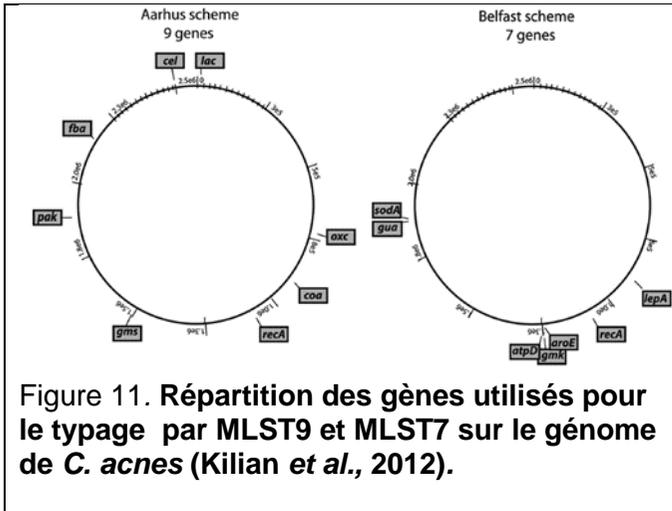


Figure 11. Répartition des gènes utilisés pour le typage par MLST9 et MLST7 sur le génome de *C. acnes* (Kilian *et al.*, 2012).

Tableau 3. Tableau récapitulatif des différents gènes séquencés dans les différents schémas MLST disponibles pour le typage de *C. acnes*. ^a(McDowell *et al.*, 2011)^b(Lomholt *et al.*, 2010) ^c(McDowell *et al.*, 2012a) ^d(McDowell *et al.*, 2013).

MLST7 ^a		MLST9 ^b		MLST8 ^c		MLST4 ^d	
<i>aroE</i>	Shikimate 5-déhydrogénase	<i>cel</i>	régulateur de transcription <i>celR</i>	<i>aroE</i>	Shikimate 5-déhydrogénase	<i>aroE</i>	Shikimate 5-déhydrogénase
<i>atpD</i>	ATP synthase (chaîne β)	<i>coa</i>	O-succinylbenzoate-CoA synthase	<i>atpD</i>	ATP synthase (chaîne β)	<i>guaA</i>	GMP synthase
<i>gmk</i>	Guanylate kinase	<i>fba</i>	Fructose bisphosphate aldolase	<i>gmk</i>	Guanylate kinase	<i>tly</i>	hémolysine putative
<i>guaA</i>	GMP synthase	<i>gms</i>	Glutamyl-tRNA synthétase	<i>guaA</i>	GMP synthase	<i>camp2</i>	homologue <i>camp2</i>
<i>lepA</i>	protéine liant la GTP	<i>lac</i>	L-lactate déhydrogénase	<i>lepA</i>	protéine liant la GTP		
<i>sodA</i>	Superoxyde dismutase	<i>oxc</i>	Cytochrome C oxydase sous-unité II	<i>sodA</i>	Superoxyde dismutase		
<i>recA</i>	Recombinase A	<i>pak</i>	Pantothénate kinase	<i>tly</i>	hémolysine putative		
		<i>recA</i>	Recombinase A	<i>camp2</i>	homologue <i>camp2</i>		
		<i>zno</i>	Alcool déhydrogénase Zn-dépendante				

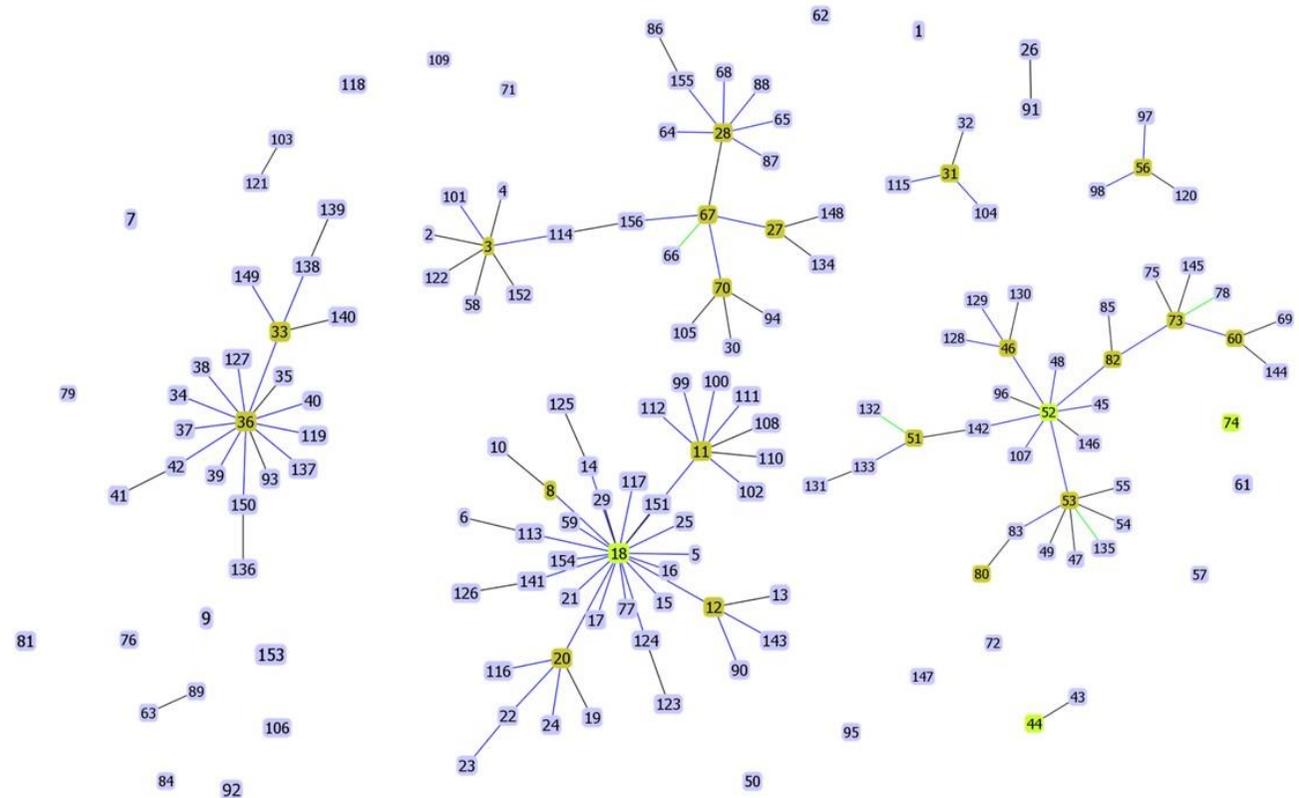


Figure 12. Snapshot de la population de *C. acnes* (par goeBURST) sur la base des données actuelles du MLST9 contenant 156 STs différents.

Analyse faite par le logiciel Phyloviz 2.0 utilisant l'algorithme goeBurst –tiebreak level TLV (triple locus variant). Les STs colorés en vert clair correspondent au ST « group founder », les STs colorés en vert foncé correspondent au ST « subgroup founder ». Les lignes noires sont tracées sans avoir recours au tiebreak rule, les bleues en ayant recours à la règle tiebreak n°1 (nombre de SLV ou single locus variant), les jaunes en ayant recours à le règle tiebreak n°2 (nombre de DLV ou double locus variant).

relation épidémiologique entre différents isolats cliniques mais aussi de constater l'évolution dynamique d'une population bactérienne globale. Cependant, le MLST présente quelques inconvénients: les limites principales sont le coût et le temps requis pour obtenir les résultats, en particulier si le typage de multiples isolats est requis. Par ailleurs, une petite partie du génome (environ 1/1000^{ème}) est interrogé par cette technique et la capacité de discrimination lorsque la question de la clonalité de souches spécifiques est posée n'est pas parfaite. Le MLST permet de considérer les relations entre larges groupes bactériens et est plus adapté à l'étude des populations bactériennes qu'à l'épidémiologie clinique.

Différents schémas MLST ont été proposés pour *C. acnes* par deux équipes : En 2010, Lomholt *et al.* ont proposé le premier schéma MLST pour *C. acnes* (schéma Aarhus) : 9 gènes de ménage sont ciblés par ce schéma (MLST9) (Lomholt *et al.*, 2010). (Tableau 3) correspondant à une séquence nucléotidique de 4233 pb. Tous les STs décrits par ce schéma sont disponibles sur le site MLST (<http://www.mlst.net/>). En janvier 2019, 156 STs (dont 17 nouveaux décrits grâce aux travaux personnels rapportés dans ce manuscrit) ont été décrits avec ce schéma : 21 STs correspondent à des singletons, 8 STs sont reliés en cluster de 2 STs (4 clusters) et les 127 STs restants sont répartis sur 6 CCs (CC18, CC53, CC36, CC31, CC28 et CC56). A noter que les CC18, CC28, CC36 et CC53 comportent 121 STs sur les 127 (Figure 12). En 2011, McDowell *et al.* ont proposé un deuxième schéma MLST basé sur le séquençage partiel de 7 gènes de ménage (MLST7) (McDowell *et al.*, 2011) (Tableau 3). Un seul gène (*recA*) est commun aux deux schémas. Le premier s'est révélé plus discriminant avec des gènes couvrant la majorité du génome, contrairement au second qui ne couvre que la moitié du génome (Figure 11). Pour améliorer le pouvoir

discriminant de leur schéma, McDowell *et al.* ont proposé un nouveau schéma MLST basé sur l'analyse de 8 gènes (MLST8), correspondant à une séquence nucléotidique de 4253 pb (McDowell *et al.*, 2012a). Ce nouveau schéma est basé sur l'analyse des séquences nucléotidiques de 6 gènes de ménage et de 2 gènes de virulence (hémolysine, *tly* et camp factor, *camp*) (Tableau 3). Ce nouveau schéma permettait notamment de bien distinguer le type IC et de différencier les phylotypes IA1 et IA2. La banque de données MLST8, inaccessible au public, comprendrait en 2017, 127 STs différents répartis dans 9 CCs avec 19 singletons. La même équipe a proposé ultérieurement un schéma à 4 gènes basé sur l'analyse partielle de séquences de deux gènes de ménage (*aroE*; *guaA*) et deux gènes de virulence (*tly*; *camp2*) aussi discriminant que le schéma MLST8 (McDowell *et al.*, 2013). Ce schéma n'a pas été depuis validé par des études cliniques.

La technique MLST a permis : i) d'identifier le complexe clonal CC18 comme dominant dans l'acné (Lomholt *et al.*, 2010) ii) d'associer les CC53/60 et CC36 au cancer de la prostate (Mak *et al.*, 2013) et ii) de décrire une diversité importante de *C. acnes* isolés d'échantillons cliniques de patients atteints de sarcoïdose avec une surreprésentation du ST26 (Belfast scheme, MLST8) (Minegishi *et al.*, 2015).

Aujourd'hui, environ une quinzaine d'articles rapportent l'utilisation de la technique MLST pour le typage de leurs isolats et la majorité utilise le schéma MLST9 proposé par Lomholt *et al.* Un consensus sur un schéma unique de MLST serait le bienvenue pour une meilleure comparaison des données entre les différentes études (Dagnelie *et al.*, 2018a).

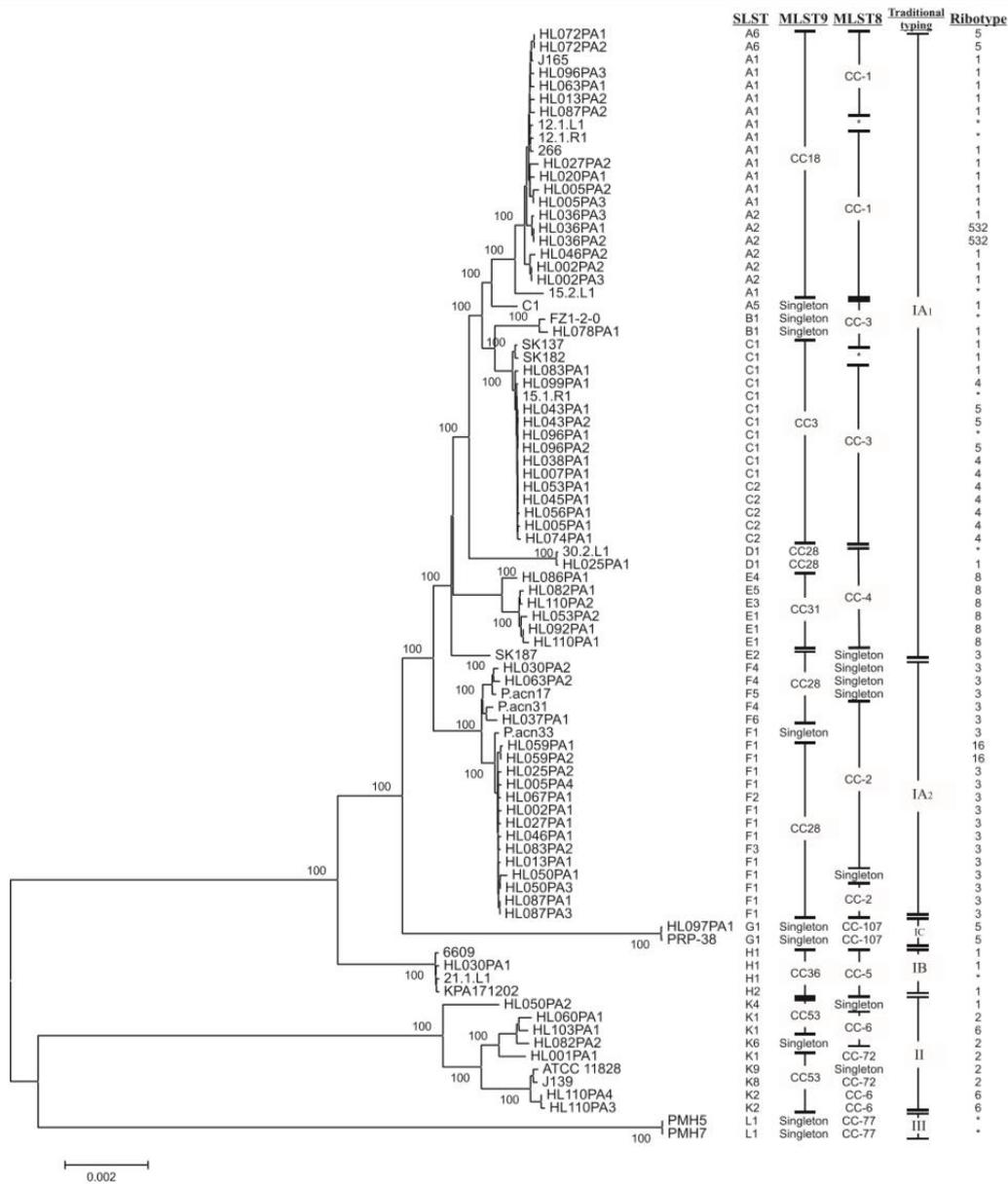


Figure 13. Le SLST ou Single Locus Sequence Typing permet de différencier les groupes phylogénétiques de *C. acnes* (Scholz *et al.*, 2014).

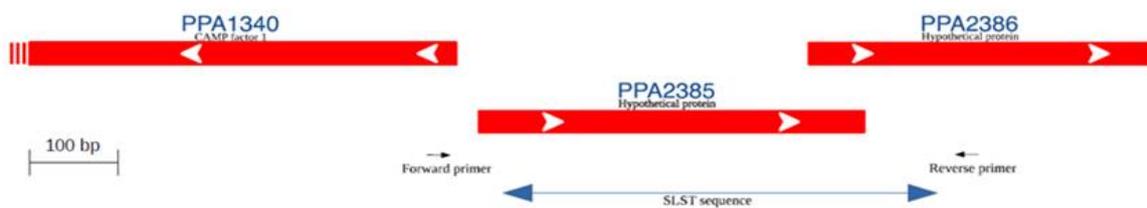


Figure 14. Localisation du fragment SLST sur le génome de *C. acnes* KPA121702 (Scholz *et al.*, 2014).

d) SLST (Single-Locus Sequence Typing)

Cette nouvelle technique, mise au point par Scholz *et al.* en 2016 paraît être une technique très intéressante pour le typage moléculaire de *C. acnes* (Scholz *et al.*, 2014). En effet, en se basant sur l'analyse de séquence d'un seul locus, cette technique permet de déterminer le SLST type de l'isolat en soumettant la séquence obtenue à la banque de données des différents SLST types décrits disponible sur <http://medbac.dk/slst/pacnes>. A ce jour, 143 SLST types ont été décrits. Le SLST type permet de déduire le phylotype auquel l'isolat appartient. Cette technique permet de distinguer tous les phylotypes actuellement décrits (IA-1, IA-2, IB-1, IB-2, IB-3, IC, II et III) (Figure 13). En plus, elle est la seule méthode (à l'exception du ribotypage) à pouvoir identifier différents types de *C. acnes* à partir du même mélange sans qu'il soit nécessaire de cultiver la bactérie (extraction directe de l'ADN à partir de l'échantillon), point très important pour *C. acnes* connu pour être difficile à cultiver (Scholz *et al.*, 2014; Dagnelie *et al.*, 2018b). Bien qu'il s'agisse d'une technique récente, de plus en plus d'articles utilisent cette technique innovante pour caractériser leurs isolats cliniques de *C. acnes*, notamment quand il s'agit d'études impliquant une large collection d'isolats de *C. acnes* (Davidsson *et al.*, 2017; Lomholt *et al.*, 2017; Dagnelie *et al.*, 2018b). La séquence étudiée par cette technique se situe immédiatement en amont du gène codant le facteur CAMP 1 (PPA1340) et chevauche en partie sur un gène codant une protéine hypothétique (Figure 14). Elle a été choisie en se basant sur l'analyse *ex silico* de 1 923 100 fragments de séquences nucléotidiques correspondants au core génome de 86 génomes de *C. acnes*.

e) Typage par séquençage complet du génome (WGS ou whole genome sequencing)

Le typage par MLST de *C. acnes* est concordant avec les résultats d'analyse du génome complet. Contrairement au typage MLST basé sur 8 ou 9 loci pour *C. acnes*, le WGS offre la possibilité de développer des schémas de MLST (cgMLST) basés sur le core génome, ou même sur le génome entier (wgMLST), où tous les locus (core genome et gènes accessoires) sont comparés. Ceci est basé sur l'assemblage *de novo* de séquences par rapport à un génome de référence. En tant qu'alternative à l'approche gène par gène, l'étude phylogénétique de la population globale de *C. acnes* peut se faire par l'analyse des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) sur le core génome. Cette analyse permet d'avoir un pouvoir résolutif important mais nécessite une séquence de référence.

Aujourd'hui, 191 génomes de *C. acnes* sont référencés (*Cutibacterium acnes*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=acnes>). Ceci a permis de créer des arbres phylogénétiques basés sur le génome entier aussi bien par une analyse SNP ou cgMLST. A l'heure actuelle, le séquençage du génome entier n'est utilisé ni dans la routine de la microbiologie clinique ni comme technique de typage mais la baisse rapide du prix du séquençage nouvelle génération (NGS ou next generation sequencing) comparé au prix constant et élevé de la technique MLST à 8 ou 9 gènes, feront que les investigations épidémiologiques bactériologiques pourront s'effectuer de plus en plus fréquemment par l'analyse du génome complet. Son utilisation en routine dans les laboratoires de microbiologie clinique est largement évoquée ces dernières années et se ferait probablement dans les années à venir (Török *et al.*, 2012; Kwong *et al.*, 2015; Kozyreva *et al.*, 2017; Tagini *et al.*, 2017).

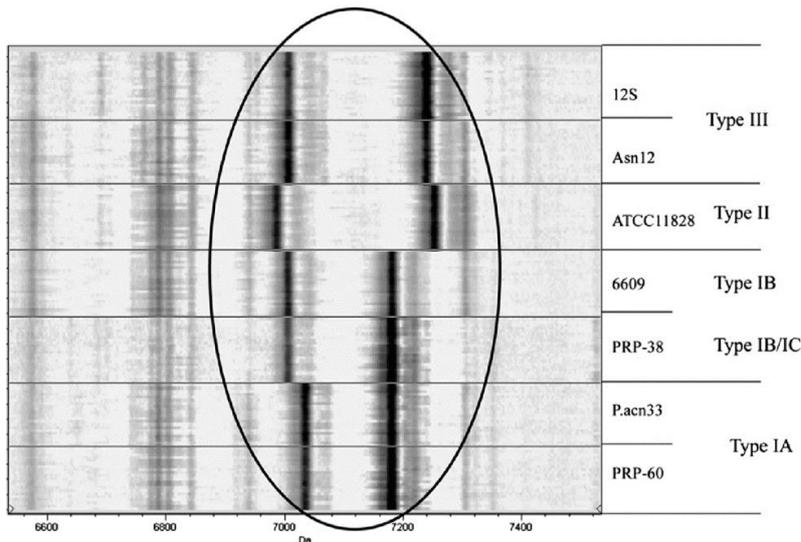


Figure 15. Aperçu des spectres de masse de souches de *C. acnes* de référence appartenant aux phylotypes I, II et III ; zoom sur la région de m/z discriminante (Nagy et al., 2013).

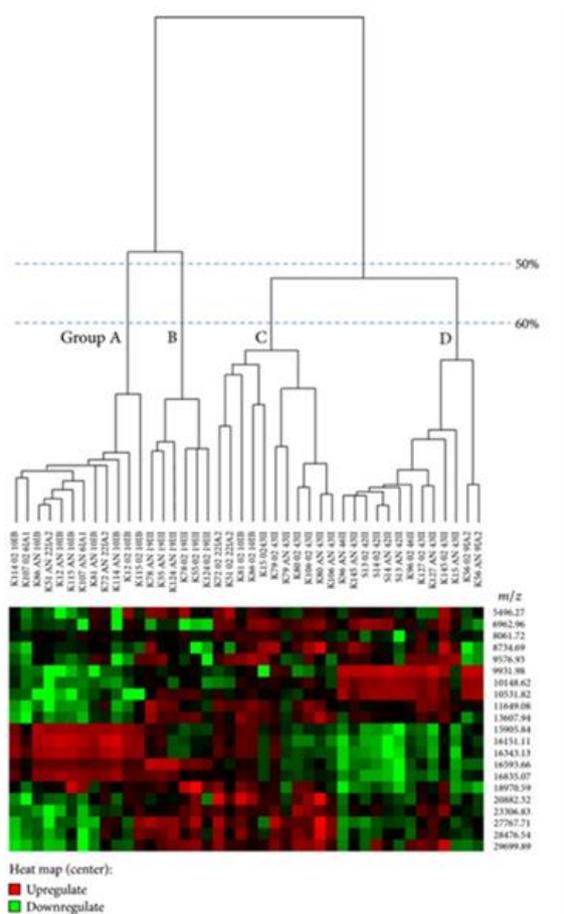


Figure 16. Analyse phylotypique par SELDI-TOF (Dekio et al., 2013).

La technique SELDI-TOF a permis de définir 4 groupes : Le groupe A et B correspondant au phylotype I, les groupes C et D comprenant à la fois des isolats du type I et II.

3.2.4. Techniques de typage par spectrométrie de masse

Le typage par spectrométrie de masse pourrait être une alternative aux typages moléculaires, d'autant plus que les laboratoires sont de plus en plus équipés par cette technique pour l'identification bactérienne en routine. Pouvoir réaliser un typage bactérien en routine avec une technique rapide et peu coûteuse est en effet tentant : Nagy *et al.* ont bien différencié les phylotypes IA, IB, IC, II et III par MALDI-TOF (Nagy *et al.*, 2013) (Figure 15). Dekio *et al.* ont réussi à classer les isolats de *C. acnes*, par la technique SELDI-TOF, en 4 groupes : Le groupe A ne comprend que des isolats de type I, le groupe B ne comprend que des isolats de type I alors que les groupes C et D contiennent à la fois des isolats du type I et II (Dekio *et al.*, 2013) (Figure 16). Dans cette étude, Dekio *et al.* ont également démontré que l'atmosphère de culture de *C. acnes* n'impacte pas l'arbre phylogénique obtenu mais a un effet majeur sur les protéines exprimées. Ces résultats paraissent prometteurs mais soulignent par ailleurs l'importance d'une normalisation de cette technique après une évaluation à plus grande échelle dans plusieurs sites.

4. Habitat naturel et pathologies associées

4.1. Niche écologique

Il est clairement établi que *C. acnes* est un composant majeur du microbiote cutané humain. Bien qu'il soit présent sur la peau en pré-puberté, la colonisation réelle de la peau par *C. acnes* commence 1 à 3 ans avant la maturité sexuelle. La charge bactérienne en *C. acnes* passe alors de $10^1/\text{cm}^2$ à $10^6/\text{cm}^2$ notamment au niveau du visage. *C. acnes* serait également présent dans le tractus gastro-intestinal et la flore oropharyngée (Funke *et al.*, 1997) mais aussi dans des endroits plus inattendus tels que les ganglions lymphatiques de sujets sains et de tissus médiastinaux (Ishige *et al.*, 1999).

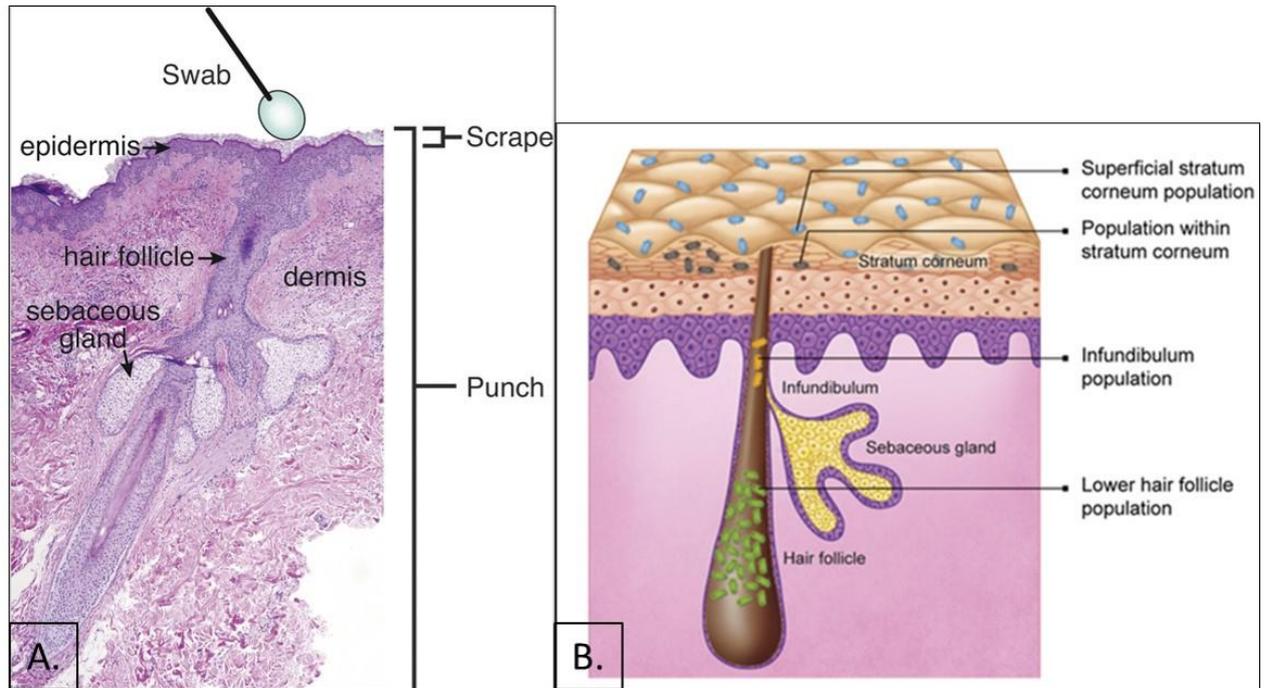


Figure 17. Diversité d'échantillonnage cutané (A) (Grice *et al.*, 2008) et localisation de *C. acnes* sur la peau (B) (Alexeyev *et al.*, 2012).

A. Coupe transversale de la peau montrant les différentes parties cutanées représentées en fonction de la technique d'échantillonnage utilisée B. Schéma représentant la distribution de *C. acnes* dans les sites anatomiques distincts de la peau.

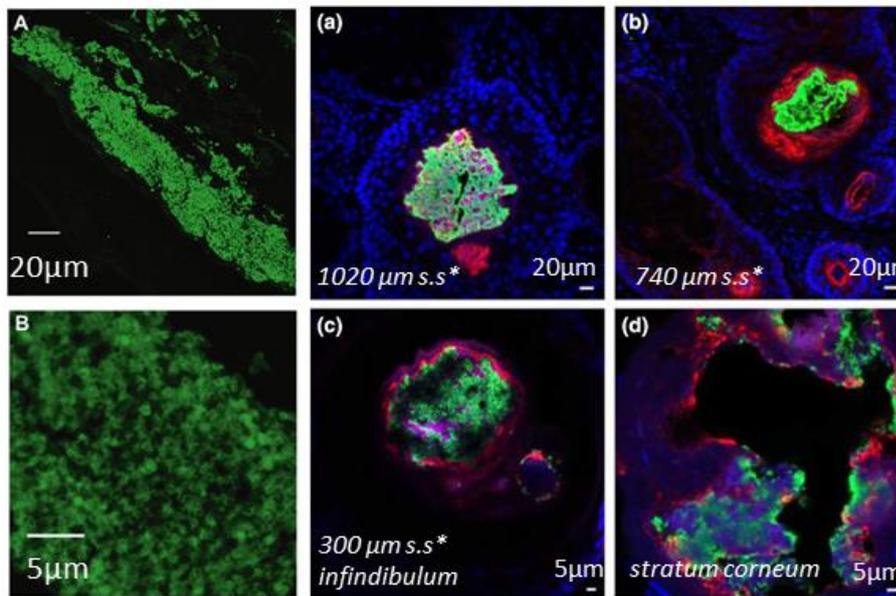


Figure 18. *C. acnes* le long du follicule pileux en microscopie confocale Alexeyev *et al.*, 2012; Jahns *et al.*, 2014).

C. acnes est observé le long du follicule pileux sur une section transversale d'une biopsie cutanée (A et B) et dans un follicule pileux sur 1020µm de profondeur (a,b,c, et d). *C. acnes* marqué par des Ac monoclonaux spécifiques suivi d'un marquage secondaire par des Ac conjugués FITC (vert) (A et B ; a, b,c et d) ; la kératine marquée en rouge ; cellules de l'hôte en bleu (a, b, c et d) ; *s.s : sous la surface.

Les études sur le microbiote cutané sont de plus en plus nombreuses ces dernières années notamment avec l'avènement des techniques moléculaires. La localisation exacte de *C. acnes* sur la peau ainsi que sa proportion par rapport à l'ensemble du microbiome cutané varient d'une étude à l'autre et ce notamment en raison des différences de techniques d'échantillonnage et de détection utilisées (Alexeyev *et al.*, 2012) : La présence de *C. acnes* est certaine au niveau de l'épiderme et du follicule pileux mais sa présence au sein du derme et des glandes sébacées et sudoripares restent à confirmer (Figure 17) (Figure 18). Grice *et al.*, en étudiant la composition du microbiome cutané de 10 sujets sains par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, trouvaient que 19 phyla bactériens sur les 61 connus étaient représentés. Les plus communs appartenaient aux Actinobacteria (51,8 %), aux Firmicutes (24,4 %) et aux Proteobacteria (16,5 %). Les trois genres les plus fréquemment identifiés représentaient plus de 62 % des séquences : propionibactéries (23 %, Actinobacteria), corynébactéries (22,8 %, Actinobacteria), et staphylocoques (16,8 %, Firmicutes) (Grice *et al.*, 2009; Grice *et al.*, 2011) (Figure 19). Jahns *et al.* ont observé une diversité moindre en étudiant 194 biopsies cutanées recueillies à l'occasion du retrait de *naevus*. *C. acnes* était la seule espèce bactérienne dominante dans les régions sébacées et non sébacées alors que les autres espèces bactériennes étaient détectées dans à peine 30% des biopsies principalement sous forme de microcolonies isolées et non de biofilm comme *C. acnes* (Jahns *et al.*, 2016).

Les connaissances sur le microbiome cutané ont révélé que ce dernier subit des variations importantes dans le temps et entre individus mais le facteur le plus important pour les Propionibactéries est la variabilité en fonction des sites cutanés : En effet, Grice *et al.*

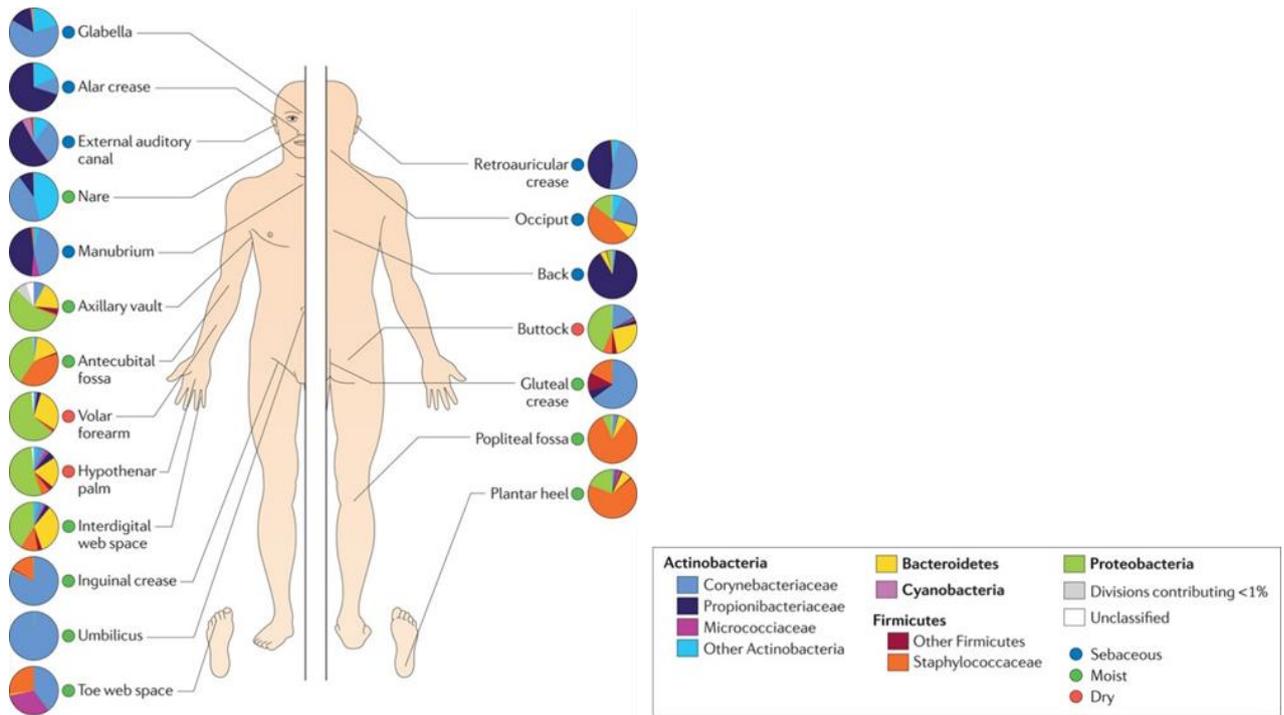


Figure 19. Distribution des différents Phyla bactériens sur les différents sites cutanés (Grice *et al.*, 2011).

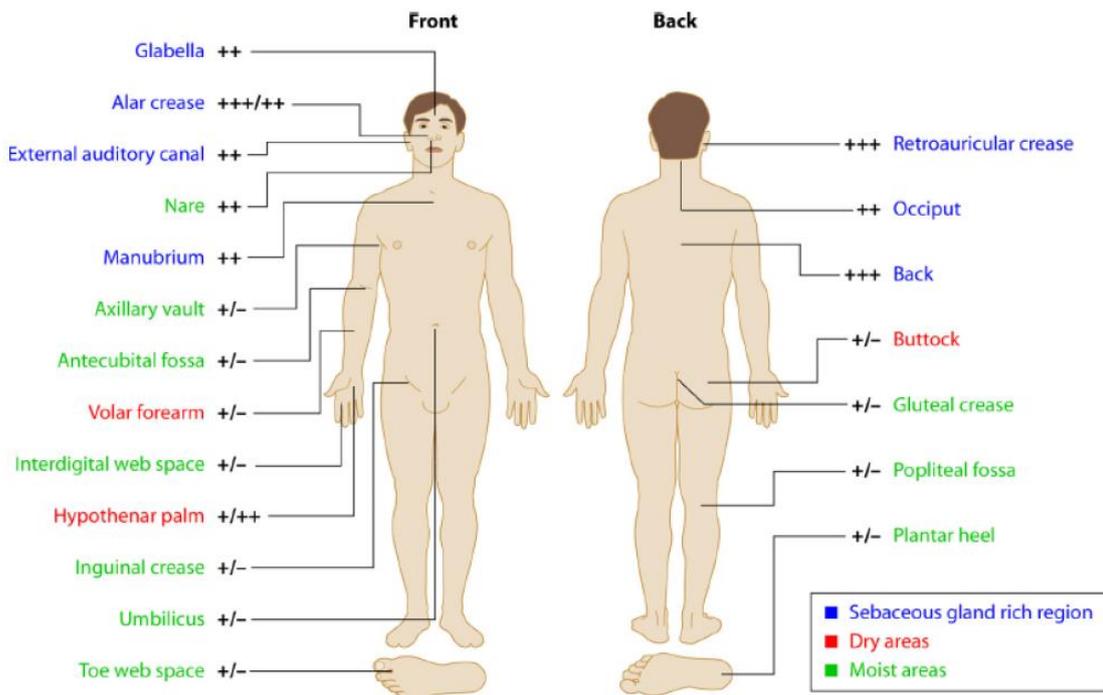


Figure 20. Variabilité topographique de l'abondance relative cutanée des Propionibactéries (Grice *et al.*, 2009; Achermann *et al.*, 2014).

ont montré que malgré la présence des propionibactéries sur toutes les zones cutanées, elles sont plus prédominantes dans les zones riches en glandes sébacées telles que le dos, le visage ou le cuir chevelu tout en étant présentes également au niveau des zones cutanées sèches et humides comme les fesses, l'avant-bras, le pli du coude, et le nombril (Figure 20). Cette variabilité topographique pourrait être expliquée par l'activité lipolytique de *C. acnes*, le principal représentant des Propionibactéries sur la peau (Jahns *et al.*, 2016).

Certains auteurs ont cherché à établir un lien entre cette distribution variable sur la peau de *C. acnes* et la prédominance de *C. acnes* dans les IPOAs d'épaule comparé aux autres IPOAs telles que la hanche et le genou. Les données sont très limitées mais orientent vers un lien entre ces deux composantes : Dans une étude sur 20 patients, la charge cutanée (épiderme) en *C. acnes* est plus importante au niveau de l'épaule qu'au niveau de la hanche et du genou. Les sujets de sexe masculin ont une charge en *C. acnes* plus élevée que les femmes au niveau de l'épaule (Patel *et al.*, 2009). Toujours dans le même but de comprendre la prédominance des IPOAs d'épaule à *C. acnes*, des auteurs ont étudié le microbiome de l'articulation d'épaule chez 23 sujets différents. L'analyse par ARNr16S de tissus recueillis à l'occasion d'une première pose de prothèse d'épaule – cartilage de la tête humérale, ligament glénohuméral moyen et tendon sus-épineux- a montré que *C. acnes* ne fait pas partie du microbiome naturel de l'articulation d'épaule contrairement à d'autres espèces bactériennes comme *Acinetobacter* (Qiu *et al.*, 2018).

La présence de *C. acnes* semble participer fortement au rôle barrière de la peau : *C. acnes* est capable de métaboliser les triglycérides pour libérer des acides gras libres. Par la production de ces acides gras libres, *C. acnes* jouerait un rôle de barrière contre

l'invasion de germes pyogènes tels que *S. aureus* et *S. pyogenes* (Jousimies-Somer *et al.*, 2002) en modifiant le pH de la surface cutanée.



Figure 21. Acné du visage d'un adolescent (Webster, 2002).

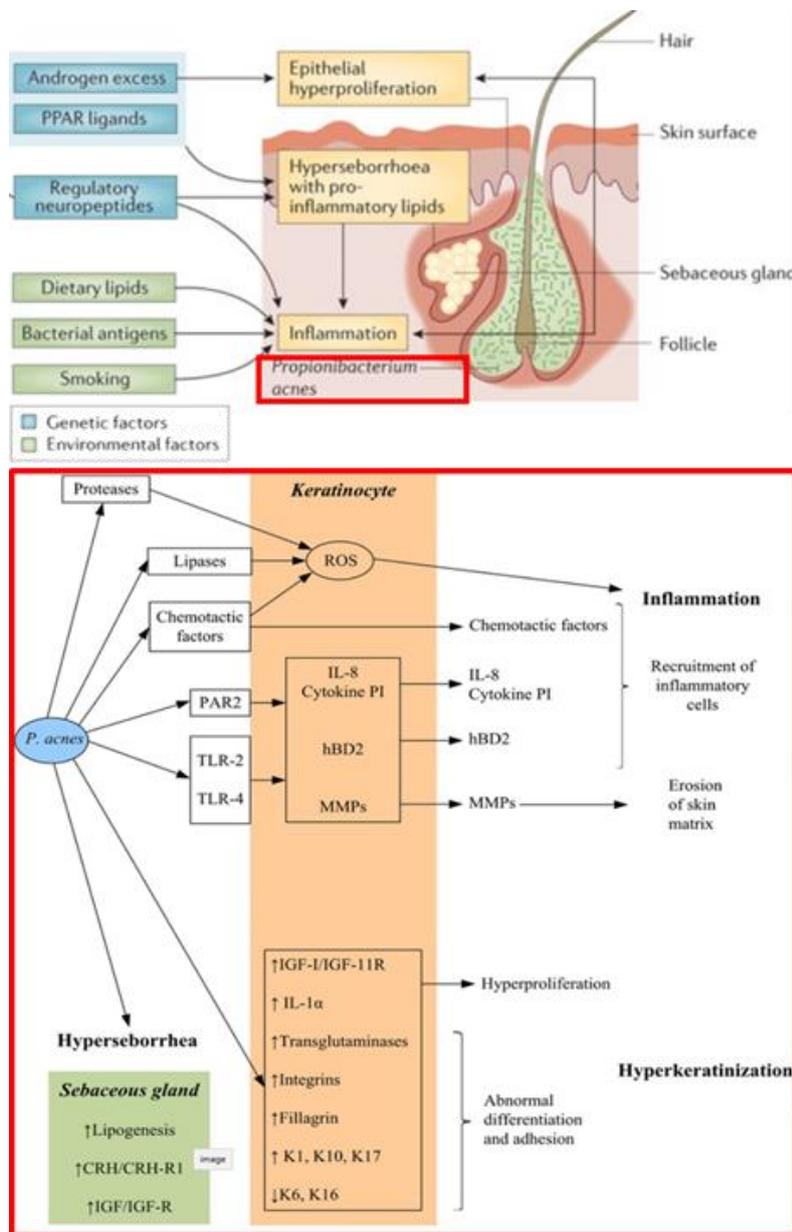


Figure 22. Pathogénèse de l'acné et *C. acnes* (Beylot *et al.*, 2014; Moradi Tuchayi *et al.*, 2015).

4.2. *C. acnes* et pathologies inflammatoires

4.2.1. L'acné

L'acné est une des pathologies suscitant le plus de consultations en pratique dermatologique. Elle touche essentiellement l'adolescent avec une prévalence de 85% dans la population âgée de 12 à 24 ans (Figure 21). L'acné, du grec *akmé* (pointe, sommet), est une dermatose inflammatoire chronique du follicule pilo-sébacé. Cette pathologie est multifactorielle. Elle fait intervenir essentiellement trois acteurs : une hyperséborrhée, une desquamation anormale de l'épithélium folliculaire ou hyperkératose folliculaire, et *C. acnes*, acteur essentiel dans le développement et le maintien de la réponse inflammatoire locale. Ces acteurs sont influencés par des facteurs génétiques, hormonaux, chimiques et psychosomatiques. Bien qu'étroitement liés, la séquence exacte des différents événements reste incertaine (Dréno *et al.*, 2018).

La maturation des unités pilo-sébacées, au moment de la puberté, favorise le développement de micro-organismes lipophiles, particulièrement *C. acnes*. *C. acnes*, par le biais de ses lipases, protéases et hyaluronidases, va provoquer des dommages au sein de l'unité pilo-sébacée. Ces dommages vont induire l'activation des voies classiques et alternes du complément, la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs chimioattractants recrutant les polynucléaires neutrophiles. *C. acnes* a une action directe sur i) les glandes sébacées, permettant ainsi l'entretien de l'hyperséborrhée, ii) les kératinocytes en activant le processus d'hyperkératinisation et d'inflammation de ces cellules. *C. acnes* joue ainsi un rôle clé dans le développement de l'acné (Grice *et al.*, 2011; Beylot *et al.*, 2014; Moradi Tuchayi *et al.*, 2015) (Figure 22).

Bien que l'on ait appris beaucoup sur *C. acnes*, notamment sur son pouvoir pro-inflammatoire, *via* son implication dans le processus de développement de l'acné, le rôle que joue *C. acnes* dans l'initiation et la progression de cette pathologie chronique inflammatoire reste confus car d'une part certaines lésions acnéiques inflammatoires ne montrent aucune colonisation bactérienne et d'autre part il n'existe pas de corrélation entre charge bactérienne en *C. acnes* et sévérité de l'inflammation (Shaheen and Gonzalez, 2011).

4.2.2. Sarcoïdose

La sarcoïdose est une affection qui touche des adultes jeunes, entre 25 et 40 ans (environ 10 cas pour 100.000 personnes). La sarcoïdose est une maladie inflammatoire dite « granulomateuse » diffuse. Elle se caractérise par la présence de petites zones de tissus inflammatoires appelées « granulomes ». Il s'agit de granulomes épithéloïdes non caséux, marque histologique de la sarcoïdose (Loke *et al.*, 2013). Les poumons et les ganglions lymphatiques sont le plus souvent affectés (90 % des cas) mais la sarcoïdose peut également atteindre tout autre organe comme le foie, les yeux, le cœur ou le squelette. Son évolution est souvent spontanément favorable, mais peut, dans 20% des cas, occasionner des complications respiratoires ou extra-respiratoires. La forme respiratoire se présente cliniquement par une toux sèche, des essoufflements et des douleurs thoraciques. La sarcoïdose est donc découverte fortuitement, à l'occasion d'une radiologie thoracique. Les formes pulmonaires évoluent très progressivement vers l'insuffisance respiratoire. Dans le cas des autres localisations, les manifestations sont les suivantes : fièvre, douleurs articulaires, érythèmes squameux, yeux injectés de sang (Valeyre *et al.*, 2014).

Son origine reste inconnue. Beaucoup d'études suggèrent que des facteurs génétiques et environnementaux seraient à l'origine de cette pathologie (Baughman *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2008). Elle pourrait être déclenchée par une infection ou par une réponse anormale du système immunitaire. La sarcoïdose serait la conséquence d'une réaction immunitaire exagérée de l'hôte (polarisation Th1 et accumulation de cellules inflammatoires) en réponse à des antigènes, probablement des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP (Pathogen associated Molecular Patterns). Les PAMPs issus de mycobactéries et de propionibactéries sont les plus fréquemment incriminés, dans la littérature (Ishige *et al.*, 1999). Un lien de causalité entre *C. acnes* et sarcoïdose a été proposé en 2002 quand *C. acnes* a été isolé dans les lésions de sarcoïdose au niveau de la peau et des ganglions lymphatiques (Eishi *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002). Ce lien a été appuyé par des études ultérieures (De Brouwer *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017). Des études *in vitro* et sur un modèle murin ont mis en évidence la capacité de *C. acnes* à envahir et activer une réponse inflammatoire lors de coculture avec des cellules HEK293T (cellules rénales d'embryon humain), des cellules A549 (cellules carcinomateuses humaines de l'épithélium alvéolaire) et ou des macrophages alvéolaires (issus de lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de sarcoïdose) (Tanabe *et al.*, 2006; Schupp *et al.*, 2015). Une étude intéressante a mis en évidence, sur un modèle murin, la capacité de *C. acnes* vivant ou inactivé, d'induire la formation de granulome pulmonaire comparable à ceux observés dans la sarcoïdose (McCaskill *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2017). Aubin *et al* ont montré *in vitro* la capacité de différentes souches de *C. acnes* à déclencher la formation d'un granulome à partir de cellules mononucléées de donneurs sains (Aubin *et al.*, 2017a). L'étude des granulomes formés a mis en

évidence une réponse immune variable et mixte CD4+/CD8+, comme c'est le cas au sein des granulomes observés dans la sarcoïdose (Loke *et al.*, 2013).

Des facteurs liés à l'hôte pourraient en partie expliquer la réponse inflammatoire chronique exagérée à *C. acnes* dans la sarcoïdose (Gabrilovich *et al.*, 2013; Kamata *et al.*, 2013) : des SNPs au niveau de NOD1 et NOD2, un PRR intracellulaire reconnaissant les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif, ont été détectés chez les patients atteints de sarcoïdose (Tanabe *et al.*, 2006).

4.2.3. SAPHO

Le syndrome SAPHO désigne plusieurs affections chroniques qui peuvent toucher à la fois la peau, les os et les articulations. Le regroupement de ces affections sous un même syndrome a été proposé en 1987 par le professeur Kahn et la Société Française de Rhumatologie. Les initiales formant le mot SAPHO correspondent aux principales manifestations observées au cours du syndrome : la Synovite, l'Acné, la Pustulose palmo-plantaire, l'Hyperostose et l'Ostéite.

Le syndrome SAPHO a surtout été observé au Japon et en Europe occidentale (notamment dans les pays scandinaves), mais il semble pouvoir toucher toutes les populations et toutes les ethnies. Le syndrome SAPHO est une affection qui touche autant les femmes que les hommes, et surtout l'adulte jeune (entre 30 et 50 ans). Cependant, l'atteinte peut survenir dès la petite enfance (souvent une ostéite), et jusqu'à 60 ans. On ne sait pas exactement combien de personnes sont atteintes du syndrome SAPHO car de nombreux cas restent méconnus, en raison de la relative nouveauté de la description du syndrome et de la diversité des manifestations cliniques. On pense que ce syndrome n'affecte pas plus d'une personne sur 10 000. (Rukavina, 2015)

La présence de l'acné et l'amélioration clinique de certains patients atteints de SAPHO sous antibiotiques ont orienté vers une implication de *C. acnes* dans ce syndrome (Colina *et al.*, 2014; Takizawa *et al.*, 2014). En effet, *C. acnes* a été fréquemment isolé dans les biopsies percutanées des patients atteints de SAPHO. Bien que la composante inflammatoire soit clairement présente dans le SAPHO, que *C. acnes* soit fréquemment isolé dans les biopsies osseuses de patients atteints de ce genre de syndrome (Zimmermann *et al.*, 2019) et que *C. acnes* soit clairement capable de déclencher un processus inflammatoire chronique (Berthelot *et al.*, 2018), le lien de causalité entre *C. acnes* et SAPHO est loin d'être établi.

4.2.4. Mal de dos

Le mal de dos est associé à un changement dans le stade de Modic (Modic *et al.*, 1988), soit la présence d'un œdème osseux. En effet, ce changement de stade est observé dans 6% de la population générale et dans 35 à 40% des patients se plaignant de douleurs lombaires (Jensen *et al.*, 2008).

Les études ont montré une augmentation majeure (310%) de la fréquence du score Modic 1 suite à une hernie discale (Albert and Manniche, 2007). Jusqu'à 53% des patients atteints de hernie discale ont du *C. acnes* au niveau du disque atteint (Stirling *et al.*, 2001; Albert *et al.*, 2013). Sur une cohorte de 61 patients, Albert *et al.* ont montré que les disques associés à une culture positive à *C. acnes* étaient plus à risque de développer un score Modic de type 1 ($P < 0.0038$) un à deux ans après l'intervention d'hernie discale. La même association a été obtenue par Aghazadeh *et al.* en 2017 quand 36/46 patients positifs à *C. acnes* ont développé un score Modic 1 après une hernie discale (Aghazadeh *et al.*, 2017).

Une cohorte de 23 patients atteints de lombalgies (Modic 1) a démontré l'efficacité clinique sur 11 mois en moyenne d'une antibiothérapie prolongée (Amoxicilline-acide clavulanique) (Albert *et al.*, 2007). Jusqu'en 2017, il était difficile de faire la part entre infection et contamination par *C. acnes* et le lien clinique de causalité entre *C. acnes* et le score Modic 1 était très fragile et discutable (Urquhart *et al.*, 2015). En 2017, Rajasekaran *et al.* ont confirmé sur une étude d'une vingtaine de disques vertébraux le processus infectieux actif dû à *C. acnes* dans cette pathologie (Rajasekaran *et al.*, 2017). Par une approche originale principalement protéomique, ils ont mis en évidence : 1) la production de 73 protéines bactériennes dont 53 spécifiques à *C. acnes* 2) 14 protéines impliquées dans la défense de l'hôte présentes ou surexprimées exclusivement dans les disques associés à une hernie discale ou dégénérescence (défensine 1, lysozyme C, C4b du complément, protéine réactive C ou CRP, phospholipase A2....).

Des modèles animaux (rat et lapin) ont permis de mettre en évidence que l'inoculation de *C. acnes* est capable de déclencher une réponse inflammatoire (IL-8, IL-1b, TNF α ...), d'induire une dégénérescence du disque et un changement dans le score Modic (Dudli *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2017). Jiao *et al.* ont été même jusqu'à évaluer chez les rats, l'apparition de douleurs dorsales suite à l'inoculation de *C. acnes* et d'incriminer directement l'IL-8 (CINC= homologue IL8 chez le rat) dans cette douleur (Jiao *et al.*, 2019).

L'hypothèse étant que lors d'une hernie discale, le disque rentre en contact avec le canal médullaire et déclenche rapidement une néocapillarisation qui serait à l'origine d'une contamination du disque par du *C. acnes* hématogène. Ce dernier se développe plus facilement sur ce nouvel environnement avasculaire anaérobie. L'inflammation

de l'os adjacent (stade Modic 1) serait générée par la production de cytokines engendrée par *C. acnes* dans le disque.

4.2.5. Cancer de la prostate

La pathogénie de *C. acnes* dans la prostatite chronique et le cancer de la prostate a été parmi les plus étudiées. Le cancer de la prostate fait partie des cancers les plus fréquents dans les pays industrialisés : Il est la deuxième cause de décès lié à un cancer des patients de sexe masculin dans les pays occidentaux (Ferlay *et al.*, 2011). Le nombre de cas diagnostiqués est en continuelle progression aussi bien en raison du vieillissement de la population qu'en raison de la disponibilité depuis les années 90 du dosage sérique de la PSA (Prostate Specific Antigen) (Giovannucci *et al.*, 2007). Une inflammation est communément observée dans le cancer de la prostate. Une prostatite chronique serait une étape primordiale avant le développement du cancer (Dennis *et al.*, 2002). L'implication d'un agent infectieux « cancérogène » serait à l'origine de cette inflammation. La prévention et/ou le traitement de cette infection pouvant éviter la survenue d'un cancer de la prostate dans la population a suscité l'intérêt à l'établissement de cette corrélation.

Cohen *et al.* en 2005 ont été les premiers à démontrer la prédominance de *C. acnes* dans les cultures de tissus prostatiques cancéreux (Cohen *et al.*, 2005) : Sur 34 tissus cultivés, 35% étaient positifs à *C. acnes*. Les tissus associés à une culture positive à *C. acnes* étaient plus inflammatoires que ceux négatifs à *C. acnes*. L'association entre *C. acnes*, le cancer de la prostate et l'inflammation a été appuyée par des études réalisées par d'autres équipes notamment par Alexeyev *et al.* en 2006 qui ont démontré par ADN_r16S sur une cohorte de 352 patients que *C. acnes* est le germe prédominant (23%) dans l'hyperplasie prostatique bénigne et que sa présence est

associée à un risque plus élevé de développer un cancer de la prostate par la suite (Alexeyev *et al.*, 2006, 2007). L'association entre la présence de *C. acnes* et le risque de développer un cancer de la prostate a été également relevée dans l'étude de Davidsson *et al.* (Davidsson *et al.*, 2016). Kakegawa *et al.* l'ont montré en 2017 en suivant sur 4 ans des patients ayant une biopsie suite à un titre de PSA sérique élevé. Trente-six patients n'ont pas développé de cancer et 44 ont eu un cancer dans les 4 ans de suivi : la fréquence d'une présence de *C. acnes* dans les tissus était associée à un risque plus élevé de développer un cancer (Kakegawa *et al.*, 2017). Fassi Fehri *et al.* ont montré que 81% des échantillons de cancer prostate étaient positifs à *C. acnes*, absent dans les échantillons d'individus sains (Fassi Fehri *et al.*, 2011). Bae *et al.* (Bae *et al.*, 2014) ont mis en évidence *in situ* en utilisant des anticorps spécifiques *C. acnes* la présence plus abondante de *C. acnes* dans l'épithélium prostatique et les macrophages du stroma de la prostate quand il s'agit d'un cancer. Ils ont montré *ex vivo* que les tissus prostatiques cancéreux infectés par *C. acnes* étaient associés à une expression nucléaire plus élevée de NF κ b et que le taux des macrophages du stroma infectés par *C. acnes* était corrélé au grade de l'inflammation chronique (Bae *et al.*, 2014). Sur un modèle de rat (98 rats), Olsson *et al.* ont pu mettre en évidence la persistance de *C. acnes* 3 mois post infection dans les tissus prostatiques et surtout le déclenchement d'une inflammation chronique dans ces tissus (Olsson *et al.*, 2012). *C. acnes* serait capable d'upréguler le processus inflammatoire des cellules épithéliales prostatiques - Ceci a été mis en évidence par la sécrétion de cytokines proinflammatoires (IL-6 et IL-8), l'activation de la voie NF κ b et STAT3 (Drott *et al.*, 2010; Fassi Fehri *et al.*, 2011)- mais aussi d'altérer la prolifération de ces cellules et induire leur transformation, en cas de contact prolongé. Une co-culture *C. acnes* et cellules prostatiques PNT1A a mis en évidence également l'activation de

l'inflammation par *C. acnes* (par le biais de la sécrétion de cytokines) mais aussi une augmentation de la prolifération cellulaire (Davidsson *et al.*, 2016). En utilisant une lignée primaire de cellules épithéliales prostatiques, Sayanjali *et al.* ont mis en évidence la sous-expression (microarray) de plus de 30 gènes impliqués dans le cycle cellulaire touchant la fonctionnalité de kinétochore et centromère par le biais de gènes clés. Cette sous-expression persiste jusqu'à au moins 2 semaines post-infection (Sayanjali *et al.*, 2016). Un gène codant un thiopeptide berninamycine-like serait à l'origine de cette action inhibitrice sur le cycle cellulaire. Ce gène serait présent dans les isolats de type IB mais absent des isolats du type IA (Sayanjali *et al.*, 2016).

4.3. *C. acnes* et infections

C. acnes est impliqué dans divers types d'infections principalement des infections sur matériel médical.

4.3.1. Infections sans matériel étranger

C. acnes est tout de même décrit dans des infections sans matériel étranger dont des spondylodiscites, des endophtalmies, des endocardites, des pleurésies, des ostéoarthrites (Mohsen *et al.*, 2001; Uçkay *et al.*, 2010; Shirodkar *et al.*, 2012; Lawrence *et al.*, 2017; Heckmann *et al.*, 2018; Yamamoto *et al.*, 2018). Il s'agit souvent de « case reports » où le lien de causalité entre *C. acnes* et le processus infectieux peut être discuté. Malgré l'absence de matériel, une iatrogénie est associée dans certains cas (intervention chirurgicale sans pose de matériel, infiltrations...).

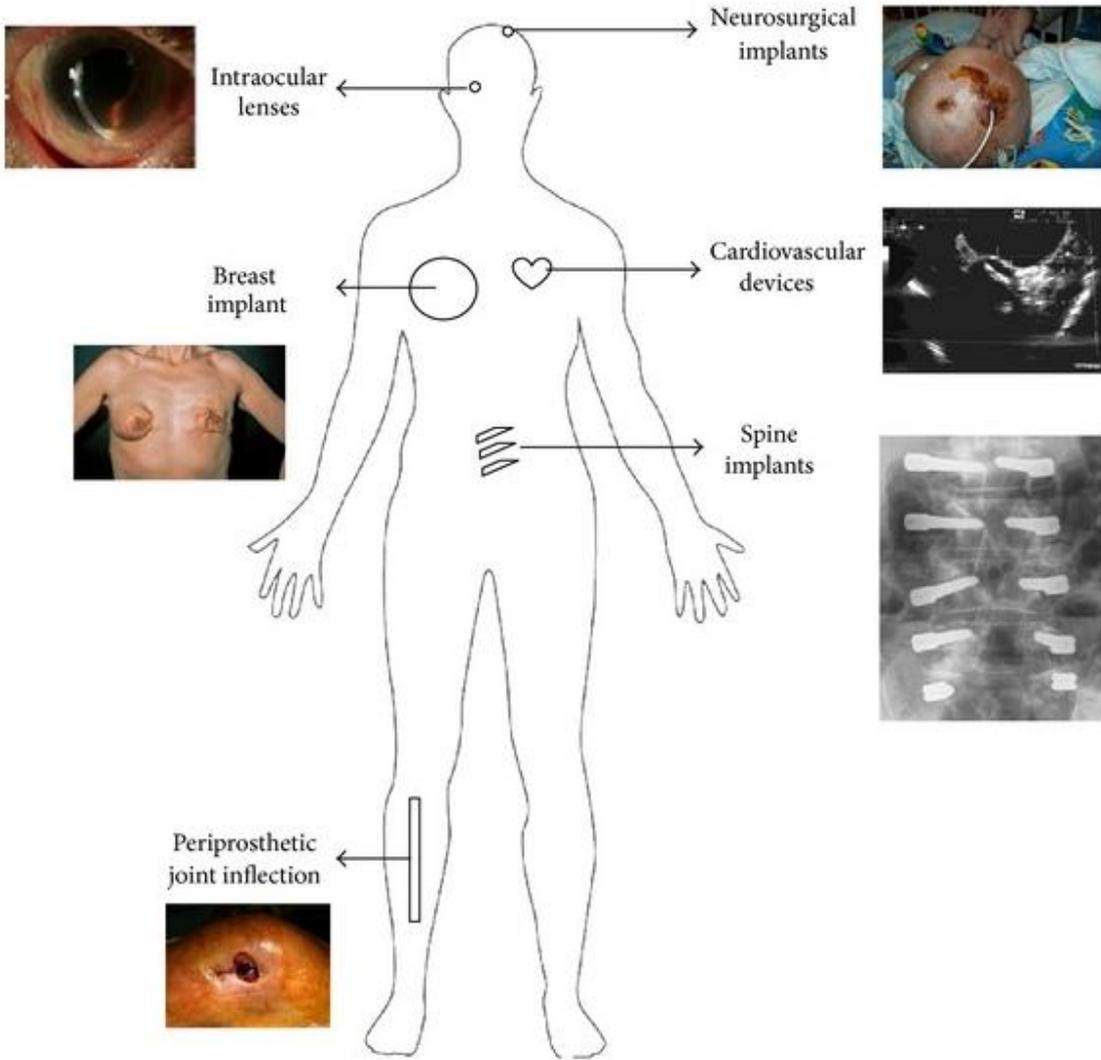


Figure 23. Diversité des infections sur matériel étranger dues à *C. acnes* (Portillo *et al.*, 2013).

4.3.2. Infections sur matériel étranger (*Figure 23*)

a) Infections sur prothèses mammaires

La pose d'implants mammaires est de plus en plus fréquente aussi bien en chirurgie reconstructrice – suite à une mastectomie pour cancer - qu'en chirurgie esthétique .La contracture capsulaire suite à la pose d'un implant mammaire constitue une des principales complications de cette chirurgie : Elle survient chez 5 à 30% des patientes (Stevens *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs tels que la nature et la taille de l'implant, l'abord chirurgical, le développement d'un hématome ou d'un épanchement, interviennent dans la survenue de la contracture capsulaire (Stevens *et al.*, 2013). Aujourd'hui, il est admis que *C. acnes* joue un rôle dans la survenue de cette complication. En effet, Del Pozo *et al.* ont retrouvé dans 33 % des implants mammaires retirés en raison d'une contraction capsulaire plus de 20 UFC de bactéries pour 10 mL de sonicat (Del Pozo *et al.*, 2009). Rieger *et al.* ont montré que la sonication permettrait d'augmenter le taux de détection de bactéries (41 % des 22 implants mammaires retirés pour contracture capsulaire des grades III ou IV) (Rieger *et al.*, 2009). *C. acnes* et les staphylocoques à coagulase négative étaient les principales bactéries isolées (Del Pozo *et al.*, 2009; Rieger *et al.*, 2009). Une culture bactérienne positive n'est pas seulement observée dans les cas de contracture capsulaire mais elle est également corrélée significativement au degré de la contracture capsulaire (Rieger *et al.*, 2013). Le rôle précis des bactéries dans la survenue de la contracture capsulaire reste encore à étudier.

b) Infections sur matériel cardiovasculaire

C. acnes est principalement décrit comme responsable d'endocardite sur valve prothétique mais aussi d'infections sur pacemaker ou défibrillateur mécanique (Van Valen *et al.*, 2016; Banzon *et al.*, 2017). Les endocardites à *C. acnes* représentent 8 % des endocardites sur prothèses valvulaires (EPV) en général (Lindell *et al.*, 2018).

La quasi-totalité des cas décrits dans la littérature concerne des patients de sexe masculin. L'intervalle libre médian serait d'environ 3 ans (Van Valen *et al.*, 2016; Lindell *et al.*, 2018) avec un intervalle libre très variable entre les patients allant de 4 mois à 22 ans. Des signes cliniques aigus sont présents dans environ 30% des cas (Banzon *et al.*, 2017). Une fièvre y est associée dans la majorité des cas (75 à 88%). Un descellement de la prothèse (19-85%), la présence de végétation (65-85%), d'abcès péri-valvulaire (50-65%) et des défaillances valvulaires majeures sont des signes fréquents mais dont la fréquence est variable d'une étude à l'autre.

Sur le plan microbiologique, les hémocultures sont positives dans au moins 75% des cas en cas d'incubation prolongée à 14 jours. Les cultures de valves sont positives dans 50 % des cas (Banzon *et al.*, 2017; Lindell *et al.*, 2018). La détection de *C. acnes* par PCR 16S sur valves a permis de poser le diagnostic d'une endocardite dans 6 cas sur 24 (25 %) dans la série de Banzon *et al.*, et de 2 cas sur 51 (4%) dans la série de Lindell F. *et al.* Une positivité combinée des cultures de valves et d'hémocultures permet de renforcer la responsabilité de *C. acnes* dans le développement de l'endocardite, diagnostiquée cliniquement mais la fréquence de cette positivité est faible et variable selon les études (25 à 50% des cas). Le diagnostic microbiologique des EPVs à *C. acnes* reste problématique en raison de la difficulté de cultiver *C. acnes* et de son potentiel contaminant. Park *et al.* ont montré sur une large étude que seuls 3,5 % (18/522) des patients ayant une bactériémie documentée à *C. acnes*

présenterait des signes cliniques associés pouvant orienter vers une endocardite (Park *et al.*, 2011). Une étude récente a démontré que la sonication des prélèvements per-opératoires de valves cardiaques améliorerait significativement la sensibilité des cultures microbiologiques. Cependant, cette technique est accompagnée par une augmentation de la détection de contaminants, notamment par *C. acnes*. En effet, *C. acnes* était isolé dans 16 valves dont 7 étaient des valves « contrôle » de sujets sains (Gomes *et al.*, 2018).

Des études complémentaires et des définitions microbiologiques plus ciblées d'une endocardite à *C. acnes* associées à des recommandations sur les outils microbiologiques à utiliser sont indispensables pour une meilleure prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces infections rares mais potentiellement mortelles. La physiopathologie des infections sur matériel cardio-vasculaires à *C. acnes* restent totalement inexplorée et méconnue.

c) Infections sur matériel ostéo-articulaire

Les infections sur matériel ostéo-articulaire (IMOA) à *C. acnes* sont au cœur de nos travaux de thèse. Un chapitre leur est consacré ci-dessous (Chapitre III).

5. Pouvoir pathogène de *C. acnes*

5.1. Inflammation : Voies d'activation et composants proinflammatoires de *C. acnes*

5.1.1. Immunité innée

Le pouvoir proinflammatoire de *C. acnes* n'est plus à démontrer mais les voies d'activation de l'inflammation ainsi que les différents composants clés de *C. acnes* dans la réponse inflammatoire restent encore à explorer.

C. acnes est capable de déclencher une réponse inflammatoire par son interaction avec un panel large de cellules aussi bien immunes tels que les monocytes circulants (Agak *et al.*, 2014), les macrophages que des cellules plus tissu-spécifiques telles que les kératinocytes, les cellules épithéliales au niveau de la prostate, ou des poumons.

C. acnes est capable d'activer l'inflammation à travers diverses voies. Il serait capable d'activer directement les TLRs ou Toll-Like Récepteurs, des récepteurs clés dans l'activation de l'immunité innée : les TLR1, 2, 4, 6 et même le TLR intracellulaire TLR9 seraient reconnus par *C. acnes* (Jugeau *et al.*, 2005; Kalis *et al.*, 2005; Tchaptchet *et al.*, 2012). Cette capacité à être reconnu par plusieurs TLRs pourrait être expliquée par la présence d'acide lipoteichoïque dans le peptidoglycane de *C. acnes*, une particularité de cette bactérie comparée aux autres bactéries à Gram positif (Nagy *et al.*, 2005). Différents composants produits par *C. acnes*, et étudiés comme facteurs de virulence de *C. acnes*, seraient également reconnus par les TLRs. Ce serait le cas de CAMP1 qui selon Lheure *et al.* se lie au TLR2 (Lheure *et al.*, 2016). La reconnaissance des TLRs par *C. acnes* et ses différents composants entraîne une réponse transcriptionnelle *via* l'activation de facteurs de transcriptions tels que le NF- κ B.

L'inflammasome, un macrocomplexe protéique intracellulaire découvert en 2002 (Martinon *et al.*, 2002) et présent notamment dans les cellules de la lignée granulocytaire, est formé suite à l'activation de son NOD-like récepteur par des PAMPs. Il active la cascade inflammatoire et est responsable principalement de la maturation des cytokines IL-1 et IL-18 *via* l'activation de sa caspase. Récemment, il a été démontré que *C. acnes* est capable d'activer l'inflammasome et particulièrement NLRP3. Cette activation, démontrée sur les sébocytes, les monocytes-macrophages, et les polynucléaires neutrophiles serait dépendante de l'activité protéasique de *C. acnes* et de la génération d'ERO (Espèces Réactives à l'Oxygène) (Li *et al.*, 2014), de l'efflux potassique, la phagocytose ou la rupture lysosomale (Kistowska *et al.*, 2014).

D'autres facteurs, comme les lipases produites par *C. acnes*, renforcent le pouvoir proinflammatoire de la bactérie, du moins dans l'acné. Ces lipases hydrolysent le sébum en acides gras libres à courtes chaînes, connus pour être pro-inflammatoires (Sanford *et al.*, 2016).

C. acnes serait également capable d'activer les kératinocytes et les sébocytes *via* CD1 et CD14 (Moradi Tuchayi *et al.*, 2015).

C. acnes peut activer la voie alterne et classique du complément par l'intermédiaire des dégâts tissulaires dont il peut être responsable par la production de lipases, protéases et hyaluronidases. Il produit également de facteurs chimioattractants des polynucléaires neutrophiles (Dessinioti *et al.*, 2010).

Les MMPs ou Matrix-MétalloProtéases (collagénases, gélatinases, matrilysines...) sont des endopeptidases produites par différents types de cellules dont les kératinocytes et sont capables de dégrader les composants de la matrice

extracellulaire. Elles ont un rôle majeur dans le remodelage de la matrice inflammatoire. En rompant les follicules pilo-sébacés, les MMPs activent l'inflammation. *C. acnes* serait capable d'induire directement la production de MMP-2 par les fibroblastes du derme (Choi *et al.*, 2008) mais aussi la production d'autres MMPs *via* les protéases et lipases qu'il produit (Lee *et al.*, 2010).

Les peptides antimicrobiens, en plus de leur rôle bactéricide, sont connus pour leur capacité à déclencher une réponse inflammatoire. Les PAM, notamment les β -défensines et les cathelicidines ont été détectés en quantité importante dans les glandes sébacées de sujets acnéiques (Chronnell *et al.*, 2001 ; Toyoda *et al.*, 2002). La production de β -défensines 2 par les sébocytes serait stimulée par *C. acnes* (Nagy *et al.*, 2006).

Le pouvoir proinflammatoire de *C. acnes* a été mis en évidence par la production d'un grand nombre de cytokines proinflammatoires dans des modèles *in vitro*, *in vivo* (modèles animaux) ou *ex vivo*. TNF α , MIP-2, IL-1b, IL-12, IL-17, IFN γ , IL-6, IL-8....

Graham *et al.* ont montré que les bactéries viables de *C. acnes* sont plus capables d'induire la production de cytokines proinflammatoires par les kératinocytes que les bactéries tuées (Graham *et al.*, 2004). Ces résultats soulignent l'importance des produits sécrétés par *C. acnes* dans le pouvoir proinflammatoire de *C. acnes*. Une multitude de produits a été suggéré : lipases, protéinases, hyaluronidases mais aussi CAMP (Nagy *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2005).

5.1.2. Immunité adaptative

C. acnes est capable d'activer l'immunité adaptative. En effet, *C. acnes* est capable en présence des cellules mononuclées de sang d'induire l'expression de l'IL-17 et

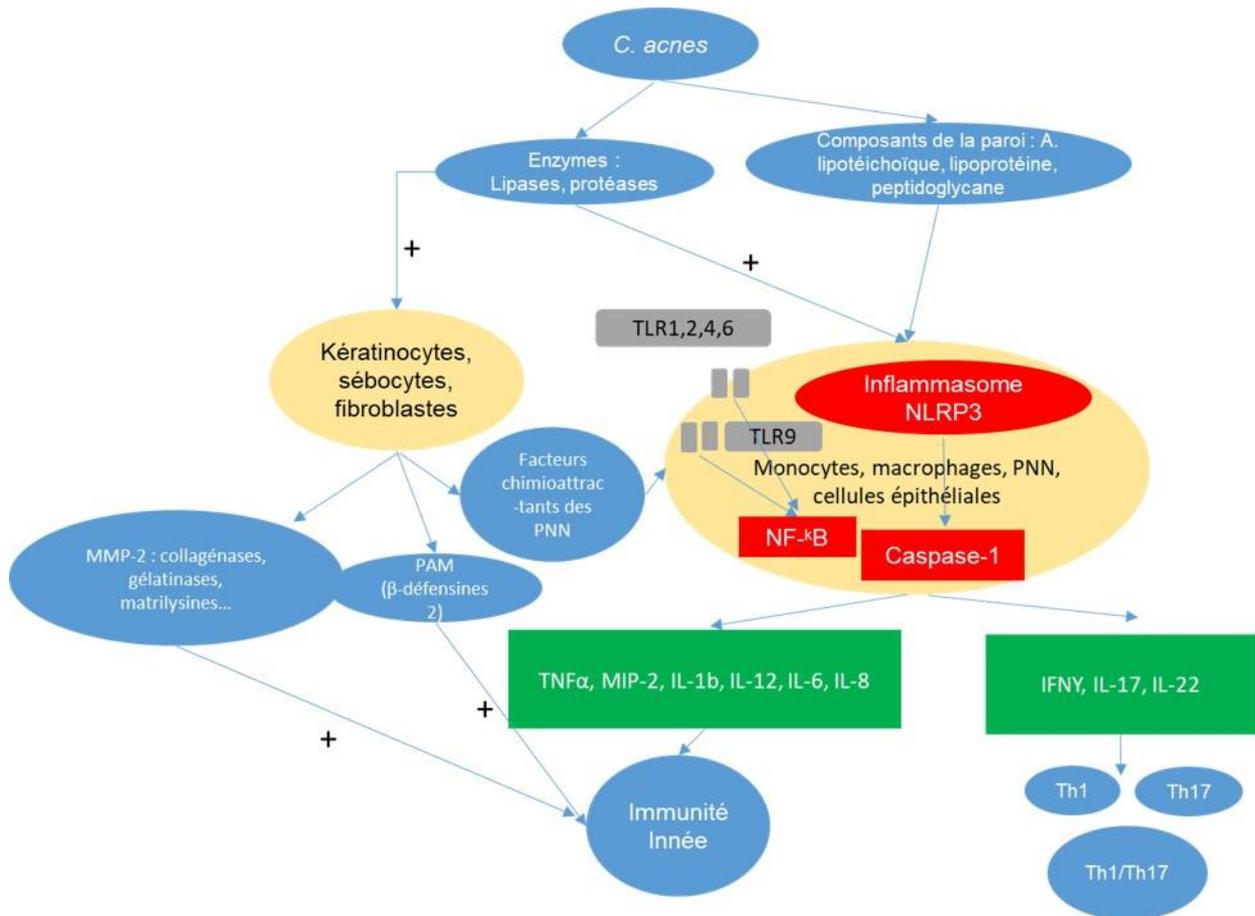


Figure 24. **C. acnes** et l'immunité.

Cette figure résume d'une façon sommaire la capacité de *C. acnes* –par le biais de composants de sa paroi ou enzymes- d'interagir avec différentes lignées cellulaires de l'hôte, d'activer l'inflammation à travers diverses voies, mais aussi d'induire une réponse immune adaptative Th1, Th17 et Th1/Th17.

TLR : Toll-Like Recepteur ; MMP-2 : MétalloProtéase de Matrice-2 ; PAM : Peptide AntiMicrobien ; MIP : Macrophage Inflammatory Protein.

l'IFN- γ par les lymphocytes T CD4+ et promouvoir ainsi les voies d'activation Th1, Th17 et Th1/Th17 (Agak *et al.*, 2014; Kistowska *et al.*, 2014). Les cytokines de la voie Th1, l'IL-17 et l'IL-22 ont la capacité de stimuler la production de multiples peptides antimicrobiens (Peck *et al.*, 2010). et d'induire la production de chimioattractants de PNN tels que l'IL-8 par les cellules épithéliales (Laan *et al.*, 1999; Annunziato *et al.*, 2012). Le rôle d'une réponse mixte Th1/Th17 reste à explorer mais cette réponse serait observée lors d'une stimulation chronique de la voie Th17 (Dileepan *et al.*, 2011).

Un résumé de l'interaction de *C. acnes* avec le système immunitaire est illustré dans la Figure 24.

5.2. Biofilm

Il est clairement démontré aujourd'hui que *C. acnes* est capable de former un biofilm aussi bien *in vitro* sur différents types de surface (polystyrène, billes de verre....) que *in vivo*. Le pouvoir biofilmogène étant un facteur clé dans la physiopathologie des infections sur matériel ostéo-articulaire, les données de la littérature concernant le pouvoir biofilmogène de *C. acnes* seront exposées dans le sous-chapitre Physiopathologie du chapitre III. *C. acnes* dans les infections sur matériel ostéo-articulaire.

5.3. Persistance intracellulaire

La détection intracellulaire *ex vivo* de *C. acnes* dans les tissus infectés et l'inflammation associée suggèrent que la survie intracellulaire de *C. acnes* participe à sa persistance à long terme chez l'hôte résultant en un état inflammatoire chronique.

Des études sur des modèles murins ont montré que *C. acnes* peut être détecté dans les phagocytes jusqu'à 6 jours après l'infection, dans le foie et la rate jusqu'à 15 jours après infection (Tuttle *et al.*, 1975 ; Scott *et al.*, 1977). Webster *et al.* ont montré que

les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sont incapables de dégrader *C. acnes in vitro* (Webster *et al.*, 1985). Dans le modèle sarcoïdose, *C. acnes* a été isolé dans les macrophages alvéolaires et issus de ganglions lymphatiques de patients atteints de sarcoïdose (Negi *et al.*, 2012). Dans le modèle prostatite, Alexeyev *et al.* ont montré *ex vivo* la capacité de *C. acnes* à persister jusqu'à 6 ans dans le tissu prostatique d'un même patient (Alexeyev *et al.*, 2007). Sur un modèle de rat (98 rats), Olsson *et al.*, ont pu mettre en évidence *in vitro* la persistance de *C. acnes* 3 mois post infection dans les tissus prostatiques (Olsson *et al.*, 2012).

Fischer *et al.* ont exploré les mécanismes expliquant la survie de *C. acnes* intramacrophagique. Ils ont pu montrer que *C. acnes* serait capable de survivre dans les phagosomes des macrophages THP-1. Ces phagosomes subiraient une acidification transitoire. Cette réversion de l'acidification pourrait être un mécanisme d'échappement développé par *C. acnes* (Fischer *et al.*, 2013). Une des hypothèses est que *C. acnes* via son système arginine deiminase (ADI) pourrait neutraliser les conditions acides dans les phagosomes (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011). Ce système ADI permettrait à *C. acnes* de convertir l'arginine en ornithine générant ainsi de l'ATP et du NH₃. Cette voie a déjà été impliquée chez *Listeria monocytogenes* dans la survie de cette espèce dans les phagosomes macrophagiques (Ryan *et al.*, 2009). De même, aucune colocalisation n'a été observée entre les phagosomes et les marqueurs lysosomiaux précoces (marqueur précoce endosomal Rab5) ou tardifs (LAMP1 et cathepsine D) (Fischer *et al.*, 2013).

Ces données suggèrent que *C. acnes* serait capable de bloquer ou de faire diversion à la voie de maturation des phagosomes et éviter sa dégradation par la machinerie phagolysosomiale. Ce mécanisme d'évasion pourrait être conservé dans la population

globale de *C. acnes*, ayant été observé pour 3 isolats appartenant à 3 phylotypes distincts (Fischer *et al.*, 2013). Ceci reste à mieux approfondir sur un plus large panel d'isolats.

5.4. Pouvoir hémolytique

C. acnes porte dans son génome un gène codant pour une hémolysine, le gène *tly* (McDowell *et al.*, 2005). Ce gène serait présent sur tous les génomes de *C. acnes*. En effet, il fait partie d'un des schémas MLST proposés pour le typage de *C. acnes*. En parallèle, il a été démontré *in vitro* que certains isolats de *C. acnes* possèdent un pouvoir hémolytique mais le lien formel entre *tly* et le phénotype hémolytique reste à démontrer. Nodzo *et al.* ont suggéré, sur un nombre limité de souches (n=22) que les isolats β -hémolytiques sont plus infectants dans les infections ostéo-articulaires à *C. acnes* et associés à une CRP significativement plus élevée (Nodzo *et al.*, 2014). D'autres équipes ont tenté d'évaluer le pouvoir hémolytique comme marqueur diagnostique supplémentaire dans l'infection ostéo-articulaire à *C. acnes*. Or, ce facteur ne paraissait pas assez discriminant (Boyle *et al.*, 2017; Mahylis *et al.*, 2018). Son implication dans la virulence de *C. acnes* reste par conséquent hypothétique, comme évoqué par Capoor *et al.* dans les spondylodiscites chroniques et les lombalgies, par analogie à des observations réalisées sur le rôle inflammatoire et algésique de l'alpha-hémolysine de *S. aureus* sur les nerfs sensitifs (Chiu *et al.*, 2013; Capoor *et al.*, 2018). A noter que la mise en évidence du pouvoir hémolytique de *C. acnes* dépend significativement de l'origine des érythrocytes utilisés (Hoeffler, 1977; Corvec *et al.*, 2015). Par ailleurs, le pouvoir hémolytique paraît variable en fonction du phylotype de *C. acnes*. Les isolats appartenant au phylotype I sont le plus souvent hémolytiques (environ dans 90 % des cas) alors que les isolats appartenant aux

phylotypes II et III ne sont jamais hémolytiques (Lomholt *et al.*, 2010; Corvec *et al.*, 2015; McDowell *et al.*, 2016)

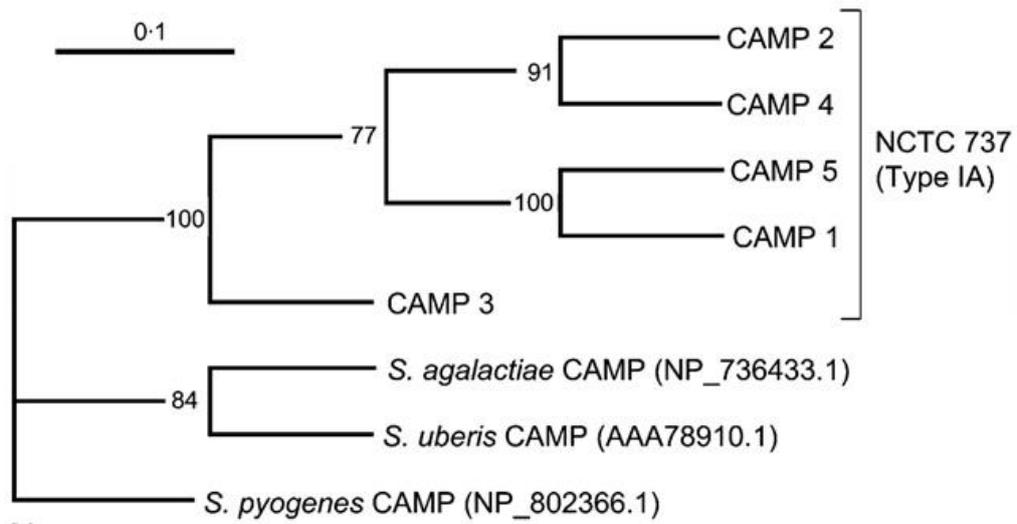


Figure 25. Arbre phylogénétique illustrant relation entre les CAMP facteurs de *C. acnes* et ceux de streptocoques (Valanne *et al.*, 2005).

5.5. Facteurs de virulence

Le séquençage du génome de *C. acnes* qui a débuté en 2004 a permis de détecter de multiples facteurs de virulence potentiellement impliqués dans la pathogénie de *C. acnes*. Ces facteurs pourraient expliquer comment une bactérie supposée être commensale peut devenir pathogène.

5.5.1. Christie, Atkins, Munch-Peterson facteur ou CAMP factor

Il fait partie des facteurs les plus étudiés. Brüggemann *et al.*, en 2005 ont rapporté la présence de 5 gènes présentant environ 32% d'homologie avec le facteur CAMP du *Streptococcus agalactiae* (Brüggemann, 2005) (Figure 25). Des multiples facteurs CAMP homologues n'ont pas été observés dans d'autres espèces bactériennes. Il serait probable que les multiples facteurs CAMP dériveraient de la réplication d'un gène commun ancestral avec des fonctions divergentes. Les facteurs CAMP seraient à la fois exprimés à la surface de la bactéries mais aussi sécrétés dans le milieu extérieur comme exotoxine (Valanne *et al.*, 2005; Nakatsuji *et al.*, 2011).

Le facteur CAMP 1 serait à l'origine d'une réponse inflammatoire par l'intermédiaire d'une interaction avec le TLR2 en augmentant la synthèse d'IL-8 (Lheure *et al.*, 2016). Il est pour cela considéré comme une cible potentielle pour le développement d'un vaccin (Wang *et al.*, 2018). Le facteur CAMP, particulièrement le facteur CAMP 2, peut aussi avoir une activité hémolytique lorsqu'il est associé à la sphingomyélinase de l'hôte : En effet, ces deux facteurs agiraient en synergie pour induire un effet cytotoxique sur les kératinocytes humains et les macrophages murins, favorisant ainsi la dégradation et l'envahissement cellulaire (Nakatsuji *et al.*, 2011).

Tableau 4. **Vingt protéines constituent le sécrétome commun de *C. acnes* (Holland *et al.*, 2010).**

Au moins 3 souches parmi les 5 testés secrètent les protéines listées ci-dessous. ^aSP = signal peptide ; TAT = twin-arginine motif.

Gene ID	Updated annotation	Protein family/domains/origin of closest ortholog	Secretion signal ^a	Phylo-type
PPA0532	conserved hypothetical protein	<i>Corynebacterium</i>	SP, TAT	IA, IB, III
PPA0533	conserved hypothetical protein	<i>Corynebacterium</i>	SP	IA, IB, II, III
PPA0534	conserved hypothetical protein	<i>Corynebacterium</i>	SP	IA, IB
PPA0598	putative protease	peptidase S8/S53 superfamily; <i>Arthrobacter</i>	SP, (TAT)	IA, IB
PPA0644	putative endo-glycoceramidase	cellulase, glycoside hydrolase family 5; <i>Corynebacterium</i>	(SP), TAT	IA, IB, III
PPA0687	CAMP2	CAMP factor superfamily; <i>Mobiluncus curtisii</i> , <i>Streptococcus</i>	SP	IA, IB, II, III
PPA0721	putative invasion-associated protein; NlpC/P60 family	NlpC/P60 family; <i>Kribbella flavida</i> , <i>Streptomyces</i>	SP, TAT	IA, IB, II, III
PPA0816	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	no	IB, II, II
PPA1310	putative protease	PDZ superfamily; <i>Kribbella flavida</i> , <i>Streptomyces</i>	Internal SP (wrong N-terminus)	IA, IB, II, III
PPA1498	putative phosphoesterase	metallo-dependent phosphatase superfamily; <i>Rhodococcus</i>	TAT	IA, IB, II
PPA1662	putative lysozyme	CH-type (chalaropsis-type) lysozyme, glycoside hydrolase family 25; <i>Streptomyces</i>	SP, TAT	IB, II, II
PPA1715	hypothetical protein, specific to <i>P. acnes</i>		SP	IA, IB
PPA1939	hypothetical protein, specific to <i>P. acnes</i>		SP	IA, IB, II, III
PPA2097	putative 5'-nucleotidase, metallo-phosphoesterase	UshA (5'-nucleotidase/2',3'-cyclic phosphodiesterase and related esterases); <i>Jonesia denitrificans</i>	SP, TAT	IB, II
PPA2105	triacylglycerol lipase	lipase class 2, esterase/lipase superfamily; <i>Rhodococcus</i>	SP	IA, IB, II, III
PPA2106	putative endoglycoceramidase	cellulase, glycoside hydrolase family 5; <i>Nocardioides</i>	SP, (TAT)	IA, IB, II, III
PPA2142	putative lysophospholipase	alpha/beta-hydrolase superfamily, PldB; <i>Corynebacterium</i>	SP, TAT	IB, II
PPA2164	putative beta-N-acetyl-glucosaminidase	glycoside hydrolase family 3; <i>Arthrobacter</i>	SP	IA, IB, II
PPA2175	hypothetical protein, with SH3 and RlpA domains, specific to <i>P. acnes</i>	SH3 (type 3) domain; peptidoglycan-binding domain; C-terminus: DPBB_1 (RlpA-like double-psi beta-barrel)	SP, TAT	IB, II
PPA2239	putative peptidase/glycosyl hydrolase	DUF348 superfamily; G5 domain; C-terminus: DPBB_1 (RlpA-like double-psi beta-barrel); <i>Janibacter</i>	SP	IA, IB, II, III

L'activité co-hémolytique du facteur CAMP de *C. acnes* a été aussi bien observée avec le sphingomyélinase de l'hôte (Nakatsuji *et al.*, 2011) que d'autres bactéries telles que *S. aureus* et *C. perfringens* (Kar Choudhury, 1978). L'activité co-hémolytique ne serait pas équivalente entre les différents facteurs CAMP détectés chez *C. acnes* (Sörensen *et al.*, 2010).

5.5.2. Divers facteurs de virulence

Le génome de *C. acnes* code également pour d'autres facteurs de virulence potentiellement impliqués dans l'adhérence ou l'interaction avec l'hôte : PPA1983, PPA1906, GroEL, DnaK, DnaJ and GrpE (Brüggemann, 2005). L'étude du sécrétome de *C. acnes* a montré que ce dernier est capable de produire des enzymes de dégradation du tissu de l'hôte comme les lipases, les estérases, l'hyaluronate lyase, des endoglycocéraminidases, des sialidases, et diverses peptidases extracellulaires (Tableau 4) (Holland *et al.*, 2010). Kostakioti *et al.* ont montré, en 2013 que certaines molécules d'adhérence peuvent agir comme facteurs de virulence (Kostakioti *et al.*, 2013). Parmi les molécules impliquées dans l'adhérence, une glycéraldehyde-3-phosphate dehydrogénase (GAPDH) a été décrite chez *C. acnes* (Holland *et al.*, 2010). Associée à la paroi, elle est de plus sécrétée dans le milieu extérieur (Achermann *et al.*, 2015). Ceci est en accord avec les observations obtenues chez d'autres bactéries à Gram positif, telles que les streptocoques (Bergmann *et al.*, 2004 ; Freiberg *et al.*, 2014) où la GAPDH est décrite comme une protéine multifonctionnelle, sans ancrage, qui se trouve à la surface et qui contribue à l'adhérence et à la virulence.

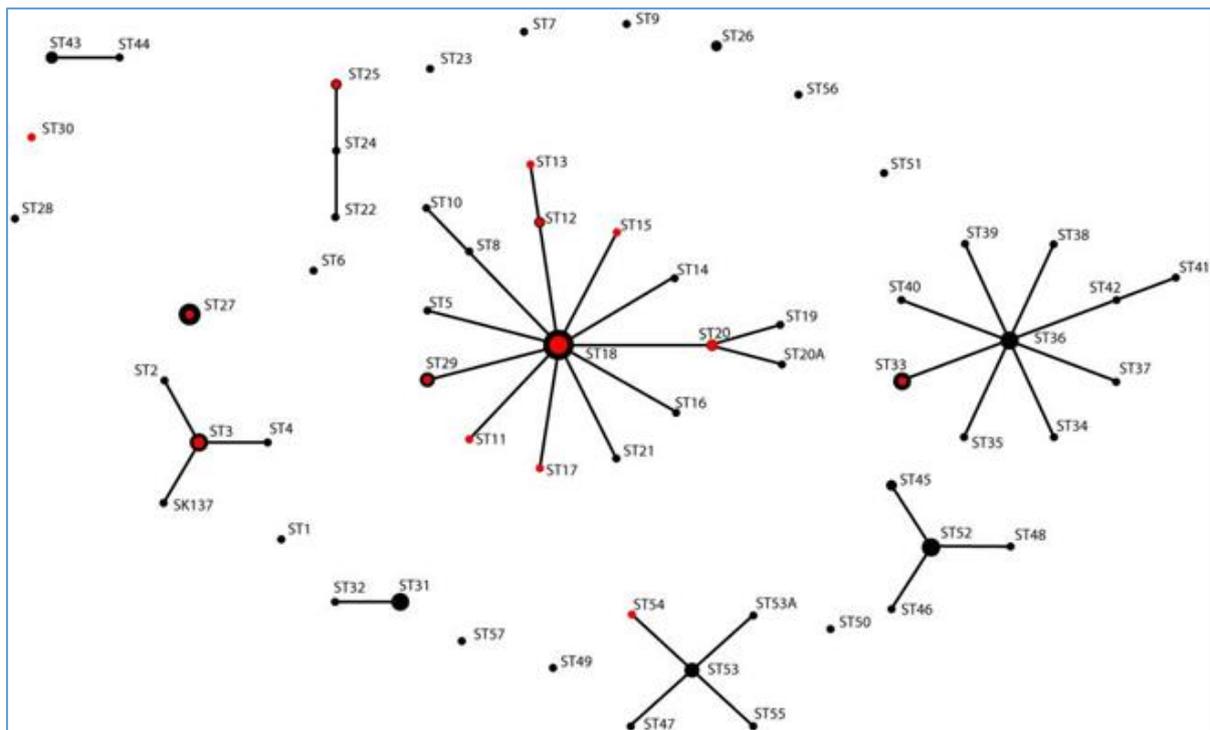


Figure 26. Distribution des isolats acnéiques dans la population globale *C. acnes* (Analyse eBurst) (Lomholt *et al.*, 2010).

Les cercles rouges correspondent aux isolats acnéiques. La taille du cercle correspond au nombre d'isolats appartenant au même ST.

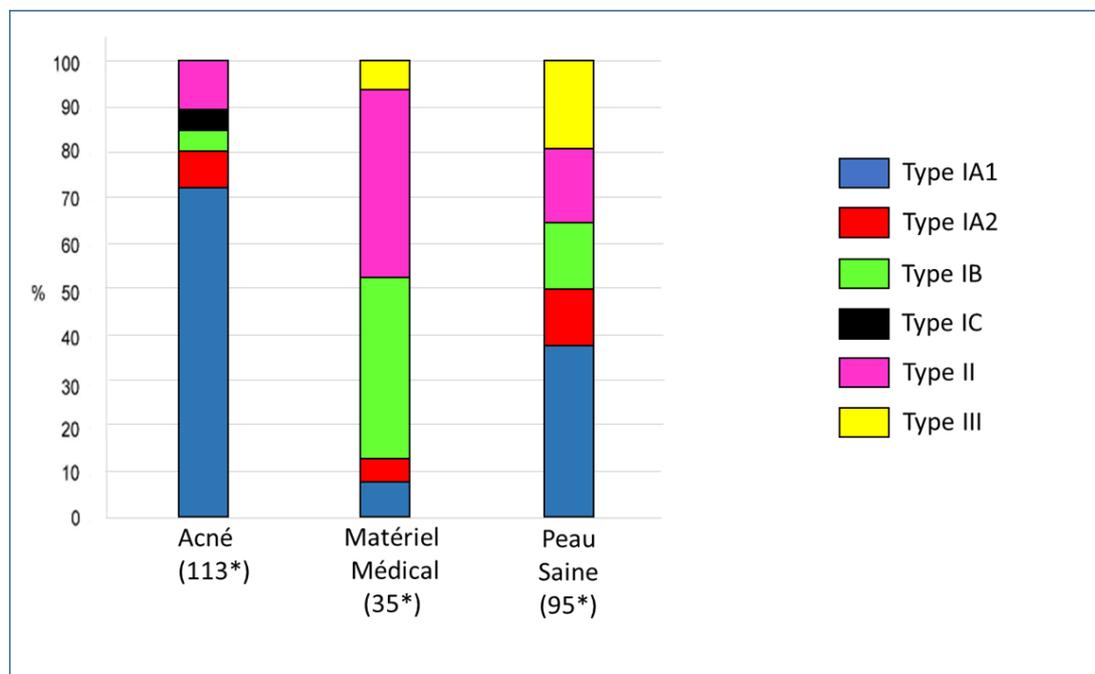


Figure 27. Distribution des phylotypes de *C. acnes* en fonction des sites de recueil. Figure adaptée à partir des données de McDowell *et al.* (McDowell *et al.*, 2013).

6. Phylogénie, tropisme et virulence de *C. acnes*

Des auteurs ont proposé de reclasser les différents phylotypes de *C. acnes* en différentes sous-espèces (Dekio *et al.*, 2015; McDowell *et al.*, 2016). Il est donc légitime de penser que la pathogénie et la virulence de *C. acnes* ne soient pas équivalentes d'un phylotype à l'autre.

6.1. Phylotype et pathologies

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'association entre la phylogénie de *C. acnes* et sa pathogénie. Dès les années 80, à l'époque de typage réalisé par des phages, Gehse *et al.* ont démontré que les isolats de phylotype I étaient plus fréquemment associés à l'acné que le phylotype II (Gehse *et al.*, 1983). Plus tard, avec l'avènement des techniques plus discriminantes, notamment le MLST, une association entre les isolats CC18 (phylotype I-1a selon le schéma MLST9 équivalent au phylotype IA1 selon le schéma MLST8) et l'acné a été démontrée (Lomholt *et al.*, 2010; McDowell *et al.*, 2013) (Figure 26). De plus, une association entre les isolats de type III et la peau saine. Ces derniers n'étaient jamais isolés de lésions acnéiques mais composés approximativement de 20% d'isolats de peau saine (McDowell *et al.*, 2013) (Figure 27).

Les équipes s'intéressant à la physiopathologie de la sarcoïdose ont tenté d'établir un lien entre phylogénie de *C. acnes* et sarcoïdose. Bien que les isolats appartenant au ST26 (MLST9-phylotype IA1-CC18) soient fréquents dans les prélèvements de patients atteints de sarcoïdose, aucun lien n'a pu être établi en raison de leur fréquence élevée dans les mêmes sites de sujets sains (Minegishi *et al.*, 2015).

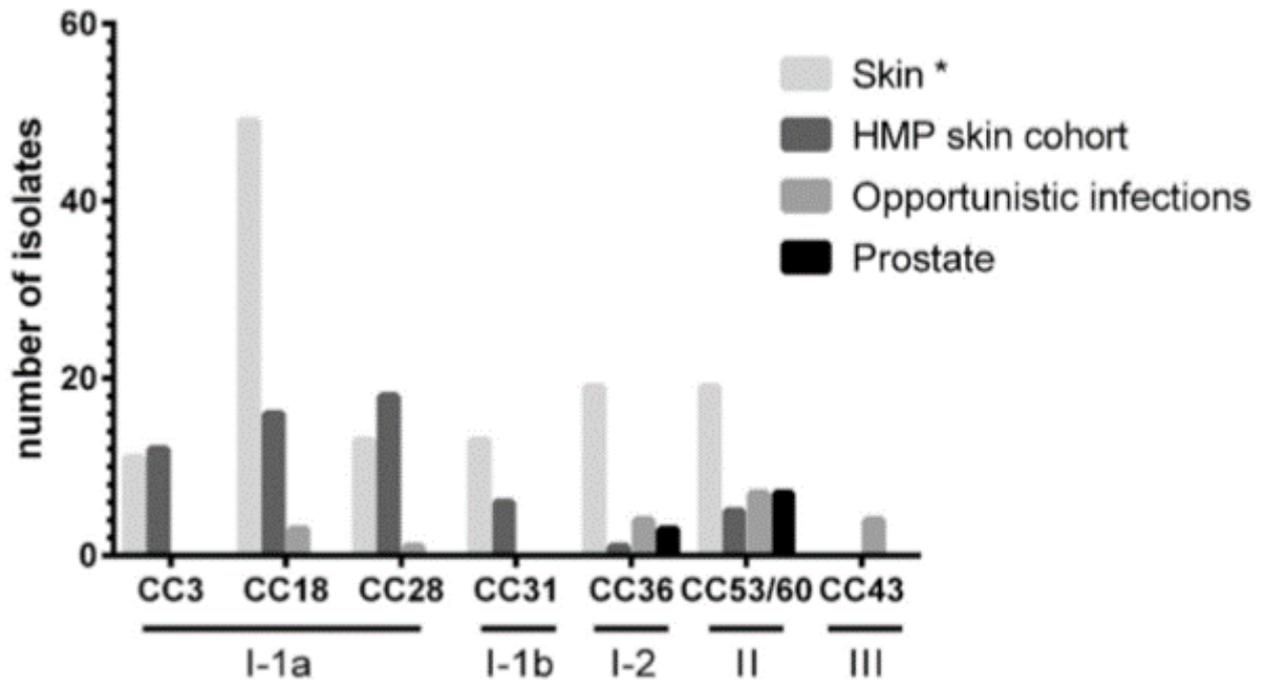


Figure 28. Comparaison de la phylogénie de *C. acnes* isolés de tissus cancéreux prostatiques aux isolats d'origines diverses déjà décrits dans la littérature (Mak *et al.*, 2013).

A l'inverse, un lien entre les isolats de *C. acnes* de type IB (CC36) et II (CC53 ou singletons proches de CC53) et le cancer de la prostate a été démontré (Mak *et al.*, 2013). Ce lien est fragile pour plusieurs raisons : 1) la première est que ceci a été observé sur une collection de 9 isolats de *C. acnes* ; 2) la seconde est que les types associés au cancer de la prostate seraient par ailleurs les types prédominants dans le tractus urinaire de sujets sains de sexe masculin à partir de l'âge adulte (Shannon *et al.*, 2006). Par ailleurs, Davidsson *et al.* ont montré que les 2 types I et II peuvent coexister dans un tissu prostatique cancéreux (Davidsson *et al.*, 2016) (Figure 28). Globalement, sur 35 isolats de *C. acnes* recueillis sur matériel médical d'origines diverses, il a été démontré que les types IB et II étaient surreprésentés (McDowell *et al.*, 2013) (Figure 27). Il serait donc légitime de s'intéresser à la fréquence de ces phylotypes dans la population de *C. acnes* isolée sur matériel ostéo-articulaire. Un rappel des données de la littérature relevant de cette thématique est présenté dans le chapitre consacré à *C. acnes* dans les infections sur matériel ostéo-articulaire (chapitre III.6.1).

6.2. Phylotype et virulence

En plus de chercher à établir un lien entre phylogénie et pathogénie de *C. acnes*, des chercheurs ont cherché à mettre en évidence une virulence variable des différents phylotypes.

6.2.1. Phylotype et inflammation

Bien qu'une activité proinflammatoire des différents phylotypes de *C. acnes* soit observée dans les différentes pathologies concernées (Drott *et al.*, 2010; Fassi Fehri *et al.*, 2011; Achermann *et al.*, 2015; Davidsson *et al.*, 2016) une variabilité dans la réponse inflammatoire a été observée en fonction des phylotypes.

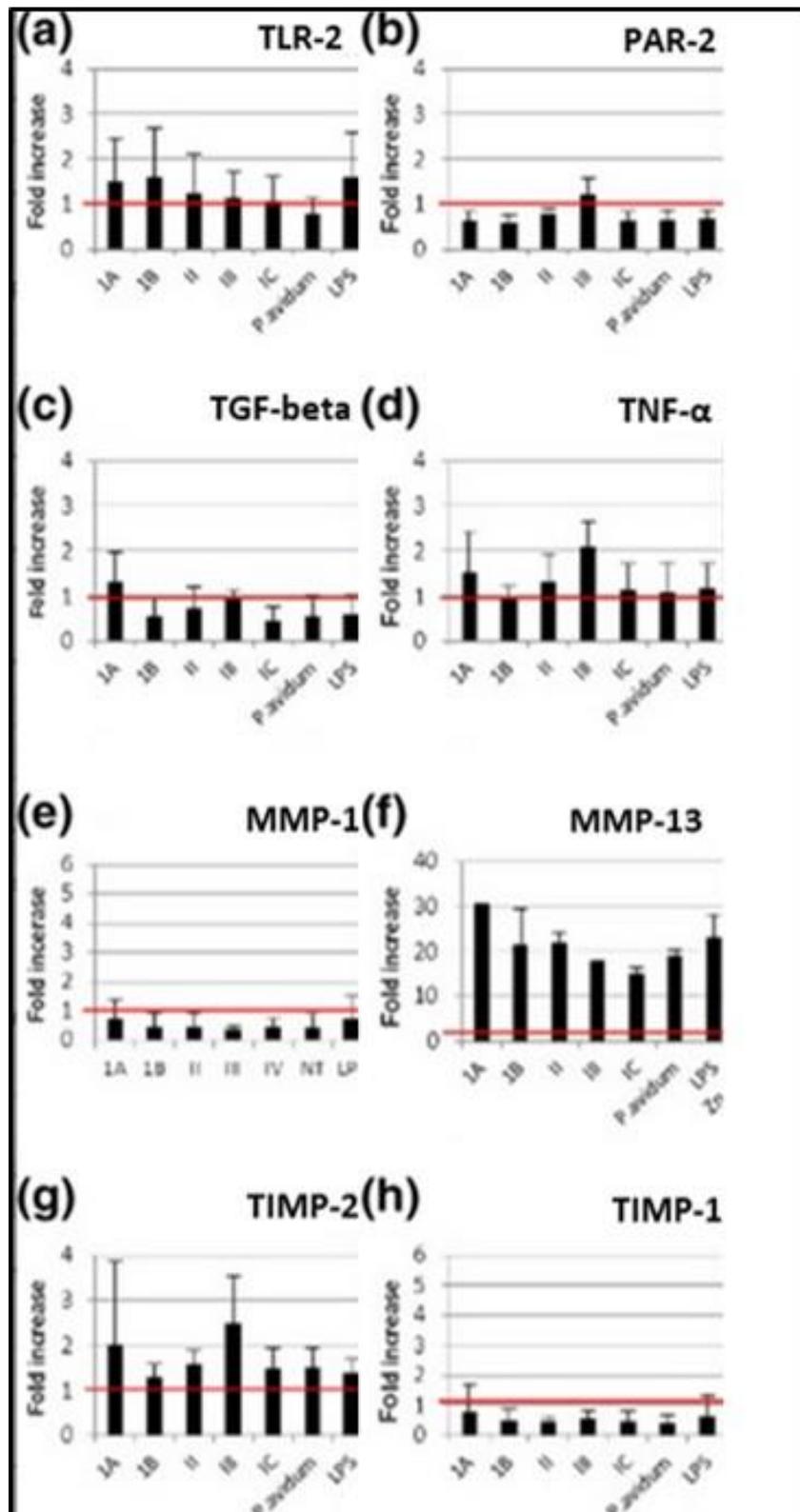


Figure 29. Réponse relative des marqueurs de l'immunité innée (ARNm-RT-qPCR) induite par les différents phylotypes de *C. acnes* (Jasson *et al.*, 2013).

TLR : Toll-Like Receptor; PAR : Protease Activated Receptor; TGF : Tumor Growth-Factor; TNF : Tumor Necrosis Factor; MMP : Matrix Metalloproteinase; TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase.

Dans l'acné, le phylotype II induit une plus forte réponse IL-8 au contact de kératinocytes alors que le phylotype IA induit une plus forte réponse involucrine, protéine des kératinocytes hautement produite dans les pathologies inflammatoires cutanées (Nagy *et al.*, 2005). Les types IA et IB induisent une réponse β -défensine plus élevée que le type II par les sébocytes (Nagy *et al.*, 2006). L'interaction CAMP1-TLR2 est forte pour les types IB et II avec une production conséquente d'IL-8 importante, ce qui n'est pas le cas avec les souches de type IA1 et IA2 (Lheure *et al.*, 2016). Jasson *et al.* ont démontré un profil proinflammatoire variable d'un phylotype à l'autre et ce en testant l'expression de marqueurs de la réponse immune innée par des explants cutanés après un contact avec 5 isolats de *C. acnes* appartenant aux phylotypes IA1, IB, IC, II, et III. L'expression génomique et protéomique des marqueurs a été évaluée (Figure 29). Le phylotype III serait le plus inflammatoire des phylotypes alors que le phylotype IB serait le moins inflammatoire (Jasson *et al.*, 2013).

Les différents phylotypes auraient une réponse variable au niveau de l'immunité adaptative. En effet, Yang *et al.* ont montré en 2016 sur des isolats appartenant aux différents phylotypes que l'activation des cellules mononuclées circulantes de plusieurs donneurs par chacun des isolats induit une sécrétion d'IL-17, IFN γ et d'IL-10 variables (Yang *et al.*, 2016) .

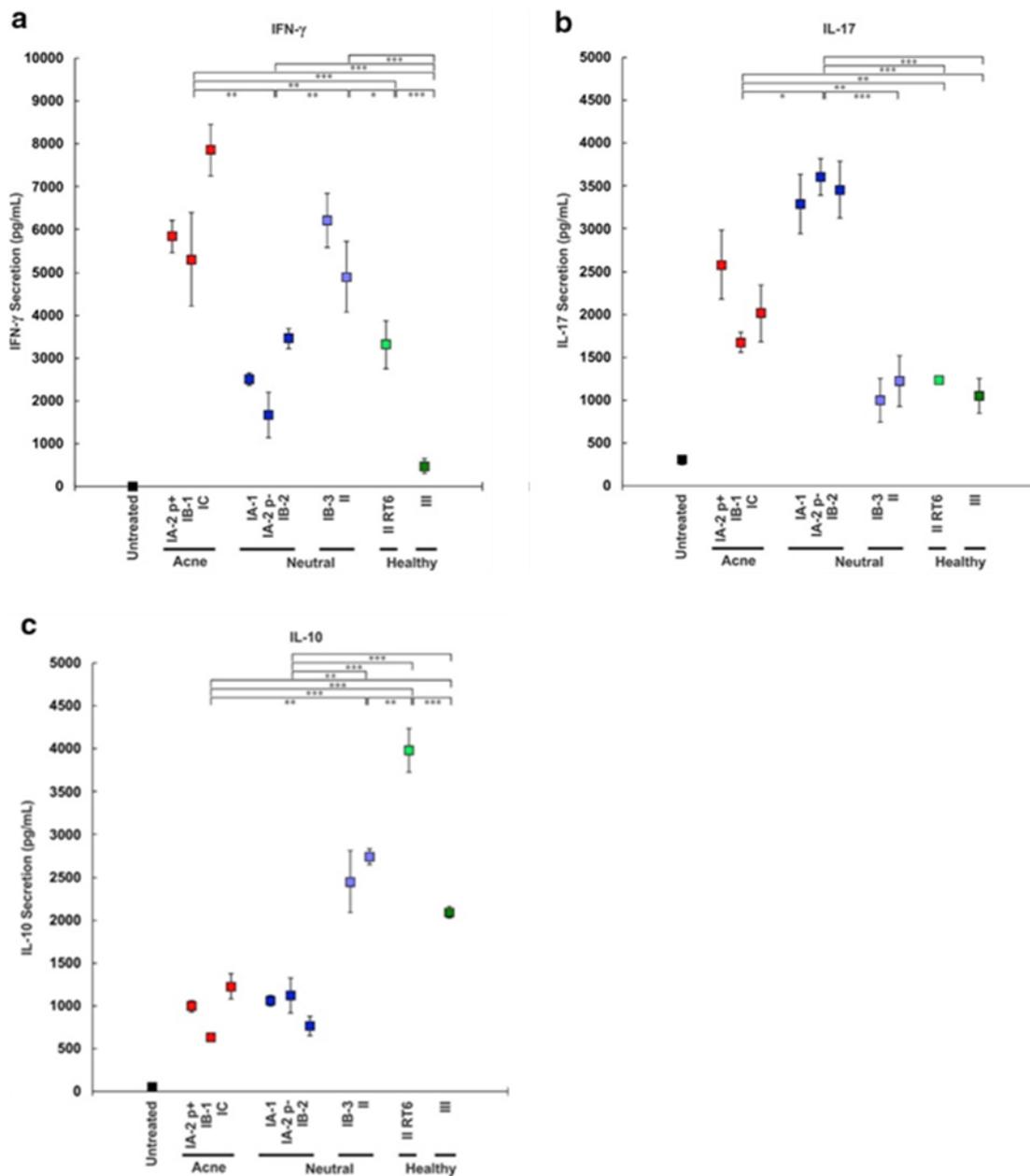


Figure 30. Les phylotypes de *C. acnes* induisent un profil cytokinique différent (Yang et al., 2016).

p+ = présence de plasmide ; p- = absence de plasmide ; RT6 = ribotype 6.

La variabilité dans la réponse immune aux différents phylotypes de *C. acnes* pourrait être liée à une variabilité dans l'expression de certaines protéines antigéniques. L'étude protéomique sur des isolats de *C. acnes* appartenant aux différents phylotypes a montré qu'une adhésine (50843565), une hydrolase (50843410), et plusieurs protéines dont la fonction est inconnue (50842677, 50842762, and 50843175) sont plus fortement exprimés dans les phylotypes IA-2, IB-1, IA-1 et IB-2. A l'inverse, une autre adhésine (50842581) et 2 facteurs CAMP (50842711, 50843546) sont plus fortement exprimés dans les phylotypes II et III (Yang *et al.*, 2016) (Figure 30).

Les 5 facteurs CAMP, présents chez tous les types de *C. acnes*, présentent une expression variable en fonction du phylotype. La quantité de facteur CAMP 1 produite par le type II de *C. acnes* est plus importante que celle produite par type IA alors que la quantité de facteur CAMP 2 produite par le type IA est plus importante que celle produite par les types II et IB (Valanne *et al.*, 2005).

La capacité d'invasion intracellulaire serait également variable en fonction du phylotype. Seuls des isolats de sérotype I étaient capables d'envahir les cellules épithéliales HEK293T alors qu'aucun isolat de sérotype II sur 50 étudiés n'a pu envahir ces cellules (Furukawa *et al.*, 2009). La capacité d'internalisation de *C. acnes* a été également étudiée sur des cellules osseuses : Aubin *et al.* ont montré sur une dizaine d'isolats ostéo-articulaires cliniques de *C. acnes* que les isolats appartenant aux CC18 (IA1) et CC28 (IA2) étaient internalisés par les ostéoblastes et les ostéoclastes contrairement aux isolats appartenant au CC36 (IB) (Aubin *et al.*, 2017b) .

6.2.2. Phylotype et biofilm

Quant au pouvoir biofilmogène, celui-ci ne serait pas dépendant du phylotype mais de la pathogénie de la souche. Holmberg *et al.* ont montré, sur une large collection d'isolats, que seuls les isolats « invasifs »-responsables d'infections de tissus profonds- seraient capables de produire un biofilm contrairement aux isolats de la peau saine et ce indépendamment du phylotype (basé sur le séquençage du gène *recA*) auquel ils appartiennent (Holmberg *et al.*, 2009).

II. Les infections sur prothèses ostéo-articulaires

1. Introduction générale

Le nombre de prothèses ostéo-articulaires implantées chaque année ne cesse d'augmenter en France et dans le monde entier. En France, en 2015, on estime à 130 000 et 85000 le nombre de prothèses de hanche et de genou posées par an, selon le PMSI (programme de médicalisation des systèmes d'information). Aux Etats-Unis, en 2018 on estime à 1 million le nombre de prothèses de hanche et de genou posées par an avec une prédominance d'arthroplastie de genou (environ 600000 par an), selon l'AJRR (American Joint Replacement Registry).

La survenue d'une infection après arthroplastie est une des complications les plus redoutées par le chirurgien et le patient. Elle est associée à des résultats fonctionnels inférieurs et à un taux de mortalité plus élevé (Toulson *et al.*, 2009; Berend *et al.*, 2013). Le risque d'infection est estimé à 1 % pour les prothèses de hanche et 2 % pour les prothèses de genou (Kapadia *et al.*, 2016).

En France, le taux d'incidence des infections sur site opératoire (ISO) en chirurgie orthopédique survenant dans les 30 jours postopératoires était de 1,27 % en global

avec une incidence de 1,31 % pour les prothèses partielles de hanche, 0,93% pour les prothèses partielles de genou, 3,22 % pour les prothèses totales de hanche (RAISIN 2016, <http://invs.santepubliquefrance.fr>).

A savoir que la prise en charge d'une infection après arthroplastie induit un surcoût important tant en moyens humains, matériels que financiers. Sachant que l'on s'oriente de plus en plus vers une chirurgie orthopédique ambulatoire pour les poses de prothèses de première intention, Klouche *et al.* rapportent une durée moyenne d'hospitalisation de $7,5 \pm 1,8$ jours pour les PTH de première intention, $8,9 \pm 2,2$ jours pour les reprises aseptiques contre $30,6 \pm 14,9$ jours pour les reprises septiques (Klouche *et al.*, 2010). Le coût des reprises de PTH septiques était 3,6 fois plus élevé que pour les PTH de première intention : les coûts hors coût social étaient de 9028 euros pour les PTH de première intention contre 32 546 euros pour les reprises septiques (Klouche *et al.*, 2010). Sur l'année 2008, les données PMSI rapportaient un coût total direct des séjours pour infection ostéo-articulaire de 259 millions d'euros. Ces coûts sont encore plus élevés aux Etats-Unis où les dépenses relatives aux infections dépassaient les 900 millions de dollars en 2012 et étaient estimées à 1,6 milliards de dollars pour 2020 (Kurtz *et al.*, 2012).

Tableau 5. Epidémiologie microbienne des infections sur prothèse ostéo-articulaires (Tande et al., 2014).

Infection	% of patients with prosthetic joint infection					
	Hip and knee		Hip ^c	Knee ^c	Shoulder ^d	Elbow ^e
	All time periods ^a	Early infection ^b				
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	38	13	23	18	42
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	27	22	30	23	41	41
<i>Streptococcus</i> species	8	4	6	6	4	4
<i>Enterococcus</i> species	3	10	2	2	3	0
Aerobic Gram-negative bacilli	9	24	7	5	10	7
Anaerobic bacteria	4	3	9	5		
<i>Propionibacterium acnes</i>					24	1
Other anaerobes					3	0
Culture negative	14	10	7	11	15	5
Polymicrobial	15	31	14	12	16	3
Other	3					

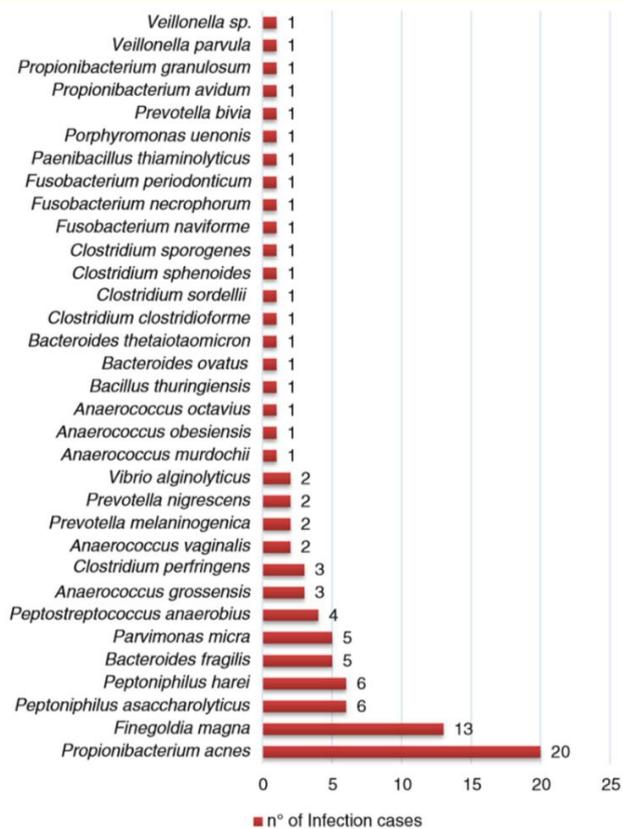


Figure 31. Distribution des bactéries anaérobies dans les infections ostéo-articulaires (Walter et al., 2014).

2. Epidémiologie microbienne

Les principaux micro-organismes responsables des IPOAs sont les cocci à Gram positif (70 %) notamment les staphylocoques. Ces derniers sont observés dans plus de 50% des cas. Ils sont suivis par les streptocoques (environ 10 %) et les entérocoques (environ 10 %) (Del Pozo *et al.*, 2009; Tande *et al.*, 2014). Les Entérobactéries sont responsables d'un peu plus de 10 % des cas. Les anaérobies, représentés principalement par *C. acnes* (Walter *et al.*, 2014) (Figure 31), représentent 5 à 10 % des cas (Del Pozo *et al.*, 2009; Titécat *et al.*, 2013; Tande *et al.*, 2014). La proportion d'IPOAs associées à une culture négative varie significativement d'une étude à l'autre. Le pourcentage des cas avec culture négative varie entre 5 et 34% des cas (Tande *et al.*, 2014). Cette variabilité est multifactorielle : L'antibiothérapie préalable aux prélèvements, la définition d'une culture positive, le nombre de prélèvements per-opératoires analysés ainsi que les techniques de diagnostic microbiologique utilisées.

Les résultats microbiologiques de 14 grandes études incluant plus de 2 400 patients pris en charge principalement pour arthroplastie de la hanche ou du genou ont été analysés par Tande *et al.* en 2014 (Tande *et al.*, 2014). L'épidémiologie de ces cas est résumée dans le Tableau 5 en fonction de l'articulation concernée. Les 14 études représentent un éventail large de différentes stratégies chirurgicales, de pays et de période de temps. Cette revue montre que l'épidémiologie microbienne peut varier en fonction du délai d'apparition de l'infection. En effet, *S. aureus* et les BGN aérobies sont responsables de plus de 60 % des infections précoces (survenant dans le mois ou dans les 3 mois après la pose de l'implant, en fonction de l'étude). D'une façon surprenante, les IPOAs à SCN et les infections plurimicrobiennes représentent une part importante des IPOAs précoces.

Tableau 6. Distribution des espèces bactériennes isolées entre 2002 et 2011 dans les prélèvements ostéo-articulaires réalisés dans les services de chirurgie orthopédique et traumatologique du centre hospitalo-universitaire de Lille, France (Titécat *et al.*, 2013).

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Mean (±SD)	Mean % (±SD)
<i>Gram-positive cocci</i>	446	326	345	342	342	348	331	331	388	339	354 (±37)	70.7 (±4.2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	122	81	82	73	83	94	90	114	114	97	95 (±17)	19.1 (±2.4)
CoNS	247	184	187	208	202	195	175	151	204	173	193 (±26)	38.4 (±4.3)
<i>Enterococcus spp.</i>	36	27	23	21	21	26	23	33	24	32	27 (±5)	5.3 (±0.9)
<i>Streptococcus spp.</i>	41	33	50	40	34	32	38	32	46	37	38 (±6)	7.7 (±1.3)
Other GPCs	0	1	3	0	2	1	5	1	0	0	1 (±2)	0.3 (±0.3)
<i>GNB, Enterobacteria</i>	71	50	47	58	48	65	62	73	63	77	61 (±11)	12.3 (±1.7)
<i>Proteus spp.</i>	20	14	19	22	12	21	14	22	15	21	18 (±4)	3.6 (±0.7)
<i>Enterobacter spp.</i>	31	12	13	15	19	19	16	17	12	15	17 (±6)	3.4 (±0.9)
<i>E. coli</i>	8	15	6	12	6	18	18	17	19	18	14 (±5)	2.7 (±1.0)
Other GNBs	12	9	9	9	11	7	14	17	17	23	13 (±5)	2.5 (±0.9)
<i>Nonfermenting GNB</i>	21	29	33	27	28	29	22	18	23	22	25 (±4)	5.1 (±1.2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	24	28	21	20	20	7	14	14	17	18 (±6)	3.6 (±1.2)
<i>Anaerobic bacteria</i>	11	23	26	39	53	60	39	46	47	55	40 (±16)	8.0 (±2.9)
<i>Propionibacterium acnes</i>	8	18	21	32	38	42	30	33	37	32	29 (±10)	5.8 (±2.0)
<i>Gram-positive bacilli</i>	13	6	14	14	20	18	22	24	25	29	19 (±7)	3.7 (±1.3)
Other bacteria/yeasts	0	1	1	0	1	4	4	1	6	0	2 (±2)	1.8 (±2.1)
Total (n = 5006)	562	435	466	480	492	524	480	493	552	522	501 (±39)	

CoNS: coagulase-negative staphylococcus; GPC: Gram-positive cocci; GNB: Gram-negative bacilli.

Les IPOAs tardives (de 3 mois à 2 ans après la pose de l'implant) sont typiquement liées à des microorganismes peu virulents tels que les SCN, les entérocoques. Les infections plus tardives (au-delà de 1 à 2 ans après la pose de l'implant) sont essentiellement hémotogènes et dues principalement à *S. aureus* alors que des microorganismes peu virulents peuvent être tout de même impliqués dans ce type d'infection.

L'épidémiologie microbienne peut également varier en fonction de l'articulation concernée par l'implant. Les anaérobies, dont *C. acnes*, sont plus fréquents dans les IPOAs de hanche que de genou. Les IPOAs d'épaule sont plus souvent dues à *C. acnes* que les IPOAs des autres articulations. Les proportions des IPOAs causées par *S. aureus* et les SCN semblent être équivalentes, tous types d'IPOA confondus, mais les SCN sont plus fréquents que *S. aureus* dans les IPOAs d'épaule et de hanche alors qu'ils constituent une proportion équivalente dans les IPOAs de genou.

L'épidémiologie microbienne semble par ailleurs relativement constante dans le temps. Titecat *et al.* l'ont démontré sur une large étude monocentrique s'étendant sur une période de 10 ans. Tous les microorganismes ont été retrouvés à une fréquence comparable sur cette période, à l'exception de *C. acnes* pour lequel on note une augmentation de cas (8 cas en 2002 vs 32 en 2011) probablement expliquée par une amélioration des techniques diagnostiques (Titécat *et al.*, 2013) (Tableau 6).

3. Définition

Plusieurs groupes d'experts dont des groupes français (SPILF, 2009 ; HAS, 2014), ont émis des recommandations sur les critères diagnostiques d'une infection sur prothèse ostéo-articulaire. Les deux recommandations les plus récentes et plus utilisées dans

la littérature sont américaines et émanent respectivement du groupe d'experts MSIS (Musculoskeletal Infection Society) l'IDSA (Infectious Diseases Society of America).

Le groupe d'experts MSIS (Musculoskeletal Infection Society) a émis des recommandations en 2011 (Parvizi *et al.*, 2011). Dans ces recommandations, une IPOA est considérée comme certaine si :

- Une fistule périprothétique est présente
- Si un germe pathogène est isolé dans au moins 2 prélèvements de tissus ou de liquide périprothétiques. Il a été précisé qu'un germe est considéré comme identique sur les bases phénotypiques et les données de sensibilité aux antibiotiques, l'identité « génétique » ne pouvant pas être réalisée actuellement en routine.
- Au moins 4 de ces critères suivants existent :
 - Vitesse de sédimentation et CRP (C-Reactive Protein) élevée
 - Nombre de leucocytes élevé dans le liquide synovial
 - Pourcentage de Polynucléaires neutrophiles (PNN) élevé dans le liquide synovial
 - Présence de pus dans l'articulation
 - Culture d'un germe dans un seul prélèvement de tissu ou liquide périprothétique
 - Examen histologique de tissus périprothétiques avec > 5 PNN/champs dans 5 champs différents (9400 grossissement)

Une IPOA reste possible en présence de moins de 4 des critères ci-dessus.

Concernant les précisions microbiologiques, la MSIS recommande la réalisation d'au moins 3 mais pas plus de 5 prélèvements de tissus ou liquide périprothétiques, de les

cultiver dans des conditions aérobies et anaérobies en précisant que la durée d'incubation reste à standardiser. Isoler dans un seul prélèvement un germe potentiellement contaminant en l'absence d'autres critères ne permet pas de poser un diagnostic certain d'infection alors qu'isoler dans un seul prélèvement un germe virulent tel que *S. aureus* pourrait être considéré comme une IPOA.

Les secondes recommandations émanent de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) en 2012 (Osmon *et al.*, 2013). Le diagnostic d'une IPOA est certain en présence d'au moins une de ces conditions :

- La présence d'une fistule périprothétique
- La présence d'une inflammation aiguë objectivée par l'anatomopathologiste sur l'examen histopathologique des tissus périprothétiques recueillis au moment du retrait de la prothèse ou du débridement chirurgical de la prothèse
- La présence inexplicée de pus autour de la prothèse
- Au moins 2 prélèvements peropératoires ou une combinaison d'une ponction préopératoire et d'un prélèvement peropératoire positifs au même germe. Un même germe est défini sur la base de tests de routine de laboratoire soit l'identification au niveau genre et espèce et le profil de sensibilité aux antibiotiques communément testés. La croissance d'un germe virulent tel que *S. aureus* dans un unique prélèvement correspond dans cette définition à une infection alors que la détection dans un unique prélèvement d'un germe potentiellement contaminant tels que les staphylocoques à coagulase négative ou *C. acnes* nécessite une évaluation plus approfondie et la recherche d'autres arguments pour évoquer une infection.

Malgré la proposition d'éléments clairs diagnostiques, les experts laissent la liberté aux chirurgiens de pouvoir juger d'une infection sur des critères « cliniques » plus subjectifs, dépendants du bon jugement du chirurgien en l'absence des critères détaillés ci-dessus.

A noter que pour un diagnostic microbiologique optimal, l'IDSA recommande d'effectuer au moins 3, idéalement 5 ou 6 prélèvements peropératoires des tissus périprothétiques ou de la prothèse retirée et de réaliser des cultures aérobies et anaérobies.

4. Classification

Des classifications basées sur le mode de contamination, la durée des symptômes ainsi que le délai entre la chirurgie de la pose de l'implant et le début des symptômes cliniques (intervalle libre) ont été proposées pour caractériser les infections sur prothèse ostéo-articulaire.

4.1. Classification de Tsukayama (1996)

Cette classification distingue l'infection postopératoire précoce (moins d'un mois postopératoire) ; l'infection chronique, retardée se manifestant plus d'un mois après l'intervention ; l'infection aiguë hématogène survenant dans un contexte bactériémique avec une présentation clinique aiguë et enfin l'infection méconnue, révélée par la positivité des prélèvements microbiologiques peropératoires lors de la reprise d'une prothèse descellée considérée *a priori* comme aseptique (Tsukayama *et al.*, 1996).

4.2. Classification de Zimmerli (2004 ; 2014)

La classification de 2004 distingue les infections précoces sur prothèse (jusqu'à 3 mois post-opératoires), retardées (entre 3 et 24 mois), et chroniques (plus de 24 mois). Cette classification est jugée cliniquement peu pertinente par les cliniciens car ne

permet pas de choisir une attitude thérapeutique en fonction du type d'infection (Zimmerli *et al.*, 2004).

L'équipe de Zimmerli a proposé en 2014 une nouvelle classification (Zimmerli, 2014) séparant :

- les infections aiguës hématogènes : infection se déclarant sur une prothèse initialement asymptomatique et dont la durée d'évolution est inférieure à 3 semaines.
- les infections postopératoires précoces : infection survenant dans le mois suivant l'implantation de la prothèse
- les infections chroniques : infection évoluant depuis plus de 3 semaines et s'étant déclarée après la période postopératoire précoce.

Cette dernière classification est celle adoptée par les chirurgiens car guide le choix de leur geste chirurgical : les infections postopératoires précoces et les infections aiguës hématogènes seront éligibles à un traitement conservateur correspondant à un débridement, une excision et un lavage des tissus périprothétiques infectés avec un maintien de l'implant infecté (DAIR). Les infections chroniques ne seront efficacement traitées que par l'ablation totale de l'implant infecté.

III. *C. acnes* dans les infections sur matériel ostéo-articulaire

1. Epidémiologie, topographie et porte d'entrée

Les IPOAs à *C. acnes* représenteraient 10 % des IPOAs en général, chiffre en augmentation avec l'utilisation de techniques microbiologiques plus adaptées pour sa culture (Trampuz *et al.*, 2007). En effet, initialement, la prévalence était estimée à 5% (Tsukayama *et al.*, 1996).

C. acnes est connu pour être le premier germe responsable d'IPOA d'épaule. En effet, *C. acnes* serait responsable de plus de la moitié des IPOAs d'épaule (Namdari *et al.*, 2019). L'incidence d'une IPOA à *C. acnes* est de 0,9 à 1,9 % suite à une arthroplastie d'épaule (Kadler *et al.*, 2015). Toutes les autres articulations peuvent être également concernées par les IPOAs à *C. acnes* (hanche, genou, coude...). Sur une étude monocentrique s'étendant sur une période de 10 ans, Kanafani *et al.* ont évalué l'incidence d'une IPOA à *C. acnes* de 6,63/1000 pour l'épaule, 0,89/1000 pour la hanche ou le coude (Kanafani *et al.*, 2009).

Dans les séries de Kanfani *et al.* , et de Lavergne *et al.*, les IPOAs d'épaule constituent la majorité des IPOAs de la série (30/40-75% ; 17/24-70.8%). Par ailleurs, Zeller *et al.* décrivent une série de 50 cas d'IPOA à *C. acnes* dont la majorité (34/50-68%) concernait la hanche, 20% (10/50) concernait le genou et seulement 12% (6/50) touchait l'épaule. Renz *et al.* décrivent une série de 62 cas d'IPOA à *C. acnes* dont la majorité (30/62-48%) concernait la hanche, 19% (12/62) concernait le genou et seulement 30% (19 /62) touchait l'épaule (Zeller *et al.*, 2007; Kanafani *et al.*, 2009; Lavergne *et al.*, 2017; Renz *et al.*, 2018). Les poses de prothèses d'épaule étant plus rares que les poses de prothèses de hanche et de genou, cette variabilité inter-étude

pourrait s'expliquer par une différence de recrutement chirurgical initial entre les différents services chirurgicaux concernés.

Les différentes équipes sont assez unanimes sur le fait que la contamination par *C. acnes*, bactérie commensale de la peau, se fait par la peau du patient d'autant plus que i) *C. acnes* est surtout rencontré dans les IPOAs d'épaule chez les patients de sexe masculin. L'épaule étant la zone la plus riche en glandes sébacées et en *C. acnes*, notamment chez les personnes de sexe masculin et que ii) des études récentes ont montré l'inefficacité de la désinfection cutanée sur la population cutanée de *C. acnes* (Lee *et al.*, 2014; Phadnis *et al.*, 2016; Heckmann *et al.*, 2018).

2. Présentation clinico-biologique et terrain

2.1. Données démographiques et chirurgicales

Il est admis que les IPOAs en général et particulièrement à *C. acnes* concernent principalement les patients de sexe masculin. D'ailleurs, Kanafani *et al.*, ont déterminé par une analyse multivariée le sexe masculin comme un des deux seuls paramètres prédictifs d'une IPOA à *C. acnes* (Kanafani *et al.*, 2009). Cependant, ceci n'était pas le cas dans les séries de Zeller *et al.*, et de Renz *et al.* dans lesquelles 48 % (24/50) et 37 % (23/62) étaient de sexe féminin, respectivement (Zeller *et al.*, 2007; Renz *et al.*, 2018). Bien que ce résultat soit surprenant, ceci peut être expliqué par le fait que ces deux séries soient les seules de la littérature qui comprennent une part majoritaire d'IPOA à *C. acnes* touchant des articulations autres que l'épaule. La moyenne d'âge des patients variait entre 50 et 66 ans, en fonction des séries (Zeller *et al.*, 2007; Kanafani *et al.*, 2009; Lavergne *et al.*, 2017; Renz *et al.*, 2018).

Une notion d'interventions chirurgicales antérieures, en dehors de la pose de l'implant, était rapportée dans la majorité des cas, à une fréquence allant jusqu'à 76 % des cas

(Zeller *et al.*, 2007) avec plus de la moitié ayant eu deux interventions antérieures. La notion d'interventions antérieures était également définie comme un facteur de risque prédictif d'une IPOA à *C. acnes* par Kanafani *et al.* (Kanafani *et al.*, 2009).

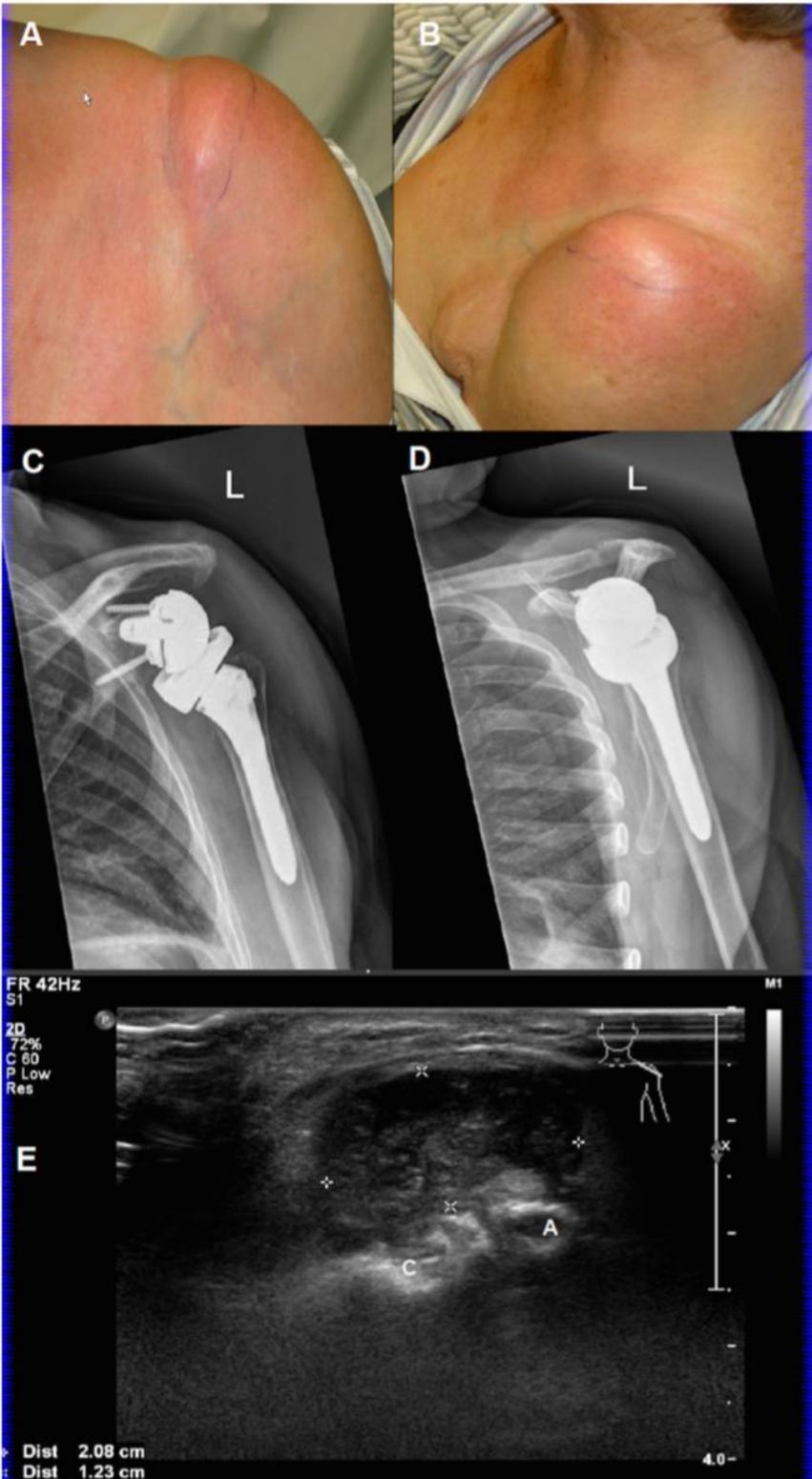


Figure 32. Infection sur prothèse d'épaule gauche chez une patiente de 82 ans (Achermann *et al.*, 2014).

2.2. Présentation clinique (Figure 32)

L'intervalle libre médian des IPOAs à *C. acnes* est variable d'une étude à une autre, témoignant de la variabilité majeure dans le délai d'apparition de signes cliniques de cette infection. Il peut aller de 8 jours à 10 ans. Dans la série la plus récente et la plus large de cas d'IPOA à *C. acnes*, 7 % des infections étaient diagnostiqués dans les 3 mois, 37 % entre 3 mois et 1 an et 57 % des cas au-delà de 1 an (Renz *et al.*, 2018).

Cliniquement, l'infection peut être bruyante avec des signes inflammatoires locaux (environ 30 % des cas), plus exceptionnellement avec des signes systémiques d'infection (de 1 à 16 % des cas) (Zeller *et al.*, 2007; Renz *et al.*, 2018). Les signes inflammatoires locaux seraient plus présents quand il s'agit d'une infection survenant dans les 2 ans après la pose de l'implant (Zeller *et al.*, 2007). Dans la majorité des cas, la clinique des IPOAs à *C. acnes* se résume à une douleur et/ou une raideur au niveau de l'articulation (67% des cas). Ces signes sont les plus fréquents chez les patients atteints d'IPOA à *C. acnes* (80 %-Renz *et al.*) (Renz *et al.*, 2018). Des signes radiologiques (descellement de l'implant, ostéolyse..) sont observés dans 30 à 70% des cas selon les séries (Kanafani *et al.*, 2009; Renz *et al.*, 2018). Zeller *et al.* rapportent un diagnostic purement microbiologique dans 38 % des cas (19 cas sur 50) (Zeller *et al.*, 2007).

De par la pauvreté des signes cliniques, certains auteurs considèrent que les IPOAs à *C. acnes* sont considérablement sous-estimées, qu'une part importante des descellements considérés comme aseptiques et ne justifiant pas de culture microbiologique, seraient des IPOAs (Nelson *et al.*, 2005). Vingt pour cent (20 %) de descellements aseptiques de prothèses avaient une culture positive à *C. acnes* laissant penser qu'il s'agissait d'une IPOA à *C. acnes*. Ceci reste cependant à prouver

d'autant plus qu'il a été observé que la survie de l'implant n'était pas réduite dans le temps en présence d'une culture positive à *C. acnes* (Portillo *et al.*, 2013).

2.3. Présentation biologique

2.3.1. Biomarqueurs sériques

a) Biomarqueurs sériques de l'IPOA en général

Les marqueurs biologiques de l'inflammation sont des moyens diagnostiques précieux pour l'IPOA car ils peuvent permettre de confirmer ou infirmer un diagnostic d'IPOA et de motiver ou éviter, un geste chirurgical beaucoup plus invasif lorsque l'étiologie infectieuse a été retenue. Ces marqueurs ont un intérêt pour les IPOAs dues aux bactéries « conventionnelles » telles que *S. aureus*, streptocoques mais font malheureusement défaut quand il s'agit d'IPOAs chroniques dues à des germes de faible virulence (Pérez-Prieto *et al.*, 2017), comme *C. acnes*. Plusieurs nouveaux marqueurs ont été proposés les dernières années mais n'ont pas encore été adoptés à large échelle en raison de leur coût élevé associé à l'apport minime qu'ils apportent comparé aux marqueurs classiques que sont la CRP (C-reactive Protein), la VS (Vitesse de sédimentation) ou le nombre de leucocytes et le pourcentage de polynucléaires neutrophiles dans le liquide articulaire. Une vitesse de sédimentation et une CRP élevées font partie des critères diagnostiques d'une IPOA proposés par la MSIS mais ne le sont pas dans ceux proposés par IDSA (Parvizi *et al.*, 2011; Osmon *et al.*, 2013). Ces derniers recommandent tout de même de les réaliser en l'absence de données cliniques évidentes d'IPOA. L'association des résultats de la VS et la CRP permet d'améliorer significativement la sensibilité (74-97 %) mais fait toujours défaut en termes de spécificité (40-92 %) (Ghanem *et al.*, 2009; Piper *et al.*, 2010; Alijanipour *et al.*, 2013). Le test sérologique BJI Inoplex® développé par Marmor *et al.* (Marmor *et al.*, 2016), basé sur la détection d'anticorps sériques dirigés contre les

staphylocoques (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. lugdunensis*), *Streptococcus agalactiae* et *C. acnes*, présente des valeurs de sensibilité/spécificité de 72,3 %/80,7 %, 75 %/92,6 %, et 38,5 %/84,8 %, respectivement. Il a permis de détecter 64,3 % et 58,3 % des IPOAs staphylococciques associées à une valeur de CRP et VS normales, respectivement. Ce test évalué en prospectif sur une cohorte de 71 patients a montré une sensibilité et spécificité de 86,7 % et 96,1 %, respectivement (de Seynes *et al.*, 2018).

b) Biomarqueurs sériques de l'IPOA à *C. acnes*

La CRP est inconstamment élevée pour les patients atteints d'IPOA à *C. acnes*. Elle dépasse dans 30 à 50 % des cas la valeur seuil de 10 mg/L, proposée dans la littérature. Les valeurs de la CRP ne sont pas rapportées par patient dans la littérature mais la valeur médiane tourne autour de 7mg/L avec un 3^{ème} IQR de l'ordre de 30mg/L et une valeur supérieure extrême de 40mg/L.

La vitesse de sédimentation est exceptionnellement évaluée dans les principales séries d'IPOA à *C. acnes*. La valeur moyenne serait de l'ordre de 30 mm (1^{ère} heure), correspondant au seuil de positivité proposé. La leucocytose est exceptionnellement élevée. Renz *et al.* rapportent une hyperleucocytose dans 14% des cas (Renz *et al.*, 2018).

Le test BJI Inoplex manque de sensibilité (38,5%) pour les IPOAs à *C. acnes*. ceci est dû au nombre limité d'antigènes (4 antigènes) spécifiques à *C. acnes* inclus dans le test. L'élargissement du panel d'antigènes permettrait d'améliorer la sensibilité du test et éventuellement de s'affranchir des limites de la CRP et la VS dans le diagnostic des IPOAs à *C. acnes*.

2.3.2. Marqueurs biologiques et histopathologiques périprothétiques

En association avec le diagnostic microbiologique réalisé sur les prélèvements peropératoires ou périopératoires de la prothèse, des tissus périprothétiques et du liquide synovial, des marqueurs peuvent orienter vers le diagnostic d'une infection. Il s'agit principalement du taux de leucocytes observés dans le liquide et les données histopathologiques obtenues à partir des tissus péri-prothétiques. Ces marqueurs ne sont pas applicables à une infection à *C. acnes*.

Pour les IPOAs à *C. acnes*, Butler *et al.* ont montré, sur une série de 23 cas, que seuls 40 % des infections sont associées à des signes anatomopathologiques d'inflammation (Butler-Wu *et al.*, 2011a). Ces derniers sont observés dans 70 % des cas sur une série de 46 cas décrite par Renz *et al.* Quant au taux de leucocytes dans le liquide synovial, il serait augmenté (>2000 leucocytes/mm³) dans 73 % des cas (22/30) (Renz *et al.*, 2018).

3. Diagnostic microbiologique des IPOAs à *C. acnes*

L'isolement de *C. acnes* dans les prélèvements per-opératoires d'IPOA dans des délais corrects permettant une prise en charge diagnostique et thérapeutique optimale des patients. Ceci constitue un défi quotidien pour les laboratoires de microbiologie.

En raison de la faible prévalence des IPOAs à *C. acnes* et du panel très large des moyens techniques utilisés pour le diagnostic de ces infections des fois même au sein d'un même laboratoire sur la période d'étude, il est difficile de trouver dans la littérature des données solides prouvant la supériorité d'une technique de prétraitement d'un prélèvement per-opératoire et/ou d'un milieu de culture vis-à-vis d'un autre.

3.1. Prétraitement du prélèvement

Différentes techniques ont été utilisées dans les études : du broyage par des billes en verre, ou en inox des tissus périprothétiques à la sonication des implants retirés en passant par le mélange par Stomacher. Il est malheureusement impossible de définir la technique optimale de prétraitement d'autant plus que ces techniques sont associées à des milieux de culture différents. La seule étude à partir de laquelle une conclusion pourrait être tirée concernant ce point est celle de Renz *et al.* qui sur 70 cas d'IMOA à *C. acnes*, montre que le sonicat d'une prothèseensemencée dans du thioglycolate a une sensibilité comparable à un tissu périprothétique non prétraitéensemencé également dans du thioglycolate (Renz *et al.*, 2018).

Des études incluant toutes les espèces bactériennes ont montré une meilleure sensibilité quand un prétraitement du prélèvement (broyage ou sonication) est associé à l'incubation dans des flacons d'hémocultures. Il est par contre impossible de savoir si cette amélioration est liée au prétraitement et/ou aux milieux de culture (Minassian *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015; Peel *et al.*, 2016).

3.2. Choix des milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont divers et variés. Nous retrouvons principalement, en milieux solides, la gélose chocolat PVX incubée en présence de CO₂ et le milieu Brucella Agar supplémenté en sang de mouton incubé en anaérobiose. Les milieux liquides d'enrichissement utilisés sont : le milieu BHI (Brain Heart Infusion), le milieu thioglycolate ou les flacons d'hémoculture (BD Lytic/ F anaerobic ou BactT/alert FAN).

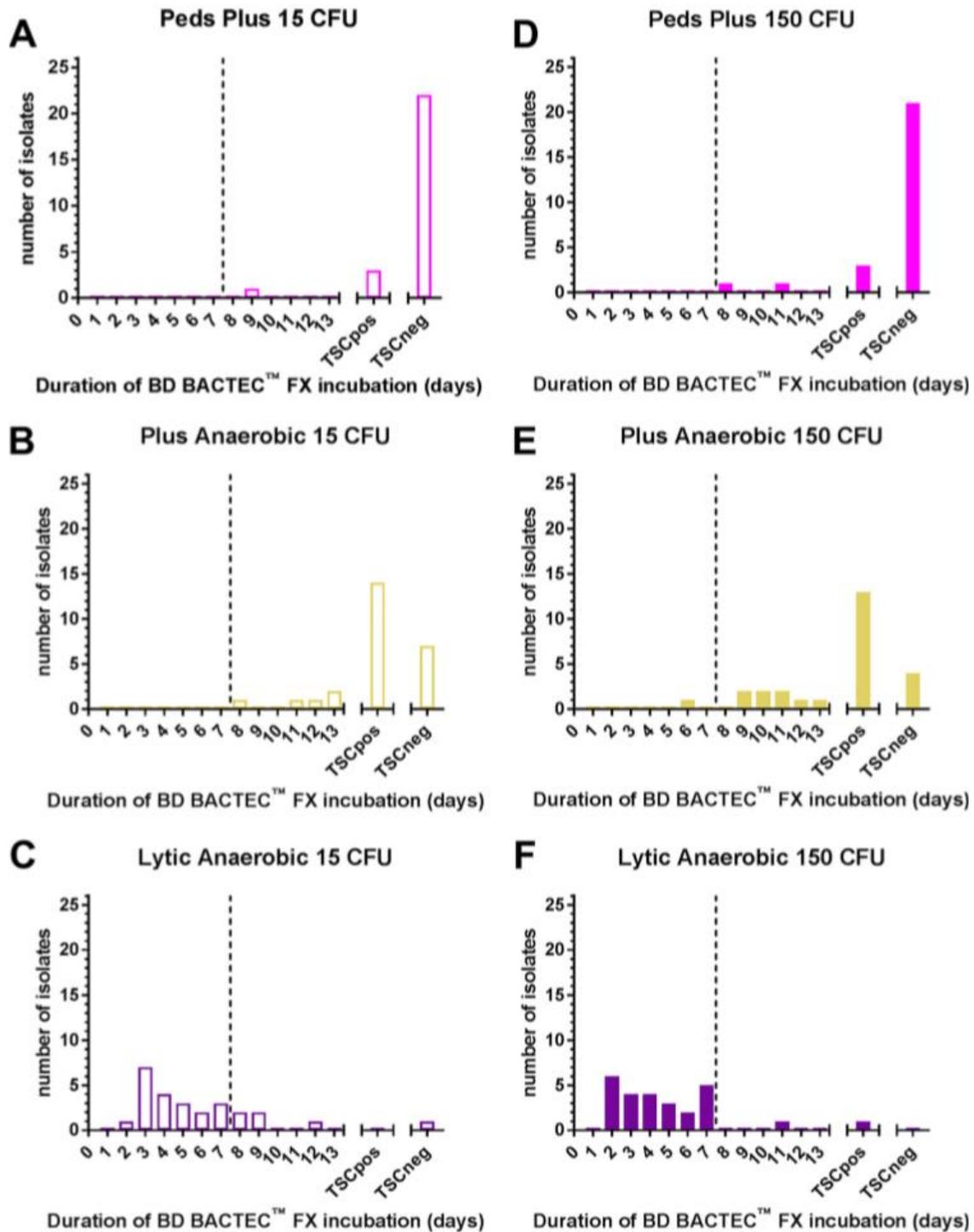


Figure 33. Temps de détection des isolats de *C. acnes* en subculture (Rentenaar *et al.*, 2018).

Il n'y a pas eu d'étude ciblée cherchant à comparer la capacité des différents milieux à détecter *C. acnes* à partir des prélèvements per-opératoires mais Butler *et al.* ont conclu qu'aucun milieu n'a montré sa supériorité comparé aux autres (Butler-Wu *et al.*, 2011a). Rentenaar *et al.* ont évalué la détection de subculture de 26 isolats de *C. acnes* isolés principalement d'infections ostéo-articulaires, dans différents flacons d'hémoculture. Comme attendu, le flacon Ped Plus (aérobie) ne permet de détecter que 2 isolats sur 26 alors que les flacons anaérobies BD ana et BD Lytic permettent de détecter respectivement 9/26 et 25/26. En plus d'un taux de détection plus élevé dans le BD Lytic, comparé au BD ana, la détection des isolats est plus rapide : La majorité des isolats sont détectés dans les 7 jours d'incubation pour BD Lytic et au-delà de 7 jours dans BD Ana Plus (Rentenaar *et al.*, 2018) (Figure 33). A partir de cultures primaires, il semblerait qu'une incubation de plus de 7 jours des flacons BD Lytic soit nécessaire pour détecter toutes les IPOAs à *C. acnes* (Minassian *et al.*, 2014).

3.3. Temps de détection et durée d'incubation des milieux

Une incubation au-delà de 14 jours n'est pas justifiée et ne permet que la détection de contaminants (Butler-Wu *et al.*, 2011a). De même, un repiquage systématique des milieux de culture liquides n'apporte rien au diagnostic des IPOAs à *C. acnes* (Minassian *et al.*, 2014). Malgré la variabilité des techniques utilisées dans les différentes séries, les avis sont unanimes sur la nécessité de prolonger l'incubation des milieux jusqu'à 10-14 jours. En effet, bien que le temps médian de détection de *C. acnes* tourne autour de 6-7 jours et que le premier isolat de *C. acnes* d'une série de prélèvements per-opératoires est détectée en moyenne à 5 jours, certains isolats restent détectables au-delà de 10 jours voire 13 jours d'incubation. Ces isolats à détection tardive seraient majoritairement des contaminants – le temps de détection

des isolats contaminants étant plus long que celui des infectants (Butler-Wu *et al.*, 2011a; Frangiamore *et al.*, 2015; Bossard *et al.*, 2016). Cependant, des isolats infectants continuent à être détectés entre 7 et 14 jours d'incubation : 21% à 50% des IPOAs à *C. acnes* ont été détectées au-delà de 7 jours d'incubation (Bossard *et al.*, 2016; Renz *et al.*, 2018).

Une seule étude a évoqué un lien entre le nombre de milieux de culture positifs par prélèvement et la signification de *C. acnes*. Selon cette étude, la positivité d'au moins 3 milieux de culture différents par prélèvement signe l'infection. La positivité d'au moins 2 prélèvements est fortement évocatrice d'une infection. Ce lien n'a pas été retrouvé dans les études ultérieures (Butler-Wu *et al.*, 2011a).

4. Sensibilité aux antibiotiques

C. acnes est naturellement sensible à un grand nombre d'antibiotiques : les β -lactamines, les quinolones, les cyclines, les macrolides et la rifampicine. Il est naturellement résistant au métronidazole et la fosfomycine. A noter qu'il n'existe à ce jour aucun consensus européen ou américain sur les « breakpoints » des antibiotiques pour *C. acnes* en particulier. Les résistances acquises restent rares et concernent notamment les classes d'antibiotiques utilisés couramment comme antibiotiques locaux dans le traitement de l'acné (cyclines, macrolides). Une étude européenne incluant 13 pays et 314 isolats de *C. acnes* recueillis dans des hémocultures ou de prélèvements de tissus profonds, a montré un taux de résistance de 2,6 % à la tétracycline, 15,1 % à la clindamycine et 17,1 % à l'érythromycine. Aucun isolat n'a été catégorisé comme résistant au linézolide, à la pénicilline G ou à la vancomycine. A noter qu'une disparité importante de taux de résistance aux antibiotiques a été

observée entre les pays, probablement expliquée par les différentes politiques d'usage d'antibiotiques (Oprica *et al.*, 2005).

Tableau 7. Classification des IPOAs à *C. acnes* selon Lutz *et al.* (Lutz *et al.*, 2005).

Group	Type of infection	Clinical signs of infection	Number of PBA+ samples
I	Certain	Present	≥ 2
II	Probable	Present	1
III	Possible	Absents	≥ 1

Tableau 8. Critères diagnostiques en faveur d'une IPOA à *C. acnes* selon Asseray *et al.* (Asseray *et al.*, 2010).

Number of PBA+ samples	Number of associated signs	Including:
≥ 2	+1	History of ≥ 2 local surgeries, presence of orthopedic implant, local signs of infection, intraoperative abnormalities (i.e., loosening)
1	+3	History of ≥ 2 local surgeries, presence of orthopedic implant, local signs of infection, inflammatory syndrome, intraoperative abnormalities (i.e., loosening)

Dans la population ostéo-articulaire de *C. acnes*, les résistances acquises décrites concernent la clindamycine et les quinolones seulement (Crane *et al.*, 2013; Khassebaf *et al.*, 2015). Renz *et al.* n'ont détecté aucune résistance acquise aux principales classes d'antibiotiques sur une trentaine d'isolats (Renz *et al.*, 2018). Butler S. *et al.* ont détecté une résistance à la clindamycine dans 4.7% des cas. Les autres classes d'antibiotiques étaient épargnées (Butler-Wu *et al.*, 2011a). Khassebaf *et al.* ont décrit un taux de résistance de 9,1% (5/55) à la clindamycine et de 1,8% (1/55) à la moxifloxacine (Khassebaf *et al.*, 2015). Aucun isolat n'a acquis une résistance à deux classes d'antibiotiques.

Des isolats ostéo-articulaires résistants à la rifampicine ont été exceptionnellement rapportés dans la littérature et leur mécanismes de résistance étudiés : Il s'agissait de mutations dans le gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN-polymérase. Ces mutations ont été détectées au sein du phylotype I (acides aminés 418 à 444) et II (acides aminés 471 à 486) (Furustrand Tabin *et al.*, 2013; Furustrand Tabin *et al.*, 2015).

5. Diagnostic d'une IPOA à *C. acnes*

Devant la difficulté de faire la part entre infection et contamination d'une prothèse à *C. acnes*, Lutz *et al.* ont proposé en 2005 une classification en infection certaine, probable, ou possible sur la base de données cliniques et biologiques (Lutz *et al.*, 2005) (Tableau 7). Asseray *et al.* ont proposé en 2010 des critères pour distinguer l'infection d'une contamination devant une culture positive à *C. acnes* (Asseray *et al.*, 2010) (Tableau 8).

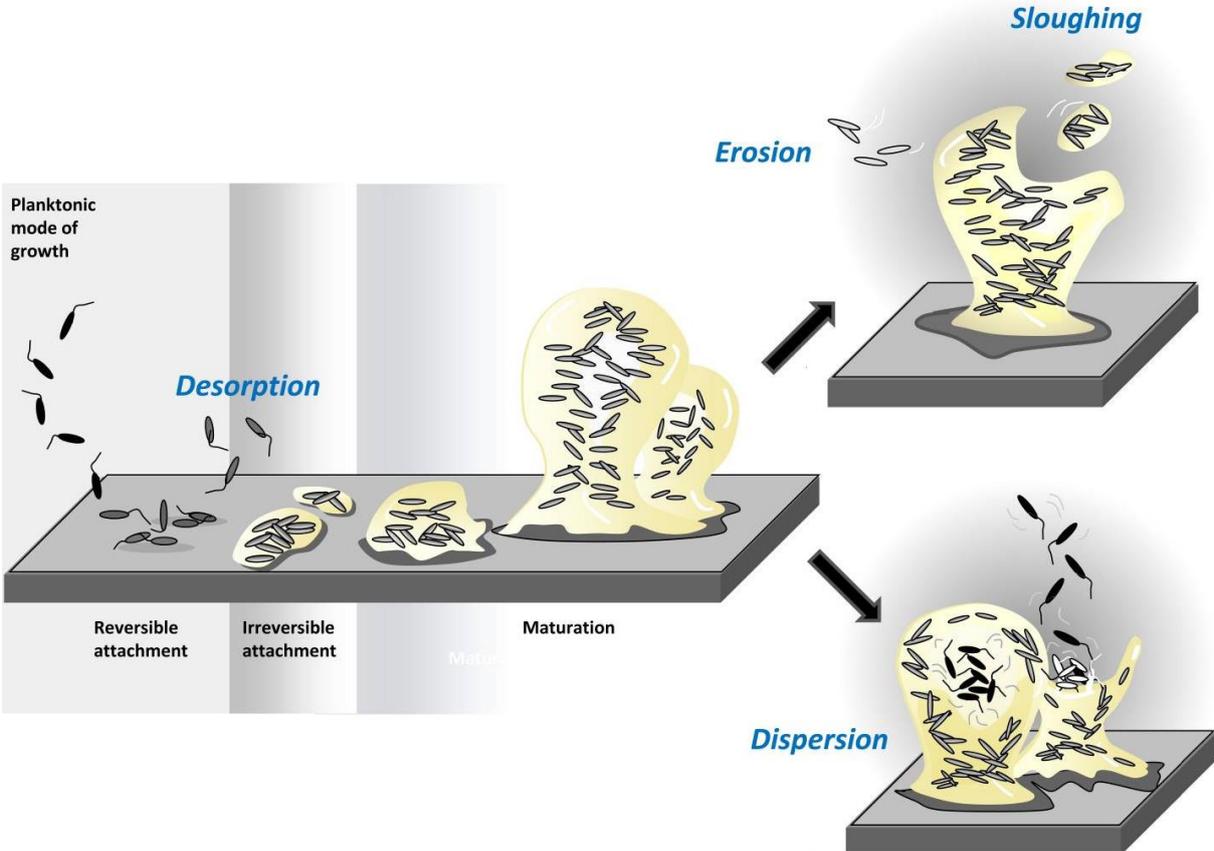


Figure 34. Etapes de formation et d'échappement du biofilm bactérien (Petrova et al., 2016).

Ces initiatives de classification dédiées spécialement à *C. acnes* n'ont pas été adoptées par la communauté scientifique. Les recommandations générales plus récentes sur la prise en charge des IPOAs restent appliquées pour les IPOAs à *C. acnes*.

6. Physiopathologie des IPOAs à *C. acnes*

6.1. Biofilm

Un biofilm est défini comme une communauté sessile de cellules microbiennes qui (i) sont attachées à un substrat, à une interface ou entre elles; (ii) sont piégées dans une matrice de polymères extracellulaires (au moins partiellement produites par les bactéries elles-mêmes; et (iii) présentent un phénotype modifié en ce qui concerne la croissance, l'expression génique et la production de protéines par rapport à celui des cellules bactériennes planctoniques (Archer *et al.*, 2011). La formation du biofilm bactérien est un processus dynamique complexe qui peut être artificiellement décomposé en trois principales étapes (Figure 34) : 1) La première phase serait l'adhérence réversible puis irréversible d'une bactérie à une surface, classiquement inerte, tel qu'un implant ostéo-articulaire. 2) La deuxième phase correspondrait au développement et la maturation du biofilm. Pendant cette étape, les bactéries s'entourent d'une matrice extracellulaire ou « slime » composée de polysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire. Cette phase est marquée également par une modification du métabolisme bactérien avec entre autres une réduction du pouvoir répliatif de la bactérie. On parle alors de bactéries en dormance. 3) La troisième et dernière étape serait marquée par i) le détachement actif de certaines bactéries du biofilm qui se retrouvent à nouveau sous forme planctonique (dispersion), forme leur permettant d'aller coloniser d'autres surfaces, ou ii) le détachement passif de certaines

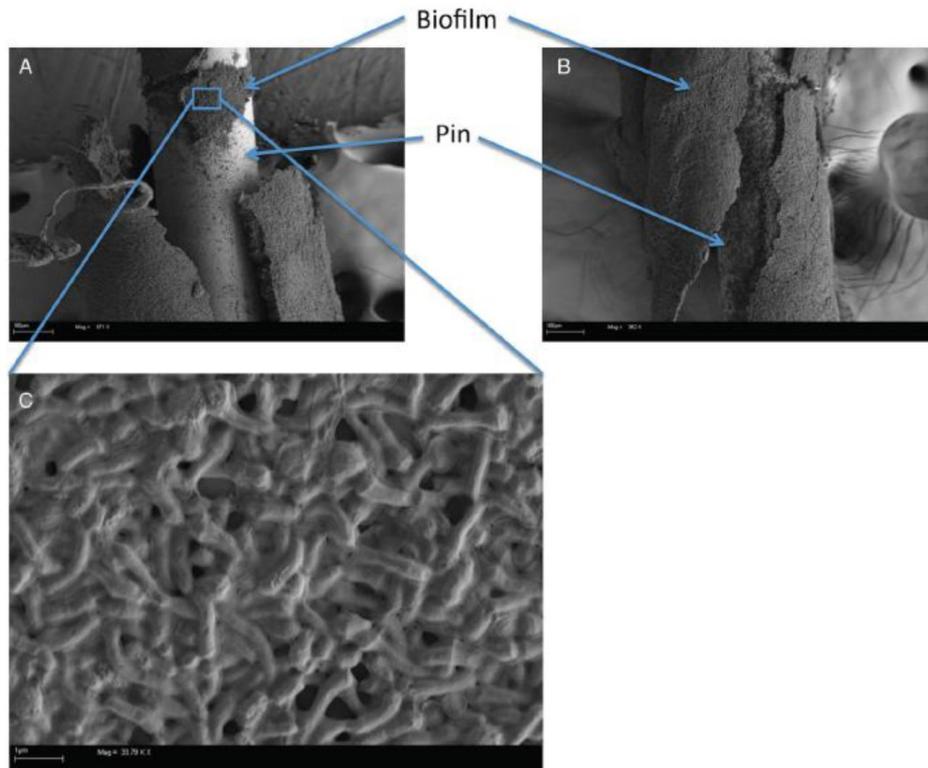


Figure 35. Microscopie électronique du biofilm de la souche de référence *C. acnes* ATCC11827 (IA) sur une tige d'acier inoxydable (Achermand *et al.*, 2014).

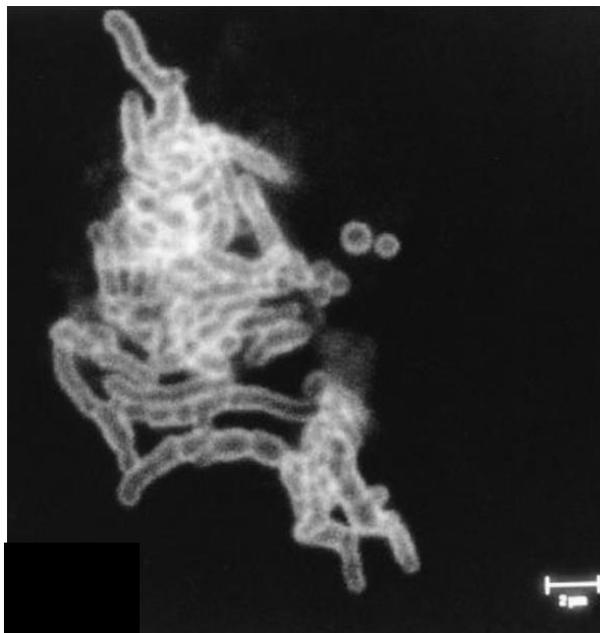


Figure 36. Agrégats de *C. acnes* sur un sonicat d'une prothèse de hanche associée à une culture négative (Tunney *et al.*, 1999).

Image obtenue par microscopie confocale après une fixation par des anticorps monoclonaux spécifiques de *C. acnes* suivie d'une fixation par des anticorps conjugués fluorescents.

bactéries qui se retrouvent altérées (érosion) ou de fragments de biofilm (sloughing ou desquamation) (Montanaro *et al.*, 2011; Petrova *et al.*, 2016) La formation d'un biofilm à la surface des implants ostéo-articulaires constitue une étape clé dans la physiopathologie de ces infections. Sa formation représente un défi aussi bien pour le microbiologiste, l'infectiologue et le chirurgien : En effet, la formation de ce biofilm rend la documentation microbiologique plus difficile, l'antibiothérapie optimale plus difficile à atteindre et le retrait de l'implant indispensable pour éradiquer l'infection.

La capacité des bactéries à développer des infections sur implants ostéo-articulaires serait liée en grande partie à leur capacité à former un biofilm à la surface des implants. *C. acnes* est capable de former un biofilm *in vitro*. Son pouvoir biofilmogène a été démontré sur divers matériaux : du polystyrène (Coenye *et al.*, 2007), des billes de verre (Tafin *et al.*, 2012) et même du titane, de l'acier ou du silicone (Parsek *et al.*, 2003; Bayston *et al.*, 2007), matériaux faisant partie des composants des implants ostéo-articulaires (Figure 35). Le biofilm mature de *C. acnes* se formerait *in vitro* en 18 à 96 heures d'incubation, selon l'inoculum initial, le milieu de culture et la surface utilisés (Ramage *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2008; Holmberg *et al.*, 2009). *C. acnes* serait capable de former un biofilm, notamment sur des surfaces hydrophiles (ex billes de verre, acier inoxydable, plaques en polystyrène traitées pour culture cellulaire). Le biofilm *in vitro* de *C. acnes* a été observé en microscopie électronique et confocale (Figure 35). Il a été mis en évidence pour la première fois *ex vivo*, en 1999 par Tunney *et al.*, en observant, par microscopie confocale, la surface d'une prothèse de hanche déposée pour infection à *C. acnes* (Tunney *et al.*, 1999). La présence d'agrégats cellulaires de *C. acnes* englués en biofilm et attachés à la prothèse a été mise en évidence (Figure 36).

Bien qu'il soit clairement établi que *C. acnes* soit capable de former un biofilm, la composition de ce biofilm et les mécanismes de sa formation restent encore peu explorés. Le biofilm de *C. acnes* aurait une composition comparable à celle du biofilm d'autres bactéries soit de l'ADN extracellulaire, des protéines et des résidus glycosylés (Jahns *et al.*, 2016). *C. acnes* au sein du biofilm module l'expression de certains gènes : les gènes codant la réplication de l'ADN, la division cellulaire et la synthèse de la paroi seraient sous-exprimés alors que le gène codant le facteur de virulence CAMP1 serait surexprimé (Jahns *et al.*, 2016). D'autres études transcriptomiques sont nécessaires pour mieux comprendre le comportement de *C. acnes* au sein d'un biofilm. Comme avec les staphylocoques, les protéines de liaison à la fibronectine, la laminine ou le fibrinogène joueraient un rôle dans la phase primaire de la formation du biofilm de *C. acnes* (Yu *et al.*, 1997; Aubin *et al.*, 2015).

La variabilité du pouvoir biofilmogène entre isolats ne serait pas liée au phylotype de l'isolat mais à son caractère invasif : des souches isolées d'une peau saine seraient moins biofilmogènes que les souches considérées comme invasives (soit les souches isolées au cours d'infections) (Holmberg *et al.*, 2009). Une variation de phase génétique impliquant l'expression d'adhésines (les dermatanes sulfates PPA2127 et PPA2210) a été observée entre isolats. Ceci pourrait avoir un rôle déterminant dans la capacité des souches à former un biofilm (Brzuszkiewicz *et al.*, 2011).

Le rôle pathogène du biofilm de *C. acnes* dépasserait probablement le développement d'une infection monomicrobienne à *C. acnes*. En effet, Tyner *et al.* ont pu démontrer qu'en atmosphère anaérobie, *C. acnes* favorise non seulement la croissance en biofilm de *S. aureus* mais aussi la survie de ce dernier au sein du biofilm (Tyner *et al.*, 2016). Le facteur favorisant la croissance en biofilm de *S. aureus* pourrait être la coproporphyrine III produite par *C. acnes* (Wollenberg *et al.*, 2014).

Tableau 9. Antigènes immunogéniques de *C. acnes* exprimés lors d'une infection chronique d'ostéomyélite de lapin (Achermann *et al.*, 2015).

Protein no.	Full name of protein ^a	Protein name ^b	Best protein accession no. ^c	Function ^d	pI ^e	Molecular mass (kDa)	Expression (biofilm, planktonic, or both)
1	Methylmalonyl-CoA mutase	MutA	E4DBY8	Lactate fermentation to propionate and acetate	4.698	69.111	Both
2	Chaperone protein DnaK	DnaK	W4TZS5	Heat shock protein, ATP binding	4.476	59.03	Both
3	60-kDa chaperonin 1	GroL1	E8CY27	Heat shock protein, protein misfolding, ATP binding	4.613	56.840	Both
4	Pyruvate kinase	PfkA	G5EZ02	Glycolysis	5.01	51.091	Both
5	Phosphoglycerate kinase	Pgk1	Q6A9Z3	Carbohydrate degradation, glycolysis	4.752	42.218	Both
6	DivIVA domain protein	DivVA	E4D8W2	Cell division	5.016	40.124	Both
7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	G7U3V4	Glucose metabolic process	5.485	35.95	Both
8	Malate dehydrogenase	Mdh	Q6A6Z5	TCA cycle	4.831	34.686	Both
9	Carbamate kinase	ArcC	D4HCA4	Arginine metabolism	4.641	31.977	Both
10	Translation elongation factor	Tef	W4TZY5	Protein biosynthesis	4.599	29.648	Both
11	ABC transporter, ATP-binding protein	Abs1	D4HAH2	ATP binding	6.18	26.002	Both
12	2,3-Bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	Bgma	Q6AAL8	Glycolysis	5.981	27.991	Both
13	Methylmalonyl-CoA epimerase	Mce	D4HDR2	Amino acid metabolism, isomerase	5.593	16.84	Both
14	Translation elongation factor G, partial	FusA	F9NNW3	Protein biosynthesis	4.789	76.605	Biofilm
15	Succinate dehydrogenase or fumarate reductase	SdhA	E4E288	Oxidoreductase in carbohydrate metabolism, TCA cycle	5.898	75.667	Biofilm
16	Oxaloacetate decarboxylase	OxdC	G7U7Q6	Glycolysis, oxaloacetate metabolism	5.23	54.690	Biofilm
17	Putative tryptophan 2,3-dioxygenase	Ptd1	E4D811	Aromatic amino acid family metabolic process	5.011	50.782	Biofilm
18	Fumarate hydratase class II	FumC	G7LD95	TCA cycle, fumarate metabolic process	5.512	50.689	Biofilm
19	Elongation factor	Tuf	Q6A6L2	Protein biosynthesis	5.214	44.14	Biofilm
20	RecA protein	RecA	Q5LV36	DNA repair	5.258	37.153	Biofilm
21	Fructose-bisphosphate aldolase class II	FbaA	E4D532	TCA cycle, fumarate metabolic process	5.037	36.771	Biofilm
22	Succinyl-CoA ligase	SucD	E4D6H5	Ligase (e.g., ATP binding)	5.708	30.566	Biofilm
23	Enolase	Eno	Q6AAB8	Glycolysis (cell attachment)	4.418	45.53	Planktonic
24	Pyridoxal 5'-phosphate lyase	PdxS	Q8V9H3	Pyridoxal phosphate biosynthetic process (vitamin B6)	4.788	31.530	Planktonic

^aIdentification and function of the proteins were obtained from the UniProt database of *P. acnes* complete proteome (ID 1.81) (www.uniprot.org). CoA, coenzyme A; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle.

^bThe protein names were used for labeling the protein spots in Fig. 3.

^cAverage values derived from isoelectric point calculator (<http://isoelectric.co.uk.org>).

L'étude du biofilm de *C. acnes* et son implication dans les infections ostéo-articulaires sur des modèles animaux sont rares. Tabin *et al* ont utilisé des cages en Téflon implantées en sous-cutanée chez les cochons d'inde, modèle initialement développé par Zimmerli *et al.* en 1982 (Zimmerli *et al.*, 1982; Tabin *et al.*, 2012). Sur ce modèle, ils ont mis en évidence la capacité de *C. acnes* de persister jusqu'à 50 jours après infection percutanée de la cage.

Achermann *et al.* ont étudié la production de biofilm par *C. acnes* sur un modèle d'ostéomyélite de lapin. A partir d'un modèle d'infection chronique, cette étude a permis d'identifier 13 protéines surexprimées par à la fois les bactéries planctoniques et le biofilm de *C. acnes*, et 9 protéines surexprimées exclusivement par le biofilm de *C. acnes* (Tableau 9). En raison des limites de l'étude – une souche unique de *C. acnes* testée, analyse restreinte des protéines immunogéniques présentes dans le sérum des lapins- il est difficile d'aller plus loin dans une analyse comparative protéomique. Cependant, ces résultats ouvrent les portes à des études ultérieures permettant de comprendre la physiopathologie du biofilm de *C. acnes* *via* un modèle animal (Achermann *et al.*, 2015).

Le dernier modèle animal d'ostéomyélite développé avec *C. acnes* est un modèle murin : Shiono *et al.* ont pu mettre en évidence, par microscopie électronique et par un suivi de la fluorescence de la bactérie injectée préalablement marquée, la formation de biofilm de *C. acnes* à la surface d'un implant fémoral en titane *in vivo* et sa persistance jusqu'à 6 mois après l'infection (Figure 37). Ils ont également montré grâce à ce modèle que *C. acnes* n'est capable de survivre jusqu'à 6 mois après l'infection dans l'os qu'en présence d'un implant (Figure 38) (Shiono *et al.*, 2016).

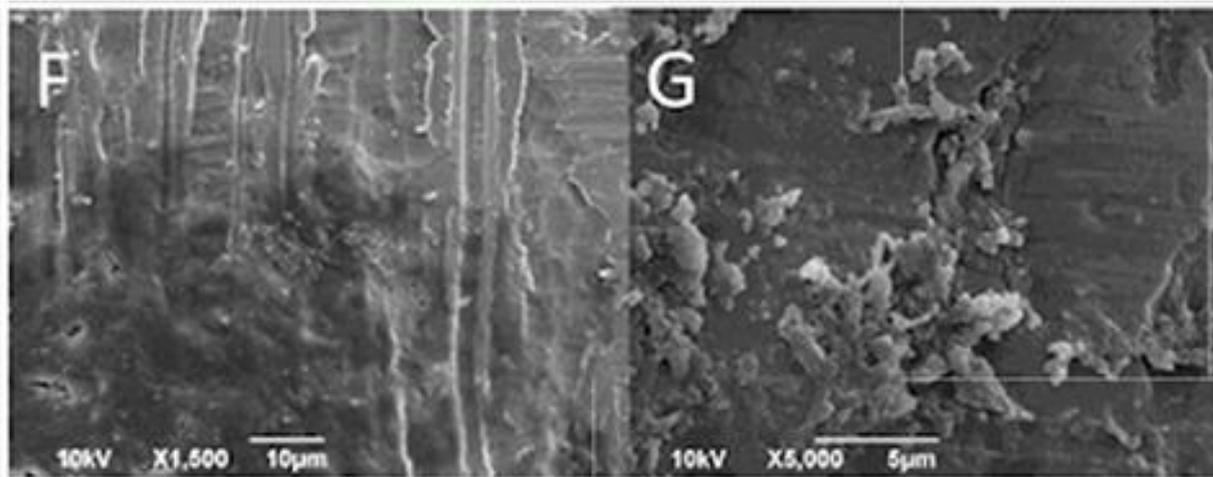


Figure 37. Observation par microscopie électronique *ex vivo* du biofilm de *C. acnes* développé sur un modèle murin d'infection d'implant fémoral et persistant 6 mois après l'infection (Shiono *et al.*, 2016).

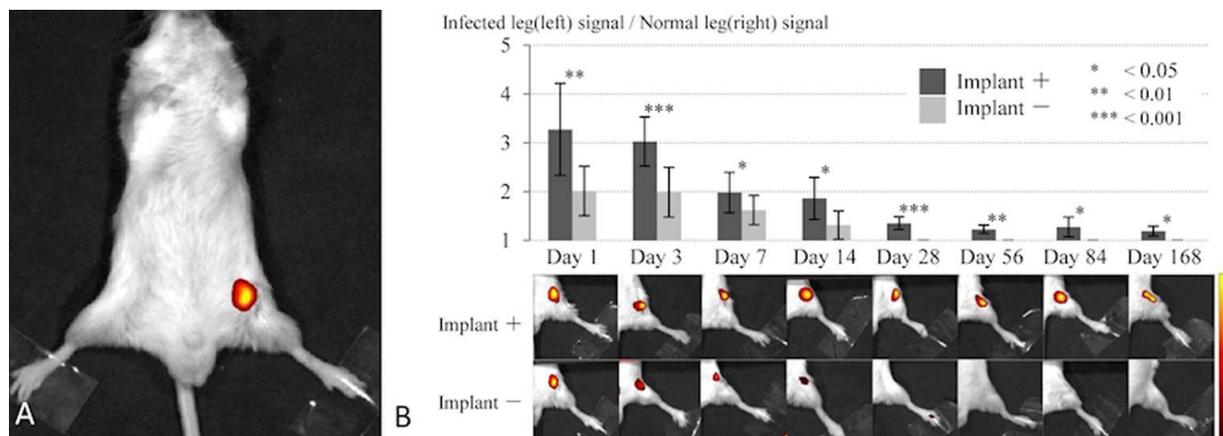


Figure 38. Surveillance de *C. acnes* avec ou sans implant fémoral (Shiono *et al.*, 2016).

Suivi *in vivo* de la persistance de *C. acnes* sur l'implant par injection d'une souche de *C. acnes* marquée par une sonde fluorescente.

Quel que soit le modèle animal utilisé, un fort inoculum de *C. acnes* - plus fort que l'inoculum habituel utilisé pour les bactéries plus virulentes impliquées dans les infections sur implants telle que *S. aureus*- est nécessaire pour une infection non hématogène : 10^7 à 10^8 UFC (Unité Formant Colonie) de *C. acnes* seraient nécessaires.

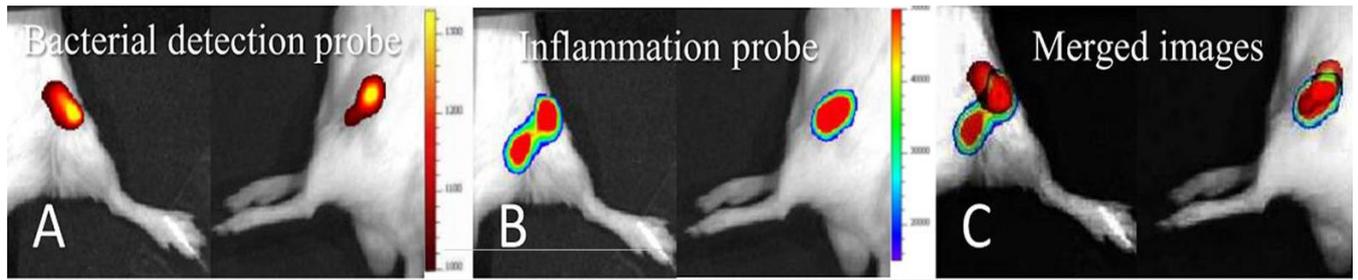


Figure 39. Visualisation de la région inflammatoire dans un modèle d'ostéomyélite murin à *C. acnes* (Shiono *et al.*, 2016).

C. acnes préincubé avec une sonde spécifique fluorescente et une sonde chemiluminescente d'inflammation (spécifique PNN) ont été injectés à chaque souris. La région de développement de *C. acnes* (A) et le foyer d'inflammation (B) ont été observés respectivement par fluorescence et chemiluminescence. La fusion des images (C) montre la colocalisation des deux régions.

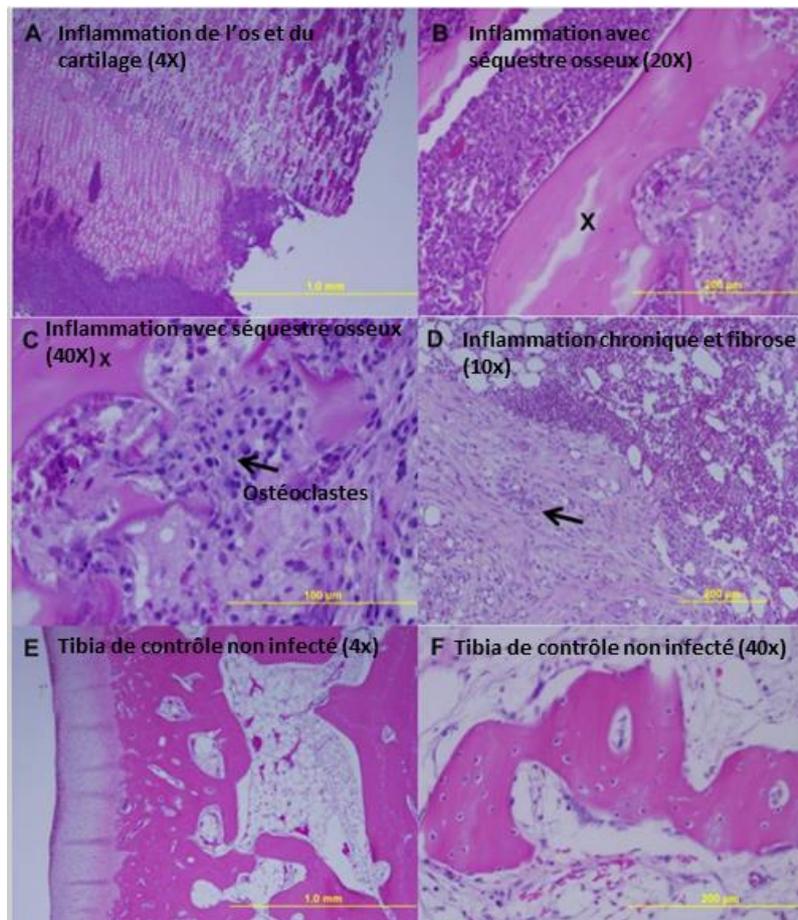


Figure 40. Coupe histologique d'un tibia de lapin infecté par *C. acnes* (Achermann *et al.*, 2015).

6.2. Inflammation

Le pouvoir inflammatoire de *C. acnes* ainsi que les mécanismes d'activation de la réponse immune innée et adaptative induite par *C. acnes* ont été explorés principalement dans le cadre de son implication dans l'acné mais aussi la sarcoïdose et le cancer de la prostate. Ce volet a été détaillé antérieurement dans le chapitre global évoquant la virulence de *C. acnes* (chapitre I.5.1).

Dans ce chapitre, seront évoquées uniquement les rares données concernant l'inflammation induite par *C. acnes* dans les infections ostéo-articulaires. Elles se limitent à deux études réalisées sur des modèles animaux d'ostéomyélite sur lapin et souris en présence ou en l'absence d'implants osseux. Elles ont permis de mettre en évidence la colocalisation de *C. acnes* et une réponse inflammatoire et un remaniement osseux (Figure 39 et Figure 40).

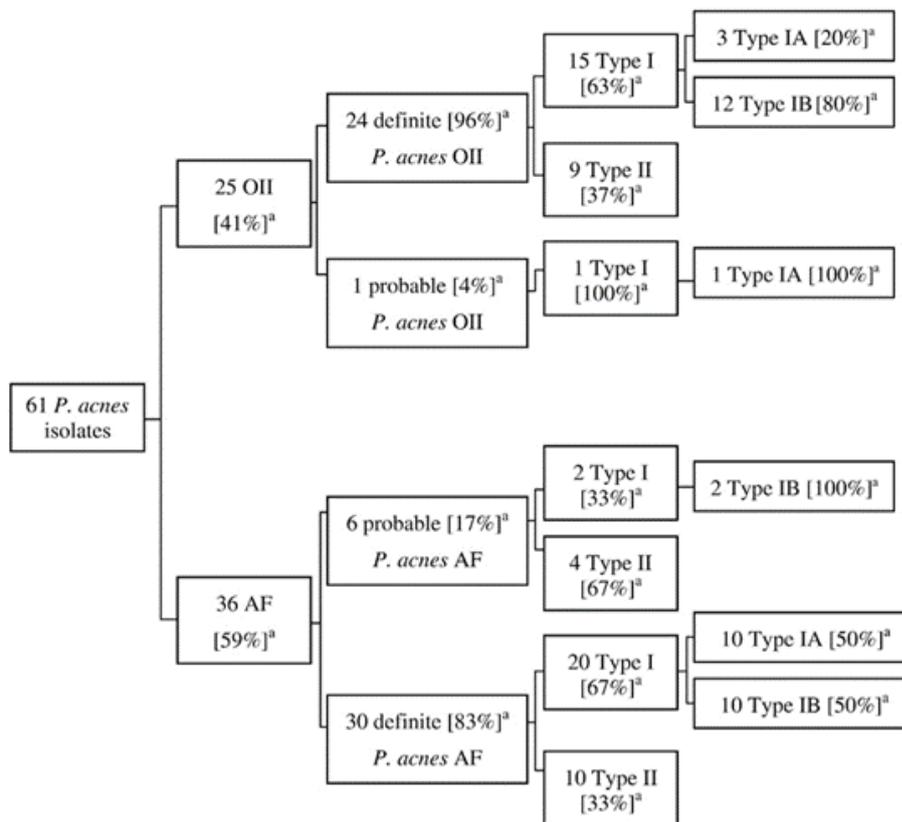


Figure 41. Distribution des phylotypes (sur la base du séquençage du gène *recA*) de *C. acnes* isolés sur matériel prothétique ostéo-articulaire (Fernandez Sampedro *et al.*, 2009).

Tableau 10. Phylogénie (sur la base de MLST9) de *C. acnes* isolé de matériel d'ostéosynthèse rachidien (Spl), de prothèse ostéo-articulaire (PJI) et d'acné (AL) (Aubin *et al.*, 2017b)

MLST Clonal complex (CC)	Clade	Spl isolates (%) n = 58	PJI isolates (%) n = 14	AL isolates (%) n = 14	p-value
CC18	IA1	32 (55.2)	4 (28.6)	6 (42.9)	p = 0.021
CC3	IA1	1 (1.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
CC28	IA2	15 (25.9)	0 (0.0)	2 (14.3)	
CC36	IB	7 (12.1)	6 (42.9)	4 (28.6)	
CC53	II	2 (3.4)	4 (28.6)	2 (14.3)	
CC107	IC	1 (1.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	

6.3. Phylogénie de *C. acnes*

Les données de la littérature montrent une surreprésentation des phylotypes IB et II dans les isolats de *C. acnes* présents sur matériel médical (McDowell *et al.*, 2013). Les études concernant plus précisément la phylogénie de *C. acnes* dans les IMOA restent très rares (trois à notre connaissance). En tirer des conclusions est d'autant plus délicat que les techniques de typage et les critères diagnostiques d'infection utilisés dans les séries sont différents d'une étude à l'autre. En effet, en 2005, McDowell *et al.* ont montré que les phylotypes I et II sont équivalement représentés dans la population ostéo-articulaire de *C. acnes* en typant, par sérotypage, 40 isolats obtenus de prélèvements peropératoires péri-prothétiques de hanche. Les données de typage n'ont pas été analysées en fonction des données cliniques associées (McDowell *et al.*, 2005). En 2009, Sampedro *et al.* ont tenté d'établir un lien entre phylogénie et caractère infectant ou contaminant de *C. acnes* en utilisant les techniques de typage (*recA*, *tly*) et les critères de diagnostiques (Berbari *et al.*, 1998) les plus pertinents de l'époque, devenus obsolètes aujourd'hui : la fréquence des phylotypes I et II était comparable dans le groupe « infectant » (15 vs 9) et le groupe « contaminant » (20 vs 10). Cependant, ils ont observé une fréquence plus élevée du phylotype IB vs le phylotype IA dans le groupe « infectant » (80 % vs 20 %) comparé au groupe « contaminant » (50 % vs 50 %), bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative (Fernandez Sampedro *et al.*, 2009) (Figure 41). En 2017, Aubin *et al.* étaient les premiers à étudier la distribution des phylotypes de *C. acnes* isolés sur matériel ostéo-articulaire en utilisant la technique de typage la plus discriminante, MLST selon le schéma MLST9 et en se basant sur les derniers critères diagnostiques d'IPOA émises par l'IDSA (Osmon *et al.*, 2013) : Ils ont montré une fréquence plus élevée de CC36 (42,9 %) et CC53 (28,6 %) dans le groupe « infections

sur prothèse ostéo-articulaire » (n=14) comparé au groupe « matériel d'ostéosynthèse rachidien » (n=58) (12,1 % ; 3,4 %) et « acné » (n=14) (28,6 % ; 14,3 %) (Tableau 10). La distribution des différents phylotypes dans les trois populations est statistiquement différente permettant aux auteurs de conclure à une fréquence plus élevée de CC36 et CC53 dans les infections sur prothèses ostéo-articulaire que de CC18 et CC28 (Aubin *et al.*, 2017b).

PROBLEMATIQUE

Cutibacterium acnes est une bactérie commensale de la peau dont la pathogénie a été limitée pendant longtemps à son rôle dans l'acné. Son implication dans des pathologies touchant des sites anatomiques profonds et plus particulièrement en présence de matériel étranger a été récemment admise par la communauté scientifique et médicale. La physiopathologie et le diagnostic des infections sur matériel ostéoarticulaire à *C. acnes* restent, par conséquent, partiellement explorés. Zeller *et al.* ont été les premiers en 2004 à reconnaître, par la présentation d'une série de cas, la capacité de *C. acnes* à provoquer des infections sur matériel ostéo-articulaire. Bien que *C. acnes* soit souvent associé aux infections sur matériel ostéo-articulaire évoluant à bas bruit avec une symptomatologie clinique qui se rapproche plus d'un problème mécanique de l'implant que d'une infection, les séries de cas rapportées dans la littérature et notre expérience personnelle à travers le Centre de Référence régional des Infections Ostéo-Articulaires complexes (CRIOA), Ile de France Ouest, montrent que les IMOAs à *C. acnes* peuvent avoir une présentation clinique variable allant d'une symptomatologie clinique bruyante avec des signes locaux et systémiques d'infection à une symptomatologie clinique absente où le diagnostic d'une infection est posé sur la simple documentation microbiologique. A notre connaissance, cette variabilité dans la présentation clinique reste inexpliquée. Aucune donnée de la littérature n'apporte des éléments de réponse à cette question.

Une variabilité liée au phylotype auquel l'isolat de *C. acnes* -responsable de l'infection- appartient serait une piste plausible à explorer. En effet, des études génomiques et fonctionnelles montrent une variabilité entre les phylotypes de *C. acnes*, notamment entre les isolats des phylotypes I et II. La réponse proinflammatoire serait variable d'un phylotype à l'autre. Ces résultats restent à confirmer sur un nombre plus large d'isolats représentatifs de chaque phylotype mais justifient une orientation vers un lien entre

phylotype et présentation clinique d'IMOA à *C. acnes*. La variabilité de la présentation clinique serait liée à une réponse inflammatoire variable dépendante du phylotype de *C. acnes* impliqué dans le processus infectieux. Cette piste est d'autant plus solide que : i) une prédominance de certains phylotypes et plus particulièrement certains complexes clonaux a été observée dans la population de *C. acnes* isolée sur matériel médical en général et sur matériel ostéo-articulaire en particulier ; ii) l'inflammation générée à l'interface de l'implant prothétique constitue une étape clé dans la physiopathologie des IMOAs en général ; et iii) il a été démontré sur des modèles animaux d'ostéomyélite le pouvoir inflammatoire de *C. acnes*.

Sur le plan diagnostique microbiologique, l'isolement de cette bactérie anaérobie aérotoleérante de croissance lente (temps de génération de 5 heures) reste, malgré le développement des outils, un défi pour les microbiologistes. Rares sont les études qui explorent précisément les conditions optimales de culture nécessaires pour le diagnostic microbiologique d'IMOA à *C. acnes*. Cependant, il a été décrit un temps de détection variable de *C. acnes* dans les prélèvements peropératoires. Ce temps de détection est compris entre 3 et 13 jours quelle que soit la stratégie culturale utilisée. Cette variabilité serait corrélée au caractère infectant ou contaminant de l'isolat. Cependant, le caractère infectant ou contaminant ne pourrait pas à lui seul expliquer cette variabilité car des contaminants ont été observés dans les isolats à croissance « rapide » et des infectants ont été observés dans les isolats à croissance « lente ». Des facteurs intrinsèques à la souche pourraient expliquer cette variabilité. Cette piste reste pour l'instant inexplorée.

L'objectif de ce travail est d'expliquer la variabilité de la présentation clinique et microbiologique des IMOAs à *C. acnes*. Nous avons émis l'hypothèse d'une corrélation entre le génotype des isolats et la réponse immune observée chez l'hôte et *in vitro*.

La première étape du travail a été la constitution d'une biobanque d'isolats de *C. acnes* issus d'IMOAs monomicrobiennes définies microbiologiquement, associant les données cliniques et biologiques aux souches cryopréservées.

La deuxième étape était la caractérisation génotypique par MLST9 de tous les isolats disponibles – typant ainsi de multiples isolats par épisode infectieux.

La troisième étape était l'étude *in vitro* de la réponse de cellules macrophagiques à l'infection par nos isolats de *C. acnes* représentant les différents génotypes.

Les résultats inattendus que nous avons obtenus nous ont permis de formuler de nouvelles hypothèses physiopathologiques pouvant expliquer la variabilité clinique et microbiologique des IMOAs à *C. acnes*.

TRAVAUX PERSONNELS

I. Variabilité de la présentation clinique des IMOAs à *C. acnes* : corrélation entre le génotype et la réponse immune *in vivo*

1. Présentation

Les études de cas d'IMOAs à *C. acnes* rapportent une variabilité dans la présentation clinique allant d'une infection clinique très bruyante associée à une réponse inflammatoire clinique et biologique à une infection asymptomatique découverte fortuite sur les prélèvements per-opératoires adressés au laboratoire de microbiologie. Devant une positivité d'au moins deux prélèvements à *C. acnes*, et comme définie par les groupes d'experts, le diagnostic d'une infection est posé. Le même traitement médico-chirurgical est alors instauré pour toute IMOAs à *C. acnes*.

Dans cette partie du travail, nous proposons d'expliquer la variabilité de la présentation clinique jusque-là inexplorée. Les données de la littérature ont révélé que les phylotypes IB et II sont associés au matériel médical et une étude récente réalisée par Aubin *et al.* a montré une association statistique entre les isolats de *C. acnes* appartenant au CC36 (type IB) et les isolats de *C. acnes* responsables d'infection sur prothèse articulaire. Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré une variabilité de la réponse inflammatoire, en termes d'intensité et de voies d'activation impliquées- en fonction du phylotype concerné.

Au vue de ces données, notre hypothèse de travail initiale est que la variabilité de la présentation clinique des IMOAs à *C. acnes* pourrait être expliquée par le génotype de *C. acnes* responsable de l'infection et son pouvoir inflammatoire. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons :

- recueilli rétrospectivement les données clinico-biologiques de 34 cas d'IMOAs monomicrobiennes à *C. acnes*

- collecté tous les isolats de *C. acnes* obtenus à partir des prélèvements per-opératoires correspondant à ces cas et cryoconservés au laboratoire de microbiologie
- typé par MLST9 tous les isolats de *C. acnes*
- corrélé leur génotype à la réponse inflammatoire *in vivo* observée dans les cas correspondants.
- corrélé le génotype à la réponse inflammatoire *in vitro*, évaluée par la réponse TNF α générée par les macrophages THP-1 en présence des différents isolats de *C. acnes* représentant les différents phylotypes.

2. Méthodologie

2.1. Recueil de cas d'IMOA à *C. acnes*

L'étude a été menée, sur une période de 5 ans allant de Janvier 2009 à Janvier 2014 au sein des deux services de chirurgie orthopédie septique de l'Hôpital Ambroise Paré et Raymond Poincaré du Groupement Hospitalier Paris Ile de France Ouest Assistance Publique-Hôpitaux de Paris et faisant partie tous les deux, sur la durée de l'étude, du centre de référence régional Ile de France Paris Ouest des infections ostéo-articulaires complexes (CRIOA Ile de France). Dans l'étude, ont été inclus tous les cas d'infections sur matériel ostéo-articulaire caractérisés par : i) une croissance de *C. acnes* dans au moins 2 prélèvements intra-opératoires et/ou peropératoires (biopsie tissulaire ou liquide synovial), dans lequel ii) *C. acnes* était le seul germe microbiologiquement significatif (selon les critères microbiologiques définies par IDSA et MSIS (Parvizi *et al.*, 2011; Osmon *et al.*, 2013) avec iii) au moins 2 isolats de *C. acnes* disponibles pour génotypage.

Les données biologiques, cliniques et démographiques des différents cas répondant aux critères définis ci-dessus ont été recueillis rétrospectivement et d'une manière anonymisée à partir des dossiers 'patient' informatisés ou papiers, disponibles à l'hôpital.

Les critères d'inclusion étant essentiellement microbiologiques, le recueil des cas a été fait rétrospectivement à partir du système général informatique de chacun des deux laboratoires de microbiologie (SGIL) prenant en charge les prélèvements à visée diagnostique de chacun des deux services de chirurgie orthopédique concernés par l'étude.

2.2. Recueil d'isolats correspondant aux cas d'IMOA à *C. acnes inclus*

2.2.1. Prise en charge bactériologique

Cette partie détaille la prise en charge bactériologique initiale des prélèvements correspondant aux cas inclus dans l'étude et qui a été faite par l'équipe technique et médicale de chacun des deux laboratoires de microbiologie au moment de la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients correspondant.

Pour chacun des cas, au moins 3 échantillons de tissu et/ou de liquide périprothétique ont été collectés au bloc opératoire dans des pots Nalgène dont la contenance maximale est de 30 mL. Les échantillons ont subi un broyage mécanique à l'aide du broyeur mécanique Retsch MM400 beadmill (Verder, Cergy-Pontoise, France) (Roux *et al.*, 2011) après ajout d'eau distillée stérile avec des billes en acier inoxydable aux échantillons. La suspension obtenue étaitensemencée sur des milieux solides (gélose Columbia au sang de mouton 5 % incubé en aérobie et anaérobiose et gélose chocolat agar incubé sous un atmosphère de 5 % CO₂) et dans des flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie (Bactec Peds+ and Lytic10 anaerobic incubés dans l'automate Bactec FX , BD Diagnostics, Sparks, MD) incubés respectivement 7 et 14 jours.

Une identification de chaque aspect de colonies isolées à partir des milieux solides ou des repiquages des cultures de flacons d'hémocultures positifs sur milieux solides a été réalisée initialement par spectrométrie de masse à l'aide de l'instrument Microflex (Bruker Daltonique, Winnebourg, France) utilisant le logiciel Biotyper, par Vitek 2 (bioMérieux, Lyon, France), ou par identification moléculaire à l'aide du séquençage du gène codant pour l'ARNr16S.

Un antibiogramme a été réalisé par prélèvement et sur 2 à 5 prélèvements choisis aléatoirement par cas. Une cryoconservation à partir de l'antibiogramme à -80°C dans des microtubes à cryobilles a été effectuée.

Les parties suivantes de la méthodologie ont été réalisées dans le cadre du projet de thèse.

2.2.2. Identification et génotypage des isolats de *C. acnes*

Une nouvelle collection de cryotubes a été constituée pour l'étude à partir des cryotubes conservés dans les laboratoires de microbiologie. Un repiquage sur gélose au sang Columbia incubé en anaérobiose a été réalisé. Une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonique, Winnebourg, France) utilisant le logiciel CE-IVD Biotyper de l'ensemble des isolats a été réalisée. Une banque d'extraits d'ADN des différents isolats a été réalisée en parallèle par lyse thermique. Les extraits étaient conservés à -20°C.

Un génotypage par MLST ou Multi-locus Sequence Typing a été réalisé sur l'ensemble des extraits d'ADN des isolats de *C. acnes* recueillis des prélèvements correspondant aux différents cas d'infections sur matériel ostéo-articulaire inclus dans l'étude. Le schéma MLST choisi était le MLST9 proposé par Lomholt *et al.* (Lomholt *et al.*, 2010). Pour rappel, ce schéma est basé sur le séquençage partiel de 9 gènes de ménage correspondant à un total de 4233 nucléotides. Le ST de chaque isolat a été défini en utilisant la banque MLST disponible sur <http://pacnes.mlst.net>. Le complexe clonal auquel appartient chaque ST a été déterminé par une analyse goeBURST (Francisco *et al.*, 2009) en utilisant le logiciel Phyloviz 2.0.

L'identification génotypique de multiples isolats par épisode infectieux a été rendue possible grâce à la politique initiale des laboratoires de microbiologie du groupement

hospitalier de déployer les moyens techniques et humains nécessaires pour une documentation exhaustive microbiologique des infections ostéo-articulaires prises en charge dans les deux hôpitaux et une conservation à long terme de ces ressources biologiques précieuses pour entreprendre et faire avancer la recherche clinique appliquée.

3. Corrélation entre génotype et réponse inflammatoire *in vivo*

3.1. Résultats

Article 1

**Molecular typing of multiple isolates is essential to
diagnose *Cutibacterium acnes* orthopedic-device
related infection**

Clinical Infectious Diseases

Publié le 8 Novembre 2018

Clinical Infectious Diseases, ciy952, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy952>

Molecular typing of multiple isolates is essential to diagnose *Cutibacterium acnes* orthopedic-device related infection

Authors: Faten El Sayed^{1, 2}, Anne-Laure Roux^{1, 2}, Guillaume Sapriel^{3, 4}, Elsa Salomon^{1, 2}, Thomas Bauer^{3,5}, Jean-Louis Gaillard^{1, 2}, Martin Rottman^{2, 6}.

¹Department of Microbiology, Hôpital Ambroise Paré (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France.

²UMR1173, Inserm and UFR Des Sciences de la Santé Simone Veil, University of Versailles Saint-Quentin, Montigny-le-Bretonneux, France. ³UFR Des Sciences de la Santé Simone Veil, University of Versailles Saint-Quentin, Montigny-le-Bretonneux, France. ⁴Atelier de Bioinformatique (ISYEB - UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE, Paris). ⁵Orthopedic Surgery Department, Hôpital Ambroise Paré (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France.

⁶Microbiology Department, Hôpital Raymond Poincaré (AP-HP), Garches, France

Corresponding author: Faten El Sayed

UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ

2, avenue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

Tél: + 33620063892; @: faten.elsayed@aphp.fr

ABSTRACT

Cutibacterium acnes orthopedic device-related infection (ODRI) range from obvious infections to solely culture-based diagnoses. Multilocus sequence typing of multiple isolates from the same procedure revealed that the majority of cases with normal CRP levels, classified as *C.acnes* ODRI, would be considered contaminations if genotypic data were taken into account.

Keywords: *Cutibacterium acnes*, bone and joint infection, Multi-locus Sequence Typing, heterotypic

INTRODUCTION

Prosthetic joint infections (PJIs) and other orthopedic device related infections (ODRIs) due to *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* remain challenging. The clinical presentations of *C.acnes* ODRIs are heterogeneous ranging from acute to totally silent infections [1-3]. Moreover, *C.acnes* is a common skin commensal and may also be isolated as a contaminating organism. As for other commensal microorganisms, isolates with identical susceptibility profiles must be recovered from two or more samples from the same procedure to diagnose an implant infection [4-6]. Because most *C.acnes* isolates are susceptible to the antibiotics routinely tested [7], isolates cannot be phenotypically differentiated. It is thus impossible to determine whether or not a single strain is involved in a given case without using molecular typing methods. We hypothesized that currently overlooked genotypic differences in *C.acnes* isolates could account for the variable clinical expression of *C.acnes* ODRIs.

Using multilocus sequence typing (MLST) [8], one of the most discriminating tools available to type *C.acnes* isolates [9], we analyzed 108 isolates from 34 cases classified as *C.acnes* ODRIs according to current microbiological definitions [4, 5]. We show that, at a molecular level, a large proportion of cases classified as *C.acnes* ODRI involve multiple clones. Interestingly, these cases are mostly associated with normal inflammatory markers and could be instances of colonization or contamination.

PATIENTS AND METHODS

Inclusion criteria

The study was conducted in a French reference center for complex bone and joint infections in the Greater Paris area. Between January 2009 and January 2014, we included all consecutive ODRI cases if: i) they had at least 2 tissue samples or one tissue sample and one synovial fluid sample positive for *C.acnes*; ii) *C.acnes* was the only microbiologically significant species, and; iii) at least 2 isolates were successfully genotyped. Anonymized clinical, biological and demographic information was collected from hospital charts. The study was submitted to our institution and found to be IRB exempt according to French regulations.

Bacteriological procedures

At least three intraoperative tissue samples collected in 30-ml containers were mechanically disrupted in sterile water with stainless steel beads using a Retsch MM400 beadmill (Verder, Cergy-Pontoise, France)[10]. Beadmilled sample suspensions were then cultured on solid medium (Columbia sheep blood agar incubated under aerobic and anaerobic atmospheres or chocolate agar under 5% CO₂) and on blood culture vials (Bactec Peds+ and Lytic10 anaerobic monitored on a Bactec FX instrument, BD Diagnostics, Sparks, MD) incubated respectively seven and fourteen days. Isolates were identified by mass spectrometry using a Microflex LT instrument and the current CE-marked IVD Biotyper software (Bruker Daltonique, Wissenbourg, France). Antimicrobial susceptibility testing and subsequent biobanking was performed on colonies randomly selected from two to five intraoperative samples positive with *C. acnes*.

Genotyping

C.acnes isolates were typed using a previously described MLST scheme [8] based on the partial sequences of nine housekeeping genes comprising a total of 4,233 nucleotides. Purified PCR products were sequenced using BigDye® Terminator v1.1 kit on an Applied

Biosystems 3500xl Dx sequencer. The ST of each isolate was determined using a publically available MLST database (<http://pacnes.mlst.net>). The clonal complex (CC) to which the ST belonged was determined by eBURST analysis (eBURST version 2 - <http://eburst.mlst.net/>). A case was defined as "homotypic" when all typed isolates from that case belonged to the same ST and as "heterotypic" when isolates belonged to two or more different STs. A case was requalified as a contamination when all typed isolates belonged to distinct STs and as an infection when at least 2 typed isolates belonged to the same ST.

Statistical analysis

Univariate analysis was performed using Fisher's exact test for categorical variables and Wilcoxon - Mann Whitney test for continuous variables. A p value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Population characteristics

A total of 34 cases were included (Table 1). Patients had a median age of 54 years and were predominantly male. Half of the cases involved joint prostheses and half osteosynthetic devices. The most frequent sites were the hip, knee and shoulder for joint prostheses, and the spine, femur and tibia for osteosynthesis. The median time for surgical revision was 1.9 years following implant placement.

C.acnes genotyping

A total of 108 isolates were typed, with a median of 3 isolates per case (extremes, 2-5) (Table 1). The 108 isolates were distributed into 30 STs, of which 17 were previously unreported (ST126 to 143 excluding ST134). The most frequent STs were ST18 (23 isolates, 21.3%), ST36 (20 isolates, 18.5%), ST27 (18 isolates, 16.7%), belonging respectively to clonal complexes CC18, CC36 and CC28 (Table 1). Other frequent STs were: ST41 (5 isolates, 4.6%), ST12, ST20, ST29, ST33, ST52 and ST142 (3 isolates, 2.8% each) as well as ST31, ST133, ST138 and ST140 (2 isolates, 1.9% each). The 16 remaining STs were represented once (1 isolate, 0.9% each).

C.acnes ODRI cases include homotypic and heterotypic cases

As many as 14/34 (41%) ODRI cases were found to involve isolates belonging to two or more different STs ("heterotypic" cases): 11 had two distinct STs, 2 three distinct STs, and 1 four distinct STs. The 34 cases involved isolates belonging mainly to ST18 (9, 26.5%), ST36 (8, 23.5%), ST27 (6, 17.6%) and ST33 (3, 8.8%). The 26 remaining STs were involved in one case each (1, 2.9%). No significant difference was observed between the number of typed isolates in homotypic (median=3) versus heterotypic (median=2.5) cases ($p=0.92$). We evaluated the clinical features of the populations segregated according to clonality. Heterotypic cases featured previous revisions of the same implant significantly more frequently than homotypic cases ($p=0.035$). Strikingly, we found that preoperative CRP

levels (available for 24 cases) were significantly higher in homotypic infections than in heterotypic cases (median CRP 51.5 vs 6.5; $p=0.019$).

***C.acnes* cases requalified as infections or contaminations according to genotyping**

Based on genotyping results, 8/34 (23.5%) cases were presumed to be contaminations. The characteristics of the contamination cases and the true infection cases are presented table 1. We found that ST33 was significantly associated with contamination cases ($p<0.01$) while ST36 belonging to the same CC was predominantly (but not significantly) associated with infection cases. As observed with homotypic cases, CRP was significantly more elevated in infection cases ($p=0.02$).

DISCUSSION

C.acnes ODRIs are challenging on multiple counts: they can present as obvious infection but can also mimic mechanical failure of the implant. *C.acnes* is a fastidious organism frequently isolated in cases where all inflammatory markers, serological as well as histological, are negative [1-3]. While previous studies typing one random isolate per infectious episode [11-13] have failed to evidence the clinical relevance of *C.acnes* genotyping, we show that genotyping all isolates is essential to diagnose *C.acnes* ODRI.

Genotyping multiple isolates (108 *C.acnes* isolates from 34 distinct ODRI cases) revealed that not all microbiologically defined *C.acnes* infections involve multiple isolates of the same clone: More than 40% (14/34) of *C.acnes* ODRI cases in the present study are heterotypic. Homotypic and heterotypic *C.acnes* ODRIs appear to be distinct clinical entities associated with different surgical histories and dramatically divergent inflammatory responses, as evidenced by the significant difference in blood CRP levels. This study suggests that currently microbiologically defined *C.acnes* ODRIs comprise i) true -homotypic- *C.acnes* infections featuring a single pathogenic clone eliciting an inflammatory response, with a single surgery and ii) heterotypic events involving multiple clones in the absence of systemic inflammatory response following multiple surgeries.

Adding genotypic information to the microbiological criteria requalifies 23.5% (8/34) of *C.acnes* ODRI - 8/14 heterotypic cases - as contaminations. The clinical relevance of this update in practice is vindicated by its correlation with preoperative CRP values, but needs to be confirmed in a larger prospective study, underway in our center. MLST has allowed a breakthrough in the understanding of the clinical history of *C.acnes* ODRI, but its discriminatory power is possibly insufficient to differentiate isolates belonging to the same ST. The use of whole genome sequencing will allow the unambiguous recognition of diversity within a given ST and could be used to fully document these cases.

Conclusion

The systematic use of MLST has evidenced the high frequency of excessive *C.acnes* diagnoses and unraveled part of the *C.acnes* ODRI enigma. Further studies relying on whole genome sequencing will unambiguously qualify the clonal status of these events and allow the design of a clinical trial evaluating patient outcome when the molecular identity of isolates is included in the case definition. This novel approach could be applicable to other microorganisms with stereotypic susceptibility profiles and put an end the microbiological arms race to identify more and more putative pathogens in the absence of clinical signs of infection.

Acknowledgments

We would like to thank Pr. De Mazancourt Philippe, Dr. Rabès Jean-Pierre, Mrs Le Moal Michèle and Mrs Grey Sylvie from “Plateforme de Biologie moléculaire” (Laboratoire de Biochimie,) for their availability and help in MLST processing and Mr. Idir Ghout from the Unité de Recherche Clinique (Hôpital Ambroise Paré), AP-HP, France for assistance with the statistical analysis. The authors are grateful to the Microbiology Laboratory teams of Hospitals Ambroise Paré and Raymond Poincaré, who isolated, analyzed and cryopreserved all *C.acnes* isolates.

Funding

This work was supported internally by the Université de Versailles St Quentin Unité Mixte de Recherche U1173 and the Clinical Microbiology Department of Hôpital R. Poincaré (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris).

Conflict of interest

All authors state that they have no conflict of interest.

References

1. Achermann Y, Goldstein EJ, Coenye T, Shirtliff ME. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clin Microbiol Rev* **2014**; 27(3): 419-40.
2. Kanafani ZA, Sexton DJ, Pien BC, Varkey J, Basmania C, Kaye KS. Postoperative joint infections due to *Propionibacterium* species: a case-control study. *Clin Infect Dis* **2009**; 49(7): 1083-5.
3. Zeller V, Ghorbani A, Strady C, Leonard P, Mamoudy P, Desplaces N. *Propionibacterium acnes*: an agent of prosthetic joint infection and colonization. *J Infect* **2007**; 55(2): 119-24.
4. 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(1): e1-e25.
5. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res* **2011**; 469(11): 2992-4.
6. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev* **2014**; 27(2): 302-45.
7. Khasseba J, Hellmark B, Davidsson S, Unemo M, Nilsson-Augustinsson A, Soderquist B. Antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from orthopaedic implant-associated infections. *Anaerobe* **2015**; 32: 57-62.
8. Lomholt HB, Kilian M. Population genetic analysis of *Propionibacterium acnes* identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne. *PLoS One* **2010**; 5(8): e12277.
9. Dagnelie MA, Khammari A, Dreno B, Corvec S. *Cutibacterium acnes* molecular typing: time to standardize the method. *Clin Microbiol Infect* **2018**.
10. Roux AL, Sivadon-Tardy V, Bauer T, et al. Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen. *Clin Microbiol Infect* **2011**; 17(3): 447-50.

11. Aubin GG, Lavigne JP, Foucher Y, et al. Tropism and virulence of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* involved in implant-associated infection. *Anaerobe* **2017**; 47: 73-8.
12. McDowell A, Barnard E, Nagy I, et al. An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: investigation of 'pathogenic', 'commensal' and antibiotic resistant strains. *PLoS One* **2012**; 7(7): e41480.
13. Sampedro MF, Piper KE, McDowell A, et al. Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phlotypes associated with orthopedic implants. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2009**; 64(2): 138-45.

TRAVAUX PERSONNELS

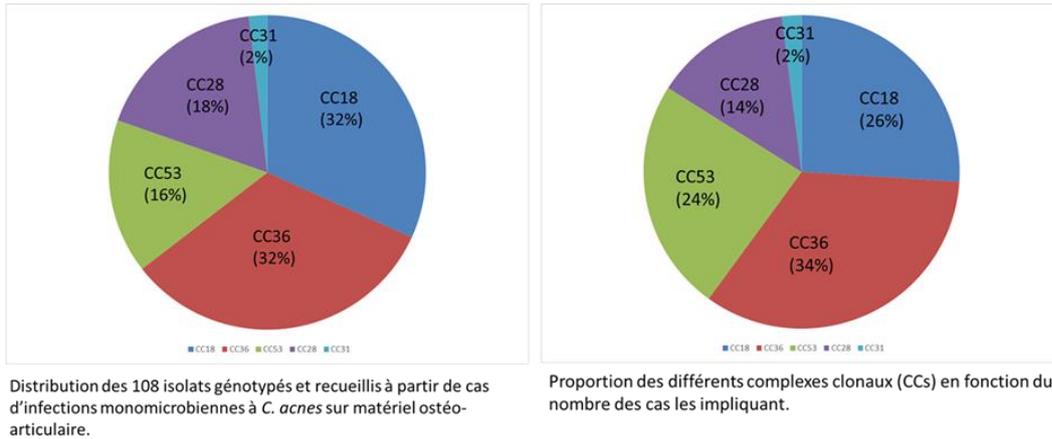


Figure 42. **Phylogénie (selon le schéma MLST9) des 34 cas d'IMOAs à *C. acnes*.**

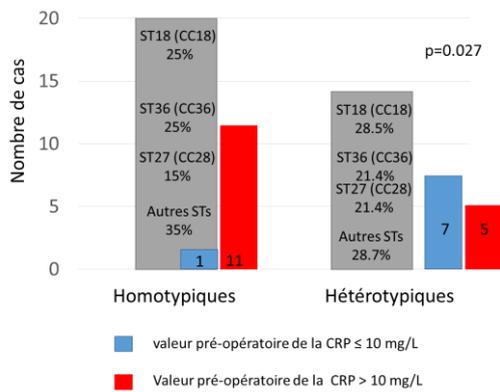


Figure 43. **Catégorisation génotypique de 24 cas d'IMOAs à *C. acnes* et réponse inflammatoire *in vivo*.**

Un cas est considéré comme homotypique si tous les isolats de *C. acnes* typés de ce cas appartiennent au même ST. Un cas est considéré comme hétérotypique si les isolats de *C. acnes* typés de ce cas appartiennent à au moins 2 STs distincts.

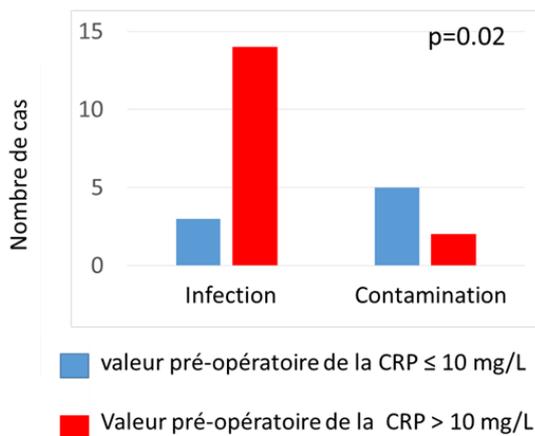


Figure 44. **Reclassification des 24 IMOAs à *C. acnes* en fonction des données génotypiques et réponse inflammatoire *in vivo*.**

Un cas est considéré comme une infection si les isolats de *C. acnes* typés au sein d'un même cas selon le schéma MLST9 appartiennent au même ST. Un cas est considéré comme une contamination si les isolats de *C. acnes* typés au sein d'un même cas appartiennent à des STs différents.

TRAVAUX PERSONNELS

Les données cliniques et génotypiques complètes des 34 cas étudiés dans cette partie sont disponibles en annexes 1 et 2. Les résultats majeurs de cette partie du travail sont étayés dans l'article ci-dessus et résumés dans le tableau 1 de l'article correspondant.

Brièvement, nous avons démontré par le génotypage par MLST9 de 108 isolats de *C. acnes* responsables d'IMOA monomicrobiennes que 41 % des cas sont hétérotypiques – impliquant au moins deux STs différents et que cette hétérotypie semble corrélée significativement à l'absence d'une réponse inflammatoire systémique *in vivo*, soit une valeur pré-opératoire de la CRP inférieure ou égale à 10mg/L. De plus, inclure les données génotypiques dans la définition d'une IMOA a permis de considérer plus de 20 % de nos 34 cas comme contaminations. Cette reclassification semble être cliniquement pertinente étant donné qu'elle est corrélée significativement à une CRP inférieure ou égale à 10 mg/L. Par ailleurs, les cas hétérotypiques étaient significativement plus fréquemment associés à une reprise chirurgicale antérieure à l'épisode infectieux décrit dans notre étude que les cas homotypiques ($p=0.035$).

A noter que les infections sur matériel d'ostéosynthèse sont concernées par cette hétérotypie d'une façon équivalente aux infections sur prothèses ostéo-articulaires. De plus, le nombre moyen d'isolats typés entre les deux catégories d'infections était équivalent, excluant un biais de recrutement. Les Figure 42, Figure 43, et Figure 44 permettent d'illustrer ces résultats en complément des données présentes dans l'article.

TRAVAUX PERSONNELS

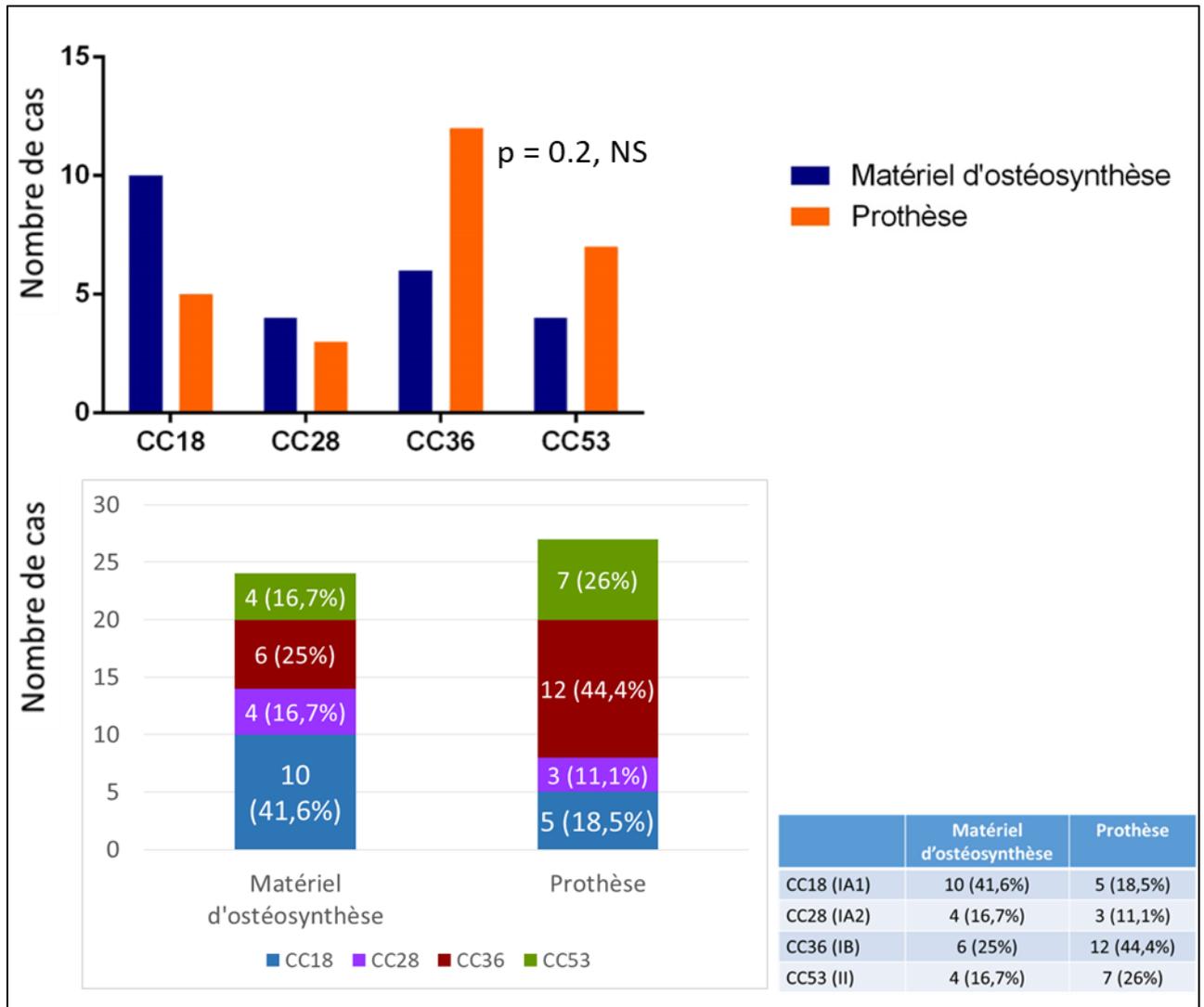


Figure 45. Phylogénie (selon le schéma MLST9) des 34 cas d'IMOAs à *C. acnes* : infections sur prothèses vs sur matériel d'ostéosynthèse.

TRAVAUX PERSONNELS

Par ailleurs, d'autres résultats non relevés dans l'article 1 ont pu être obtenus par le travail de catégorisation génotypique sur cette série de cas.

Phylogénie des IMOAs à *C. acnes*

Sur les 34 cas d'IMOAs, toutes les articulations sont concernées. La moitié des infections touche du matériel d'ostéosynthèse (n=17) et l'autre moitié du matériel prothétique (n=14). Bien que l'on observe une tendance à une prédominance de CC36 dans le groupe « prothèse » (44,4 %) et de CC18 dans le groupe matériel (41,6 %), cette observation n'est pas appuyée par une différence significative statistiquement : La distribution des 4 principaux CCs dans les 2 groupes n'est pas significativement différente (p=0,2, Test Chi2). La représentation de CC18 et de CC36 n'est pas significativement différente entre les 2 groupes (p=0.08, Test exact de Fisher) (Figure 45).

Les nouveaux STs

Cette étude a permis de décrire sur les 30 STs auxquels appartiennent les 108 isolats, 17 nouveaux STs (ST127 à ST143 inclus), témoignant de la diversité de la population orthopédique de *C. acnes* qui reste peu explorée. Ces nouveaux STs ont été retrouvés entre 1 à 9 fois au sein d'un même cas mais aucun n'a été commun à plus d'un cas d'IMOA (voir annexes 3, 4 et 5).

TRAVAUX PERSONNELS

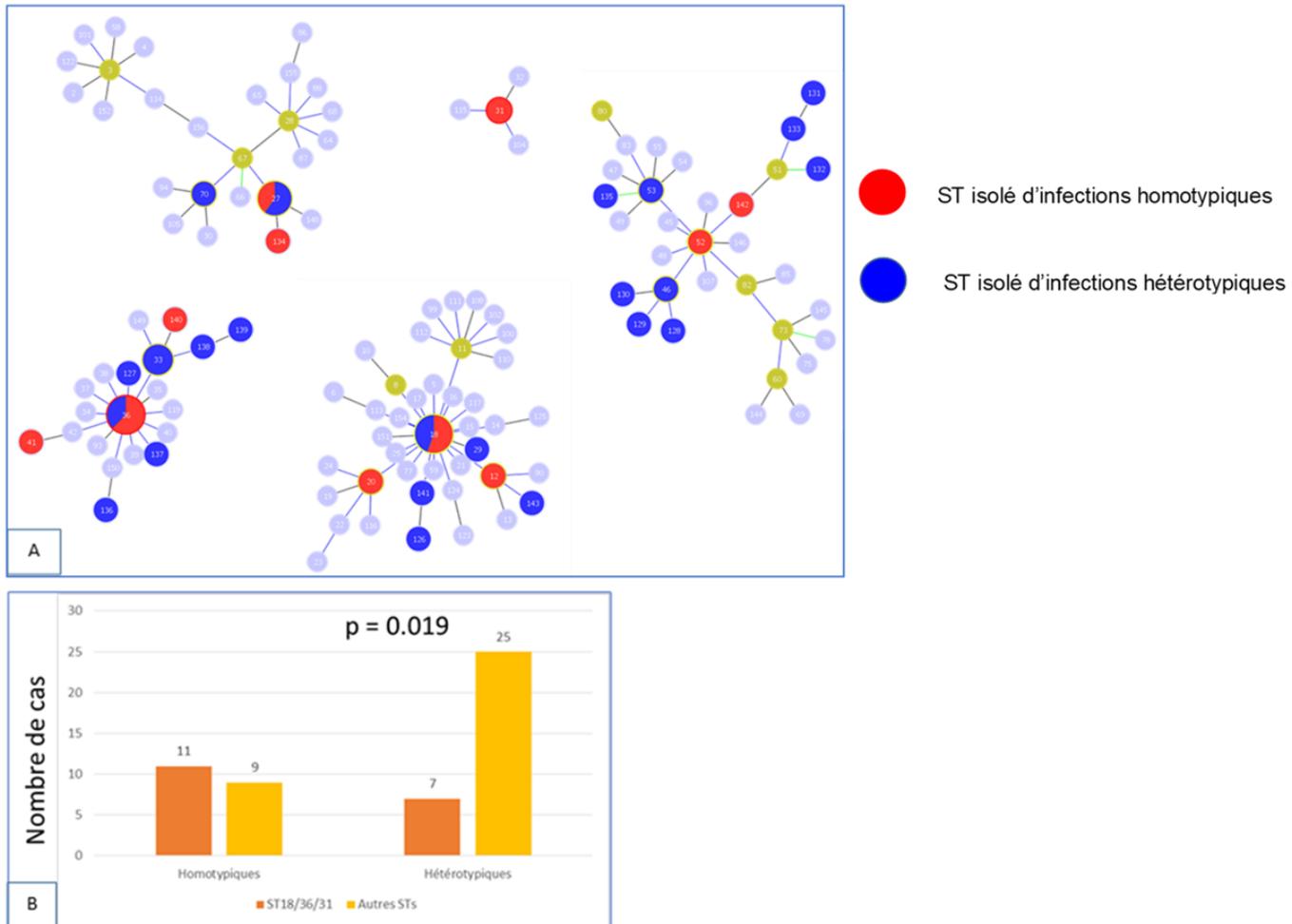


Figure 46. **STs et catégorisation génotypique des 34 cas d'IMOAs à *C. acnes*.**

La taille des cercles rouges et bleus est proportionnelle au nombre d'isolats appartenant au ST concerné. Analyse faite par le logiciel Phyloviz 2.0 basé sur l'algorithme goBurst (A).

STs et catégorisation génotypique de l'infection

Nous n'avons pas constaté de différence de représentation de CCs entre les infections hétérotypiques et homotypiques. Cependant, une différence à l'échelle des STs a été observée comme illustrée sur la figure goeBurst présentée ci-dessous (Figure 46). Les ST18, ST36 et ST31, fondateurs confirmés des trois complexes clonaux CC18, CC36 et CC31, respectivement, sont significativement plus associés aux infections homotypiques, à l'inverse des autres STs, significativement plus associés aux infections hétérotypiques.

Seuil de positivité des prélèvements per-opératoires

Nous avons constaté dans le cadre de l'étude de cette série de 34 cas qu'un nombre de prélèvements per-opératoires positifs à *C. acnes* égal à 2 était associé à une valeur préopératoire de la CRP sérique plus faible. En effet, pour ces cas (n=6), la CRP médiane est de 8,5 mg/L alors que pour les cas associés à au moins 3 prélèvements positifs à *C. acnes*, la CRP médiane était de 30,5 mg/L, à savoir que le nombre de prélèvements réalisés dans les deux groupes était comparable avec un nombre médian de prélèvements réalisés égal à 5. Cette tendance n'était pas statistiquement significative ($p=0,054$).

Au vue de cette tendance, nous avons tenté de corrélérer la reclassification – sur la base des données génotypiques- en infection ou contamination des cas d'IMOA au nombre de prélèvements positifs : Nous avons observé une proportion plus élevée de cas avec 2 prélèvements positifs seulement dans le groupe « contamination » (4/9,

TRAVAUX PERSONNELS

44.4%) comparé au groupe « infections » (3/25, 12 %). Cette différence n'est toutefois pas statistiquement significative ($p=0,06$, test exact de Fisher).

3.2. Discussion

Grâce à un travail de recueil de données clinico-biologiques de tous les cas d'IMOAs à *C. acnes* pris en charge dans notre CRIOA sur 5 ans et de génotypage de multiples isolats par épisode par la technique de typage la plus discriminante, nous avons réussi à apporter des éléments de réponse concernant la variabilité de la présentation clinique des IMOAs à *C. acnes* jusque-là complètement inexplicée.

Les quelques études s'intéressant à la caractérisation génotypique des isolats de *C. acnes* dans les IMOAs ont permis de souligner la surreprésentation du CC36 et CC53 dans cette population comparé à la population de *C. acnes* sur la peau saine et acnéique. En dehors d'une tentative d'établir un lien entre phylotype et caractère infectant ou contaminant de *C. acnes* dans les prélèvements per-opératoires périprothétiques ostéo-articulaires, aucune étude ne s'est intéressée à explorer une corrélation entre le génotype et la clinique des IMOAs à *C. acnes*. Afin de pouvoir établir un lien entre le génotype et la présentation clinique, nous nous sommes concentrés sur l'étude exclusive de cas d'IMOAs monomicrobiennes à *C. acnes*.

Par le génotypage par MLST9 de 108 isolats correspondant à 34 cas d'IMOAs monomicrobiennes à *C. acnes*, nous nous attendions à observer un lien entre le CC et la présentation clinique des IMOAs. Or, d'une façon inattendue, nos travaux ont montré, grâce au génotypage de multiples isolats par cas, que 41% des cas impliquent au moins deux STs différents. Ces cas ont été définis comme hétérotypiques-à l'opposé des cas où tous les isolats typés appartenaient à un ST. Les 4 principaux CCs (CC18, CC28, CC36 et CC53) étaient représentés dans les deux types de cas. A

TRAVAUX PERSONNELS

partir de là, nous nous sommes intéressés à la signification clinique de ces 2 des types d'infections (« homotypiques » et « hétérotypiques »). La nouvelle hypothèse du travail, suite aux résultats de génotypage, était que la variabilité de la présentation clinique des IMOAs serait liée à un processus physiopathologique différent entre les deux groupes « homotypiques » et « hétérotypiques ». Cette hypothèse a pu être confirmée principalement par le fait que la catégorisation génotypique était corrélée à la réponse immune *in vivo* - explorée par la valeur préopératoire de la CRP sérique : En effet, les cas homotypiques, à l'inverse des cas hétérotypiques étaient significativement corrélés à une CRP > 10 mg/L. Par ailleurs, les cas hétérotypiques sont plus fréquemment associés à une reprise chirurgicale antérieure que les cas homotypiques. L'hétérotypie serait liée à un passage itératif d'isolats de ST différents à chaque intervention.

Etant donné que les cas homotypiques étaient associés à une réponse inflammatoire systémique, nous aurions pu nous attendre à une différence au niveau du temps médian entre la pose de l'implant et la reprise chirurgicale entre les cas « homotypiques » et les cas « hétérotypiques ». Or ceci n'était pas le cas. Cependant, nous avons observé une prédominance significative de STs SLV (Single-Locus Variant) ou DLV (Double-Locus-Variant) dans les cas hétérotypiques comparé au ST fondateur. Ceci permet d'évoquer l'hypothèse que certains STs auraient divergé sous la pression de la réponse immune de l'hôte dans l'environnement périprothétique. Cette hypothèse mérite d'être explorée par l'analyse du génome complet de ces STs à la recherche de pseudogènes ou de gènes acquis confortant cette hypothèse.

Nos résultats suggèrent donc que deux entités cliniques coexistent dans les IMOAs à *C. acnes* : 1) une première inclut des vraies infections « homotypiques » impliquant un

TRAVAUX PERSONNELS

unique clone pathogène de *C. acnes* proinflammatoire lié à un seul évènement chirurgical. 2) une seconde entité inclut des cas « hétérotypiques » associés à l'absence d'une réponse inflammatoire systémique et à plusieurs interventions chirurgicales sans ablation de l'implant.

Ces deux entités cliniques décrites ci-dessus étaient regroupées sous une même entité par la définition microbiologique actuellement admise pour les IMOAs. Celle-ci consiste à poser le diagnostic d'une infection devant la présence d'un germe potentiellement contaminant dans au moins 2 prélèvements per-opératoires à condition que le germe soit identique dans les deux prélèvements. L'identité est définie par le fait qu'il s'agisse d'un germe appartenant au même genre et à la même espèce et possédant le même profil de sensibilité aux antibiotiques. Cette définition a été proposée sur la base des travaux d'Atkins (Atkins *et al.*, 1998) pour augmenter la spécificité du diagnostic microbiologique, actualisés pour palier au faible effectif des interventions comportant exactement deux prélèvements positifs. Cependant les staphylocoques à coagulase négative représentaient l'essentiel de l'effectif et la validation statistique était acquise sur la base de ces isolats qui présentent une variabilité majeure au niveau du profil de sensibilité aux antibiotiques. Les autres germes potentiellement contaminants tels que *C. acnes* étant beaucoup plus rares dans les cohortes d'infections périprothétiques, ils ne sont pas pris en compte dans la validation des critères diagnostiques microbiologiques. Pourtant, *C. acnes*, comme la majorité des germes anaérobies à Gram positif, présente un profil de sensibilité aux antibiotiques très peu variable.

Dans ce travail, nous démontrons clairement les limites de cette définition microbiologique pour *C. acnes*. En effet, sur nos 34 cas d'IMOAs définis

TRAVAUX PERSONNELS

microbiologiquement, 8 (23 %) devraient être considérés comme « contaminations » si la définition microbiologique incluait les données génotypiques. L'absence de réponse inflammatoire systématique de ces cas redéfinis comme « contaminants » par rapport aux cas « infectants » nous conforte dans l'idée que la définition microbiologique actuelle n'est pas adaptée à *C. acnes* et que le génotypage doit être inclus dans le diagnostic microbiologique des IMOAs à *C. acnes*, et probablement aux autres germes potentiellement contaminants ne présentant pas de profil de sensibilité aux antibiotiques variable. Ceci permettrait d'éviter à un certain nombre de patients un traitement médico-chirurgical lourd et injustifié.

Ce travail a permis donc de conclure que la variabilité de la présentation clinique des IMOAs à *C. acnes* pourrait être expliquée non pas par le génotype de *C. acnes* impliqué mais par la clonalité de l'infection, impactée du moins en partie par l'histoire chirurgicale du patient.

Ces résultats majeurs méritent d'être validés par une étude prospective multicentrique d'une plus grande cohorte de cas incluant un recueil exhaustif de données clinico-biologiques et le génotypage de tous les isolats de *C. acnes*.

3.3. Points importants

- 41% des cas d'IMOAs monomicrobiennes à *C. acnes* sont hétérotypiques dans notre série de 34 cas.
- L'inclusion des données génotypiques (MLST9) dans la définition microbiologique des IMOAs permet de reclasser 23% des cas infectieux en « contamination ».
- Les cas hétérotypiques étaient significativement associés à une valeur préopératoire de la CRP sérique ≤ 10 mg/L. A l'inverse, les cas homotypiques étaient associés une CRP > 10 mg/L.
- Les cas reclassés comme « contaminants » étaient significativement associés à une valeur préopératoire de la CRP sérique ≤ 10 mg/L. A l'inverse, les cas classés comme « infections » étaient associés une CRP > 10 mg/L.
- Les 4 principaux CCs (CC18, CC28, CC36 et CC53) étaient représentés dans notre série. Les 4 CCs étaient impliqués aussi bien dans les cas homotypiques que les cas hétérotypiques.
- Les STs (ST18, ST36, ST31) correspondant au fondateur confirmé de chacun des CCs étaient significativement plus impliqués dans les cas homotypiques. A l'inverse, les SLV (Single locus variant) et DLV (Double Locus Variant) étaient significativement plus impliqués dans les cas hétérotypiques.

II. Place de la technique SLST dans le diagnostic des IMOAs à *C. acnes*

1. Présentation

Un génotypage par MLST9 n'est pas envisageable en routine pour guider la prise en charge thérapeutique des patients. La technique MLST est en effet une technique coûteuse et chronophage et lourde à mettre en oeuvre, non adaptée à la routine.

La technique SLST est basée, comme son nom l'indique, sur le typage d'un seul locus et serait plus facile à implémenter en routine, avec en pratique une seule PCR et le séquençage d'un seul amplicon par isolat.

Afin de valider la technique sur notre collection avant de l'introduire dans les analyses de routine, nous avons testé sa capacité à discriminer nos 108 isolats de *C. acnes* caractérisés génotypiquement par MLST9. En effet le SLST a été construit par l'analyse des génomes séquencés existants, et notre collection contenant de nombreux STs non décrits précédemment est une excellente opportunité de validation de l'universalité de la technique.

Ce travail a été réalisé avec M^{elle} Anne Savalle, interne en biologie médicale, dans le cadre de son projet de mémoire de thèse pour l'obtention d'un doctorat en pharmacie-spécialité biologie médicale.

Article 2

En cours de soumission

**Single locus Sequence Typing (SLST) of
Cutibacterium acnes isolates: A step towards a
molecular and rapid diagnosis of *Cutibacterium
acnes* orthopedic device-related infections.**

Journal of Clinical Microbiology

Abstract

Objectives. We showed previously that molecular typing of *C. acnes* isolates is essential for microbiological diagnosis of *C. acnes* orthopedic device related infectious (ODRI). Genotyping by multilocus sequence typing (MLST) revealed that 41% of *C. acnes* ODRI are “heterotypic” as they include within the same case *C. acnes* isolates belonging to at least two distinct STs (sequence type). If genotypic data were taken into account in the ODRI microbiological definition, 26% of *C. acnes* ODRI would be considered as contaminations. MLST is a very discriminatory typing but time and cost consuming technique.

We propose to evaluate the capacity of Single Locus Sequence Typing (SLST) technique, a rapid and costless technique, to detect heterotypic and contamination cases. SLST of *C. acnes* has been recently proposed as a suitable typing technique for *C. acnes*.

Methods. SLST of 108 *C. acnes* isolates belonging to 34 *C. acnes* ODRI cases was performed. Classification of cases into heterotypic and contamination cases, using either SLST or MLST was compared.

Results. While MLST was able to classify 14 out of 34 cases as heterotypic and 9 out of 34 cases as contamination cases, SLST classified only 6 cases as heterotypic and 3 as contamination. Heterotypic and contamination cases in which isolates belong to distinct STs, part of the same clonal complex were undetectable using SLST as such isolates belonged to same SLST types.

TRAVAUX PERSONNELS

Conclusions. Our results show that current SLST performance appear insufficient as a diagnosis tool of *C. acnes* ODRI, waiting development of a SLST with a higher discriminatory power locus.

TRAVAUX PERSONNELS

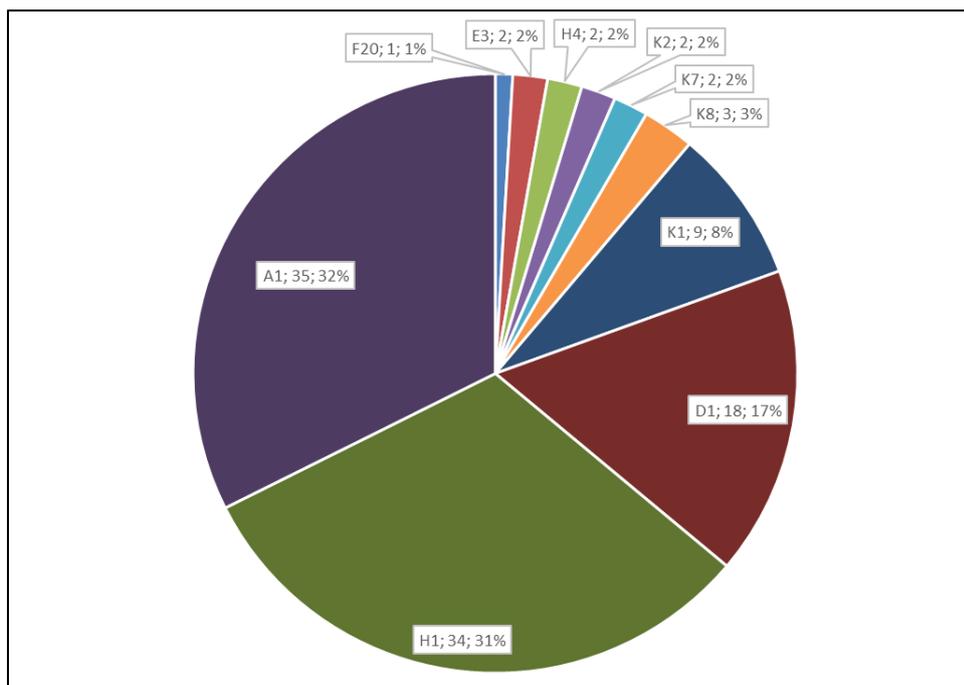


Figure 47. Typage des 108 isolats de *C. acnes* par SLST.

TRAVAUX PERSONNELS

2. Résultats et Discussion

Les 108 isolats de *C. acnes* appartiennent à 10 SLST types distincts (Figure 47). Parmi les 10 SLST types auxquels appartiennent nos isolats, un type serait nouveau. En attendant l'attribution d'un nom à notre type par les responsables de la banque de données SLST, nous nous sommes permis de lui attribuer le type F20 car sa séquence nucléotidique présente le plus haut pourcentage d'identité (99 % soit 482/484) avec le SLST type déjà décrit F4, comparé aux autres types décrits (annexes 6 et 7).

La caractérisation génotypique par MLST de ces isolats appartenant à 34 cas d'IMOA avait permis de catégoriser les cas de la façon suivante :

- 14 (41 %) cas sont hétérotypiques alors que les 24 (59 %) restants sont homotypiques.

- 9 (36 %) cas seraient des contaminations et les 25 (64 %) cas restants des infections.

Le SLST entrepris sur la même collection d'isolats a permis de caractériser les cas de la façon suivante :

- 6 cas (17,6 %) sont hétérotypiques alors que les 28 (82,4 %) restants sont homotypiques.

- 3 cas (8,8%) seront des contaminations et les 31 (91,2 %) cas restants des infections.

Ces résultats sont détaillés en annexe 8. Ils montrent que le SLST a un pouvoir discriminant nettement plus faible que le MLST. Les 108 isolats sont répartis sur 30 STs différents et seulement 10 SLST types distincts. Ainsi, le typage par SLST a permis de détecter moins de la moitié des cas hétérotypiques (6/14) définis par le génotypage par MLST, et le tiers (3/9) des contaminations définies initialement comme telles par le génotypage par MLST. Cette différence est expliquée par le fait que le

TRAVAUX PERSONNELS

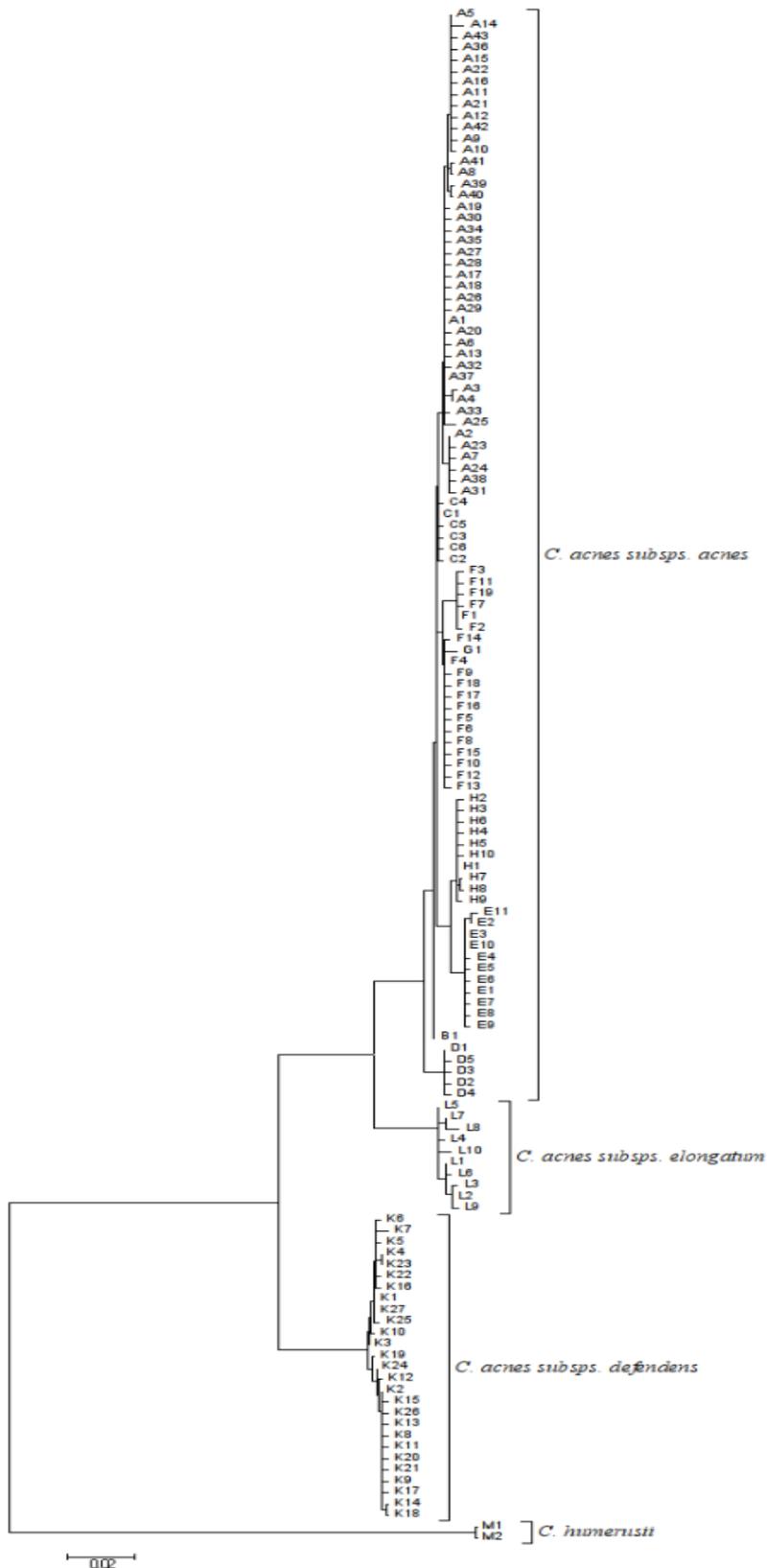


Figure 48. Dendrogramme représentant la phylogénie de la population de *C. acnes* sur la base de la séquence nucléotidique obtenue par SLST (Source : <http://medbac.dk/slst/pacnes>)

TRAVAUX PERSONNELS

typage par SLST est capable de détecter uniquement l'hétérotypie associée à la présence de STs appartenant à des complexes clonaux différents. Le SLST, avec le locus actuellement proposé, a un pouvoir discriminant ne dépassant pas le niveau du complexe clonal auquel l'isolat appartient.

Bien que les auteurs proposant cette technique pour le typage de *C. acnes* aient défini sa validité sur la capacité de prédire seulement le phylotype de l'isolat de *C. acnes*, il est décevant de constater ses limites pour une discrimination des isolats au-delà du phylotype et ce d'autant plus qu'une diversité de ce locus a été constaté ultérieurement par les auteurs. En effet, la base actuelle SLST décrit 141 SLST types différents (Figure 48). Pour rappel la base de données MLST9 contient actuellement 156 STs. Le fait que la diversité observée dans la base de données SLST ne soit pas corrélée à celle observée avec le MLST dans notre collection d'isolats de *C. acnes* ostéo-articulaires pourrait être expliquée du moins en partie par le fait que le locus choisi pour le SLST a été sélectionné et validé à partir d'une collection de 188 isolats dont 138 appartiennent au phylotype IA et 72 au CC18. Enrichir la base génomique de *C. acnes* par des isolats d'autres phylotypes pourrait ouvrir les portes sur un nouveau locus avec un pouvoir discriminant plus important adapté pour le diagnostic en routine des IMOAs à *C. acnes*. Le séquençage complet du génome de nos isolats prévu à très court terme pourrait contribuer à l'enrichissement de la base génomique de *C. acnes* par des souches ostéo-articulaires. Ceci nous permettrait de définir un locus SLST plus adapté pour le diagnostic moléculaire des IMOAs à *C. acnes*.

3. Points importants

- La méthode SLST a permis de prédire, dans notre série de 34 cas, l'hétérotypie des IMOAs à *C. acnes* uniquement quand les différents STs isolés d'un même cas appartenait à des CCs différents.
- le typage par SLST a permis de détecter moins de la moitié des cas hétérotypiques (6/14) définis par le génotypage par MLST9, et le tiers (3/9) des contaminations définies initialement comme telles par le génotypage par MLST9.
- La méthode SLST avec le locus actuellement proposé pour le typage de *C. acnes* ne permet pas de prédire, au même seuil que la MLST9, la clonalité de l'IMOAs à *C. acnes*.

III. Corrélation entre génotype et réponse inflammatoire *in vitro*

Une partie de ce travail a été réalisée dans le cadre d'un stage de M1 et de L3.

1. Présentation

Notre hypothèse de départ était que le génotype expliquerait la variabilité de la présentation clinique des IMOAs à *C. acnes* et ce notamment par son pouvoir inflammatoire. Or dans la première partie du travail, nous avons démontré de façon inattendue que la réponse inflammatoire systémique des IMOAs à *C. acnes* est plutôt due à la clonalité de l'infection qu'au génotype de *C. acnes* impliqué dans l'infection. Cependant, nous avons souhaité maintenir l'exploration de cette hypothèse pour deux principales raisons :

- la première est que nous avons observé une différence qualitative dans la nature des STs (fondateur du groupe vs SLV, DLV ou TLV) impliqués dans les infections homotypiques *versus* hétérotypiques.
- la seconde est que la CRP, marqueur sur lequel nous nous sommes basés pour l'exploration de la variabilité de la réponse inflammatoire, reflète la réponse inflammatoire systémique. Nous ne pouvons pas donc écarter une variabilité de la réponse inflammatoire locale en lien avec le génotype.

Nous avons donc poursuivi l'étude de la réponse inflammatoire *in vitro* d'une sélection d'isolats de *C. acnes* représentative des différents STs de notre collection. L'évaluation de la réponse inflammatoire des différents isolats a été réalisée par le biais de la réponse TNF α de monocytes humains THP-1 -différenciés en macrophages- après 24h d'infection par *C. acnes*.

TRAVAUX PERSONNELS

2. Méthodologie

2.1. Isolats de *C. acnes* et préparation de lots

2.1.1. Choix des isolats

Le choix des isolats à tester était fait sur la base des résultats de génotypage par MLST9. Brièvement, sur les 108 isolats disponibles, 43 isolats ST-épisodes ont été identifiés soit un isolat représentant un ST distinct par épisode. Sur ces 43 isolats, les 20 correspondant à des infections homotypiques ont été sélectionnés pour être évalués quant à leur réponse inflammatoire *in vitro* afin de pouvoir comparer cette réponse à la réponse inflammatoire observée *in vivo*. En parallèle, une souche de référence *C. acnes* ATCC11827 (IA1) et une souche clinique *C. avidum* responsable d'IPOA de hanche ont été incluses dans l'analyse.

2.1.2. Préparation des lots de congélation

A partir d'une culture pure de 5 jours de *C. acnes* sur gélose COS incubée en anaérobiose, des lots de congélation (suspension bactérienne dans du sérum physiologique + 10 % (v/v) de glycérol) d'une concentration bactérienne de 1 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) sont préparés et conservés à -80°C .

Initialement, la viabilité de *C. acnes* après décongélation –après 48h de congélation à -80°C - a été contrôlée par la technique de dénombrement bactérien sur 5 isolats distincts. Au moins 83% [83-100] de la concentration initiale (avant congélation) ont été retrouvés après décongélation.

2.2. Culture de macrophages THP-1

A partir d'une culture cellulaire de monocytes humains de la lignée THP-1, une différenciation en macrophages, par l'ajout de $10\ \mu\text{M}$ PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) dans un milieu ne contenant pas d'antibiotique est réalisée la veille de

TRAVAUX PERSONNELS

l'infection des macrophages THP-1 par *C. acnes* ou *C. avidum*. La suspension cellulaire est ajustée à 5.10^5 monocytes/mL. La concentration de macrophages le jour de l'infection était donc considérée comme identique (5.10^5 macrophages/mL).

2.3. Protocole d'infection des macrophages par *C. acnes*

Après détermination de la fourchette de MOI la plus discriminante des isolats, nous avons répété 3 fois la manipulation d'infection.

La manipulation d'infection se déroulait de la manière suivante :

- A J-1 de l'infection, une suspension de 5.10^5 monocytes/mL contenant 10 μ M de PMA (200 μ L/puits soit 10^5 cellules/puits) est distribuée sur une plaque 96 puits stérile traitée pour culture cellulaire.

- A J0 de l'infection :

- la différenciation en macrophages est contrôlée visuellement par microscopie.
- le milieu de culture est changé pour un milieu ne contenant pas d'antibiotiques (180 μ L/puits).
- les lots des isolats à tester sont décongelés et dilués dans du milieu de culture de façon à atteindre les MOIs à tester. Un contrôle par dénombrement des suspensions bactériennes (lot pur et dilutions) est réalisé à chaque manipulation. Un contrôle de pureté est également réalisé en parallèle par dépôt des suspensions sur une gélose COS incubée en aérobiose.
- L'infection est débutée par l'ajout de 20 μ L de la suspension bactérienne. Pour chaque MOI, une infection est réalisée dans 3 puits

TRAVAUX PERSONNELS

différents. Un témoin négatif (3 puits auxquels 20 μ L de milieu de culture stérile) est inclus sur chaque plaque.

- La plaque est incubée à 35 °C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 24 heures.

- A J1 de l'infection :

- Arrêt de l'infection par centrifugation et récupération du surnageant sur une plaque 96 puits conservée à -20 °C.
- Contrôle de la pureté du témoin négatif par l'absence de croissance bactérienne de 10 μ L de surnageant déposé sur gélose COS incubée à 35 °C en aérobiose pendant 48 heures.

Pour chaque isolat, la manipulation est répétée 3 fois par MOI.

2.4. Dosage TNF α

La réponse inflammatoire induite par chaque isolat est évaluée par le dosage de la réponse TNF α des macrophages activés par 24 heures de contact avec la suspension bactérienne de l'isolat à tester. Le dosage est réalisé sur le surnageant (dilué au demi) de culture après 24 h d'infection.

Le dosage est réalisé par technique ELISA par le kit Human TNF-alpha DuoSet DuoSet® ELISA (R&D Systems) en suivant les recommandations du fournisseur.

2.5. Analyse des données

La MOI réelle est calculée à J7 de l'infection à partir du dénombrement bactérien réalisé à J0 de l'infection (lecture des géloses COS à J7 de l'incubation à 35°C en anaérobiose). Des fourchettes de MOI de 0-1, 2-4, 4-9, 10-20, et 21-30 ont été définies pour l'analyse groupée des isolats. La moyenne de la réponse TNF α obtenue par MOI

TRAVAUX PERSONNELS

dans 3 puits par manipulation et dans 3 manipulations est calculée. Elle est exprimée en pg/mL (concentration moyenne par puits). La réponse TNF α pour chaque isolat testé et appartenant à notre collection de *C. acnes* est comparée à la réponse inflammatoire systémique *in vivo* – valeur préopératoire de la CRP- quand cette donnée est disponible.

TRAVAUX PERSONNELS

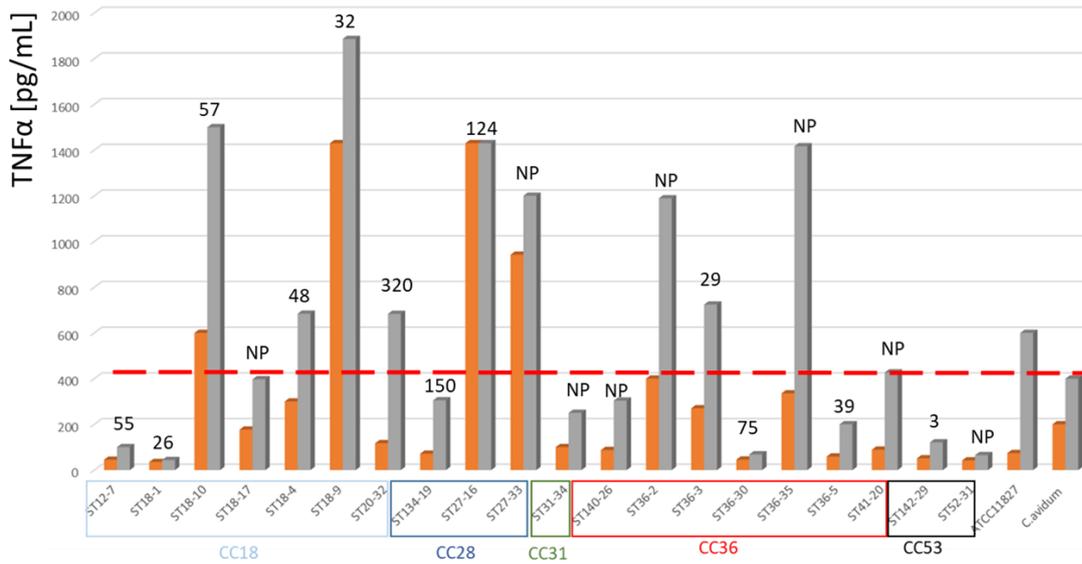


Figure 49. **La réponse TNFα par les macrophages THP-1 infectés par les différents isolats de *C. acnes* et les isolats contrôle.**

20 isolats cliniques de *C. acnes* responsables de cas « homotypiques » ont été testés, en plus d'une souche de référence *C. acnes* ATCC11827 et une souche clinique de *Cutibacterium avidum* responsable d'une infection sur prothèse de hanche. La réponse TNFα obtenue par les macrophages humains THP-1 en présence de chacun des isolats à une MOI comprise entre 2 et 4 (barre orange) et entre 4 et 9 (barre grise) est illustrée dans cette figure. La valeur préopératoire de la CRP sérique (en mg/L) obtenue dans le cas correspondant à l'isolat testé est indiquée au-dessus de chaque barre grise quand disponible. En l'absence de données de la CRP, « NP » est renseigné au-dessus de la barre grise.

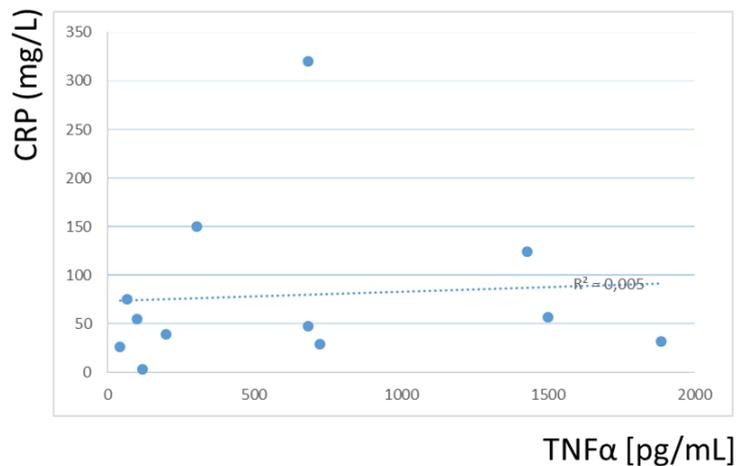


Figure 50. **Absence de corrélation entre la réponse inflammatoire *in vitro* (TNFα) et la réponse inflammatoire *in vivo* (CRP).**

La réponse TNFα obtenue pour une MOI entre 4 et 9 est corrélée à la valeur préopératoire de la CRP sérique du cas correspondant. 12 cas ou isolats avaient une valeur de CRP disponible et sont renseignés sur la figure.

3. Résultats

La concentration médiane de TNF α pour une MOI comprise entre 2 et 4, et entre 5 et 9, était de 108,6 [35-1430] pg/mL, et 412 [43-1886] pg/mL, respectivement, tous isolats cliniques de *C. acnes* confondus (Figure 49). Sur les 20 isolats ST-épisodes testés, 7 appartiennent au CC18, 7 au CC36, 3 au CC28, 2 au CC53, et 1 au CC31. Les réponses TNF α des différents isolats sont illustrées dans la Figure 49. Pour les 7 isolats appartenant au CC18, la réponse TNF α varie de 35 à 1430 et de 43,6 à 1886 pg/mL pour une MOI comprise entre 2-4 et 5-9, respectivement. Pour les 7 isolats appartenant au CC36, la réponse TNF α varie de 59 à 335 et de 68,6 à 1416,7 pg/mL pour une MOI comprise entre 2-4 et 5-9, respectivement. Pour les 7 isolats appartenant au CC28, la réponse TNF α varie de 71,3 à 1430 et de 305 à 1430 pg/mL pour une MOI comprise entre 2-4 et 5-9, respectivement. Pour les 2 isolats appartenant au CC53, la réponse TNF α est de 42 et 51, et de 65 à 121 pg/mL pour une MOI comprise entre 2-4 et 5-9, respectivement. Au sein d'un même CC, nous observons une variabilité de la réponse TNF α d'un isolat à l'autre. En effet, si on définit comme cut-off la valeur de 400 pg/mL de la réponse TNF α , pour une MOI comprise entre 5 et 9, et que l'on considère comme inflammatoire les isolats ayant une réponse TNF α égale ou supérieure à cette valeur, 10/20 (50%) isolats seraient considérés comme inflammatoires dont 4 (57% des isolats CC18) appartiennent au CC18, 2 (66,7% des isolats CC28) au CC28, et 4 (57% des isolats CC36) appartiennent au CC36. A noter qu'aucun des 2 isolats CC53 testés ne possèdent une réponse TNF α supérieure au seuil défini.

La réponse TNF α ne paraît pas corrélée à la valeur préopératoire sérique de la CRP chez les patients correspondants (Figure 50). Aucune différence significative n'a été observée entre la CRP des isolats inflammatoires et non inflammatoires. En effet, pour

TRAVAUX PERSONNELS

les isolats considérés comme inflammatoires dans notre analyse, la CRP médiane était de 52,5 [29-320] mg/L alors que pour les isolats considérés comme non inflammatoires, elle était de 47 [3-150] mg/L ($p=0,58$, Wilcoxon- Mann Whitney).

4. Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que la réponse inflammatoire *in vitro* -évaluée par la réponse TNF α des macrophages humains THP-1- de *C. acnes* est variable au sein d'un même CC et elle serait plus souche dépendante que CC dépendant. En effet, nous avons noté la présence d'isolats inflammatoires aussi bien dans les CC18, CC28 et CC36. Nous n'avons pas détecté d'isolats proinflammatoires dans le CC53 mais ce résultat mérite d'être vérifié sur un plus large panel d'isolats CC53- seuls 2 isolats CC53 ont été évalués dans notre travail.

Cette étude a certes des limites notamment l'évaluation de la réponse inflammatoire sur le niveau de production d'une seule cytokine. Les résultats de cette étude permettent de constater une variabilité intraCC de la réponse inflammatoire qui est négligée dans la majeure partie des publications s'intéressant à la variabilité de la réponse inflammatoire par phylotype, où un isolat unique représente chacun des phylotypes. Ces résultats orientent vers une variabilité de la réponse inflammatoire souche dépendante et non CC dépendant dans la population globale de *C. acnes*. Ceci mérite d'être approfondi par une analyse génomique complète par NGS afin de mieux caractériser les gènes définissant le pouvoir inflammatoire des souches de *C. acnes*. Par ailleurs, l'absence de corrélation entre la CRP et la réponse inflammatoire *in vitro* souligne les limites des modèles *in vitro* qui ne tiennent pas compte du rôle majeur de l'hôte dans le déclenchement de la réponse immune *in vivo*.

5. Points importants

- Sur un modèle d'infection de macrophages humains THP-1, nous avons démontré que la réponse inflammatoire –évaluée par la quantité de TNF α produite par les macrophages- des différents isolats de *C. acnes* est variable d'une souche à l'autre au sein même d'un seul CC
- Sur le même modèle, nous avons observé que des isolats inflammatoires existent dans les CC18, CC28 et CC36
- Nous n'avons pas observé de corrélation entre le caractère inflammatoire *in vitro* de l'isolat et la réponse inflammatoire *in vivo* générée par ce même isolat et évaluée par la valeur préopératoire de la CRP sérique

IV. Variabilité des caractéristiques culturelles de *C. acnes*

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. S. Jeverica, microbiologiste à l'Hôpital universitaire de Ljubljana, Slovénie.

1. Présentation

Dans cette partie du travail, nous nous sommes penchés sur la problématique de la variabilité de la croissance de *C. acnes* dans le diagnostic des IMOAs, déjà évoquée dans la littérature par une approche purement « clinique » avec comme objectif premier la distinction entre *C. acnes* « infectant » et « contaminant » et à moindre degré l'optimisation des conditions de culture pour une meilleure sensibilité et un raccourcissement des délais de culture de *C. acnes*. Les résultats sont peu probants et difficilement exploitables en raison d'une hétérogénéité importante dans le prétraitement des prélèvements et les milieux de culture utilisés aussi bien entre les quelques études publiées à ce sujet qu'au sein même d'une seule étude.

Dans notre série de cas d'IMOAs décrite ci-dessus, tous les prélèvements ont subi le même prétraitement, un broyage mécanique en présence de billes. Nous présumons que ce prétraitement permettrait d'extraire d'une façon optimale les bactéries intratissulaires et de s'affranchir ainsi de l'effet de l'inoculum pouvant impacter la différence de croissance de *C. acnes* entre milieux liquides et solides.

Nous avons entrepris alors une comparaison de la croissance sur milieux solides et liquides à partir des prélèvements (« *ex vivo* ») de nos isolats de *C. acnes* caractérisés génotypiquement. Les données de croissance « *ex vivo* » ont été recueillies rétrospectivement à partir du SGIL des laboratoires de microbiologie. La caractérisation génotypique des souches nous permettrait par la suite d'établir un éventuel lien entre phénotype culturel et génotype. Pour s'affranchir d'une variabilité

TRAVAUX PERSONNELS

de croissance « *ex vivo* » entre prélèvements liée à la variabilité de l'inoculum d'un épisode infectieux à un autre, nous avons évalué, dans le cadre de ce travail, la croissance de ces mêmes isolats sur les mêmes milieux de culture solides et liquides utilisés en routine à partir d'une culture initiale standardisée identique d'un isolat à l'autre (« *in vitro* »).

En parallèle de ce travail, nous avons également réalisé un travail de comparaison sur les isolats de *C. acnes in vitro* des performances des 5 différents flacons anaérobie d'hémoculture disponibles dans le commerce et qui pourraient être potentiellement utilisés par les différents laboratoires de microbiologie pour le diagnostic microbiologique des IMOAs. Bien que les études soient unanimes sur la place des flacons d'hémoculture dans le diagnostic des IMOAs, aucune étude n'a proposé à notre connaissance une comparaison des différents milieux disponibles que ce soit pour *C. acnes* que pour les autres espèces bactériennes qui font partie de l'épidémiologie des IMOAs et non des bactériémies. Ce point nous a paru important d'autant plus que le choix des flacons d'hémoculture utilisés au sein d'un laboratoire de microbiologie et l'automate correspondant est motivé, du moins initialement, par son utilisation dans le cadre de diagnostic des bactériémies.

2. Méthodologie et résultats

La méthodologie et les résultats de cette partie du travail sont entièrement exposés dans l'article ci-dessous soumis au journal « *Clinical Microbiology and Infection* ».

TRAVAUX PERSONNELS

1 **Cultivation of *Cutibacterium acnes* from orthopedic-device related infections (ODRI): A**
2 **comparative genotypic study of *ex vivo* and *ex vitro* growth profiles**

3 Authors: Faten El Sayed^{1, 2}, Petra Camernik³, Anne-Laure Roux^{1, 2}, Thomas Bauer⁵, Jean-
4 Louis Herrmann^{2, 6}, Jean-Louis Gaillard^{1, 2}, Samo Jeverica³, Martin Rottman^{2, 6}.

5 ¹Department of Microbiology, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, Boulogne-Billancourt, France.

6 ²UMR1173, Inserm and UFR Des Sciences de la Santé Simone Veil, University of Versailles
7 Saint-Quentin, Montigny-le-Bretonneux, France. ³Institute of Microbiology and Immunology,

8 Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia. ⁵Orthopedic Surgery

9 Department, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, Boulogne-Billancourt, France. ⁶Microbiology
10 Department, Hôpital Raymond Poincaré, AP-HP, Garches, France

11 Keywords: *Cutibacterium acnes*, bone and joint infection, phylotype or clonal complex,
12 growth delay

13 Running title: *ex vitro* and *ex vivo* growth characteristics of ODRI *C.acnes* isolates

14 Corresponding author: Faten El Sayed

15 UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ

16 2, avenue Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

17 Tél: + 33170429402; @: faten.elsayed@aphp.fr

18 Alternate corresponding author: Martin Rottman

19 UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ

20 2, avenue Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

21 Tél: + 33170429402; @: martin.rottman@aphp.fr

22 **ABSTRACT**

23 Objectives. *Cutibacterium acnes* is a fastidious anaerobic causing orthopedic device related
24 infections (ODRI). We studied the performance of different media *ex vitro* and *ex vivo* relative
25 to its genotype.

26 Methods. The growth characteristics of 43 genotyped ODRI *C.acnes* isolates were evaluated
27 by comparing their times to detection (TTD) and positivity rates (PR) on different solid and
28 blood culture media (BCM) when cultured from 29 clinical samples (*ex vivo*) and from 43
29 cryobanked subcultures (*ex vitro*).

30 Results. *Ex vivo*, 72.4% isolates grew on BD Lytic Anaerobic vials (LyticAna), 55.2% on
31 anaerobic blood and 24.1% on CO₂-chocolate agar. Cultures were solely positive on LyticAna
32 vials in 34.5% while 27.6 % grew on one or more solid media with negative LyticAna. CC18
33 isolates grew in liquid and solid media (p=0.04) whereas CC36 appeared to grow on either
34 solid or liquid media (p=0.012). The evaluation of Becton Dickinson and bioMérieux BCM *ex*
35 *vitro* showed that only media free of antibiotic chelators adequately supported growth with a
36 PR of 93% for both vendors. The most noteworthy significant difference between CCs was
37 observed for CC36 isolates with shorter TTDs in LyticAna. The *ex vivo* TTD of an isolate was
38 not predictive of its *ex vitro* TTD, arguing for environmentally induced changes in growth
39 characteristics.

40 Conclusion. These results shed new light on the media required for the microbiological
41 documentation of *C.acnes* ODRI. Some growth characteristics appear to be correlated with
42 the genotype of the strains while others appear to be more dependent on its environment.

43 INTRODUCTION

44 *Cutibacterium acnes* is a fastidious, low virulence, anaerobic aerotolerant microorganism
45 involved in orthopedic device related infections. An extended incubation is required to
46 maximize the recovery of *C.acnes* from infected prosthetic joints due to a doubling time of five
47 hours, longer than any other anaerobic bacteria¹. Although the time to detection (TTD) of
48 *C.acnes* in intraoperative samples varies according to publications, findings support the need
49 for a two-weeks incubation in anaerobic media. Indeed the time to detection of *C. acnes* can
50 range from 3 to 13 days, which has been attributed -as suggested by different authors²⁻⁴ - by
51 the initial bacterial load of the specimen. However, it is reasonable that the different phylotypes
52 of *C.acnes* could have different metabolic pathways influencing the detection time of *C.acnes*
53 in different culture media.

54 The use of automated broth culture of ODRI related specimen using blood culture media (BCM)
55 is critical to the optimized detection of bacterial growth in PJI diagnosis, both to increase the
56 sensitivity of intraoperative samples culture and to reduce the time to detection. However, while
57 numerous BC vials are available, only a few studies have evaluated their relative performance
58 for PJI diagnosis⁵⁻⁸, and fewer have focused on the specific detection of *C.acnes*. A single
59 publication⁹ has shown that a significant delay in the detection of *C.acnes* growth can be
60 observed depending on the type of vial using standardized inocula from biobanked isolates.
61 The growth characteristics of *C.acnes* isolates when first cultured from the intraoperative
62 sample (“*ex vivo*”) have not been previously compared to ulterior subcultures from
63 cryopreserved bacterial stocks (“*ex vitro*”). We explored the performance and relevance of
64 different media *ex vitro* and *ex vivo* to decipher the mechanisms underlying the discrepancies
65 of the existing literature. We evaluated the positivity rate (PR) and time to detection (TTD) of
66 43 ODRI *C.acnes* isolates successfully genotyped by MLST (multi-locus sequence typing) in
67 five anaerobic BCM and their dedicated instruments. We also compared the PR and TTD of
68 29 isolates in primary cultures to subcultures on the different media. We show *ex vitro* that
69 antibiotic chelating additives (charcoal and polymers) negatively impact recovery and that

70 isolates from different clonal complexes have different requirements, but that major factors
71 influencing the *ex vivo* culture kinetics are independent from the genomic content of the
72 isolates and likely governed by the epigenetic adaptation to the host environment.

73 **MATERIAL AND METHODS**

74 **Inclusion criteria of *C.acnes* ODRI isolates**

75 *C.acnes* ODRI isolates included were described in a previous retrospective study conducted
76 in a French reference center for complex bone and joint infections over a 5-year-period ¹⁰.
77 Briefly, all microbiologically significant, cryobanked, genotyped monomicrobial *C.acnes* ODRI
78 isolates were analyzed.

79 Only non-duplicate *C.acnes* isolates -belonging to a distinct ODRI case and a distinct ST- were
80 included in the present study.

81 ***Ex vivo* bacteriological procedures**

82 Intraoperative tissue samples collected in 30-ml containers were mechanically disrupted in
83 15ml sterile water with stainless steel beads using a Retsch MM400 beadmill (Verder, Cergy-
84 Pontoise, France)¹¹. Beadmilled sample suspensions (100µl) were then cultured on solid
85 medium (Columbia sheep blood agar incubated under aerobic and anaerobic atmospheres or
86 chocolate agar under 5% CO₂) and three ml on BCM (Bactec Peds+ and Lytic10 anaerobic
87 monitored on a Bactec FX instrument, BD Diagnostics, Sparks, MD) incubated respectively
88 seven and fourteen days. Isolates were identified by mass spectrometry using a Microflex LT
89 instrument and the current CE-marked IVD Biotyper software (Bruker Daltonique,
90 Wissenbourg, France). Growth on agar plates was checked after 24, 48 hours and 5 days of
91 incubation. Antimicrobial susceptibility testing was performed with parallel subculture on
92 anaerobic blood agar used for biobanking on cryobeads. The PR and the TTD on each culture
93 media were retrospectively retrieved from the laboratory information software when the data
94 was available.

TRAVAUX PERSONNELS

95 ***Ex vitro* Growth of *C.acnes* isolates**

96 For each isolate, we prepared a 100 CFU/mL suspension in sterile saline water. We inoculated
97 1mL of the suspension in BacT/ALERT SN, FN, FN+, BD Bactec Plus Anaerobic (Ana+), and
98 BD Bactec Lytic Anaerobic (LyticAna) BCM. No blood or additives were added. Vials were
99 loaded after inoculation in the corresponding instrument. Growth was monitored for 14 days or
100 until positivity. All positive vials were subcultured on solid media (aerobic and anaerobic
101 conditions) and colonies identified using MALDI-TOF MS. One hundred microliters of the same
102 suspension was plated on anaerobic blood agar, CO₂ chocolate agar and incubated 14 days.
103 Experiments were performed in triplicate.

104 **Data and Statistical analyses**

105 Univariate analysis was performed using Fisher's exact test for categorical variables and
106 Wilcoxon - Mann Whitney test for continuous variables.

107 BC instruments provided the duration (in hours) of incubation prior to detection (Time to
108 detection, TTD). In order to compare the different BC vials, we performed a survival analysis
109 where the positivity of a vial was considered an event and a non-detected vial a censored
110 subject. On this basis, a survival curve was built where positive vials "died" upon detection and
111 "surviving" vials were never flagged positive. Calculation of the median survival TTD and
112 survival curve analysis were performed using GraphPad Prism. Log-rank test was used to
113 determine survival curve difference significance.

114 A p-value <0.05 was considered significant for all statistical analyses.

115 **RESULTS**

116 **Strain characteristics**

117 The 43 non-duplicate isolates belong to the four main clonal complexes (CCs) of *C.acnes*
118 defined by MLST: 37.2% (16/43) of isolates belong to CC36, 25.6% (11/43) to CC18, 23.2%
119 (10/43) to CC53, 14% (6/43) to CC28.

TRAVAUX PERSONNELS

120 **Ex vivo positivity rates and time to detection**

121 The PR for chocolate agar (CO₂), blood agar (anaerobic) and LyticAna vial were available for
122 29 isolates and shown in Figure 1. The TTD in BC vials was available for 21 samples with a
123 median TTD for the 13 positive LyticAna culture of 100 hours (4.16 days) [50-260 hours]. 10/21
124 LyticAna positive samples fail to grow on solid media, which could be explained by the
125 inoculum as advocated in the literature. However, 5/16 anaerobic agar positive samples fail to
126 grow in LyticAna vials, in spite of an inoculum that is 30 times larger. It is therefore very unlikely
127 that the inoculum is the sole factor involved in the TTD of *C.acnes*.

128 When we analyzed the culture characteristics of the isolates depending on the CC, we found
129 evidence of different growth profiles based on the positivity of primary cultures on solid and/or
130 liquid media (Figure 2). CC18 isolates grew in both liquid and solid media whereas CC36
131 appeared to grow selectively on either solid or liquid media. The specialization towards solid
132 or liquid media of CC36 and the ubiquitous growth of CC18 are both significantly different from
133 the behavior of other CCs ($p=0.04$ and $p=0.012$, respectively). The genotype of the isolate is
134 a dominant factor explaining the culture profile of *C.acnes*, further discrediting the hypothesis
135 of variations in inoculum.

136 **Ex vitro Positivity rate and time to detection**

137 42/43 isolates grew on anaerobic blood agar (2-3 d) and 32/43 on chocolate agar (3-6 d). The
138 different BC vials exhibited a wide range of performance both in PR and TTD as illustrated in
139 Figure 3A. FN (containing charcoal) showed the lowest PR (2.3%) while both SN (not
140 supplemented) and LyticAna (containing saponin) showed the highest PR (93%). PR was
141 significantly higher for SN and LyticAna, compared to FN+ ($p<10^{-5}$) and Ana+ ($p<10^{-4}$). TTD
142 was significantly different shorter in LyticAna than in SN (median survival TTD of 102 vs 143
143 hours, $p = 0.034$) (Figure 3B).

144 LyticAna and SN show comparable PR and TTD for CC18, CC28. For CC36, the median
145 survival TTD was significantly shorter with LyticAna compared to SN ($p<10^{-3}$) (Figure 3B).

146 Median survival TTD was significantly longer for CC36 (209.5 hours) isolates compared to
147 other isolates (120 hours) ($p = 0.02$) in SN. Median survival TTD was significantly shorter for
148 CC36 (91.75 hours) isolates than other isolates (116 hours) in LyticAna ($p = 0.048$).

149 Ana+ and FN+ show comparable PR for all CCs except CC18 isolates that showed a
150 significantly different PR in Ana+ (63.6%) compared to FN+ (9%) ($p = 0.027$) (Figure 3B).

151 **Comparison of positivity rate and TTD of primary cultures and subcultures**

152 Out of the 29 isolates with available *ex vivo* data, 13 did not grow on anaerobic blood agar *ex*
153 *vivo* of which 12 were capable of growth after subculture. Similarly, 22/29 were incapable of
154 growth on CO₂-chocolate agar *ex vivo* of which 11 grew *ex vitro*. The growth requirements of
155 *C. acnes* thus depend on environmental factors too. Negative chocolate subcultures were
156 predominantly linked to CC53 which represent 50% of negative chocolate subculture isolates
157 vs 11.7% of positive ones ($p = 0.038$).

158 The PR and TTD of primary cultures and subcultures in LyticAna were available for 21
159 samples: 6/21 (28.6%) were negative in primary cultures but positive in subcultures;
160 2/21 (9.5%) was negative in both cultures. Median TTD for positive samples was comparable
161 between *ex vivo* and *ex vitro*: 100 [50-260] and 105 [61-195] hours, respectively. However,
162 when each isolate is considered, there is no correlation between the *ex vivo* and *ex vitro* TTD
163 (Figure 4), arguing for a major influence of environmental factors.

164 **DISCUSSION**

165 We have shown that isolates from the four major clonal complexes of *C. acnes* exhibit
166 significantly different growth requirements, both *ex vivo* and *ex vitro*. Some growth
167 characteristics appear to be correlated with the genotype of the strains while others appear to
168 be more dependent on the environmental constraints. Our results shed new light on the media
169 required for the microbiological documentation of *C. acnes* ODRI and the culture strategies that
170 need to be implemented.

TRAVAUX PERSONNELS

171 There have been previous studies on the microbiological methods allowing the optimal
172 microbiological diagnosis of *C.acnes* ODRI. Schäfer *et al* ¹² pointed the need to implement a
173 fourteen-days culture but the specific media positive for *C.acnes* were not specified. Butler-
174 Wu ³ confirmed 13 days incubation to be optimal for *C.acnes* detection, and further showed
175 that a combination of aerobic and anaerobic media was necessary. Bossard *et al.* determined
176 the best media to be used for the diagnosis of *C.acnes* bone and joint infections and found
177 that an anaerobic broth was the most sensitive (66%), followed by anaerobic agar plates (42%)
178 with only 5% of positive aerobic agar plates ². These results are in line with our results,
179 respectively 75% for LyticAna, 55% for anaerobic agar and 24% for CO₂.chocolate agar. The
180 overall increase in media sensitivity we report could be the result of the beadmill disruption of
181 the samples or the performance of the BCM. Compared to the previous literature, we show
182 that the adequate documentation of *C.acnes* indeed requires multiple media, including an
183 anaerobic broth and agar plates in both anaerobic and CO₂ atmospheres.

184 Rentenaar *et al* reported the performance of the Anaerobic and Lytic media from Becton
185 Dickinson on subcultured *C.acnes* isolates and confirmed that the Lytic medium was greatly
186 superior⁹. Here we go further by testing BCM provided by the leading vendors. We have shown
187 that the addition of antibiotic chelators, charcoal and polymeric beads, proves highly
188 deleterious to the growth of *C.acnes*, to the point that only one subcultured isolate is capable
189 of growth in charcoal supplemented broth, whereas all but one isolates were capable of growth
190 in the same medium with no added charcoal. Interestingly, and in line with our findings, the
191 performance of the charcoal-containing BC vials proved disastrous for the enrichment of
192 sonicate fluids in Bossard's report ².

193 The analysis of growth kinetics within each CC shows significant differences both in PR and
194 TTD. Interestingly, CC18 and CC36 - that evidenced significantly different behaviors in their
195 growth profile *ex vivo*, growing on solid and/or liquid media - are the two CCs that also evidence
196 differential affinities for some BCM formulations *ex vitro*.

TRAVAUX PERSONNELS

197 Our study suffers from some limitations. Firstly, we have not tested *ex vivo* all the media that
198 we studied *ex vitro*, and our LIS connectivity has precluded us from obtaining the *ex vivo* TTD
199 for all isolates. This limits the size of the sample available for analysis and comparison.
200 Secondly, the duration of incubation of the solid media is restricted to five days in the routine
201 processing of the samples, and it is theoretically possible that a longer incubation could
202 improve the sensitivity of these media. However, when our results are compared to the
203 extended incubations in the literature we do not suffer from diminished performance, it is
204 therefore unlikely that further extension of the incubation would yield more positives. The
205 mechanical beadmilling of the samples could extract clumps of branched bacteria from the
206 tissues and allow shorter TTD on solid media, compensating a shorter incubation.

207 In spite of these limitations, we are able to clarify some longstanding questions raised by the
208 challenging cultivation of *C.acnes*. Firstly, our study is the first to assess the impact of the
209 genetic background of the isolates on their culture profile. We show for the first time that the
210 different CCs have significantly different behaviors relative to solid or liquid media, as well as
211 relative to the formulation of the broth media. Secondly, our original comparison of the PR and
212 TTD of the strains in primary culture and following subculture shows that genetic as well as
213 environmental factors govern the culture profile of *C. acnes*.

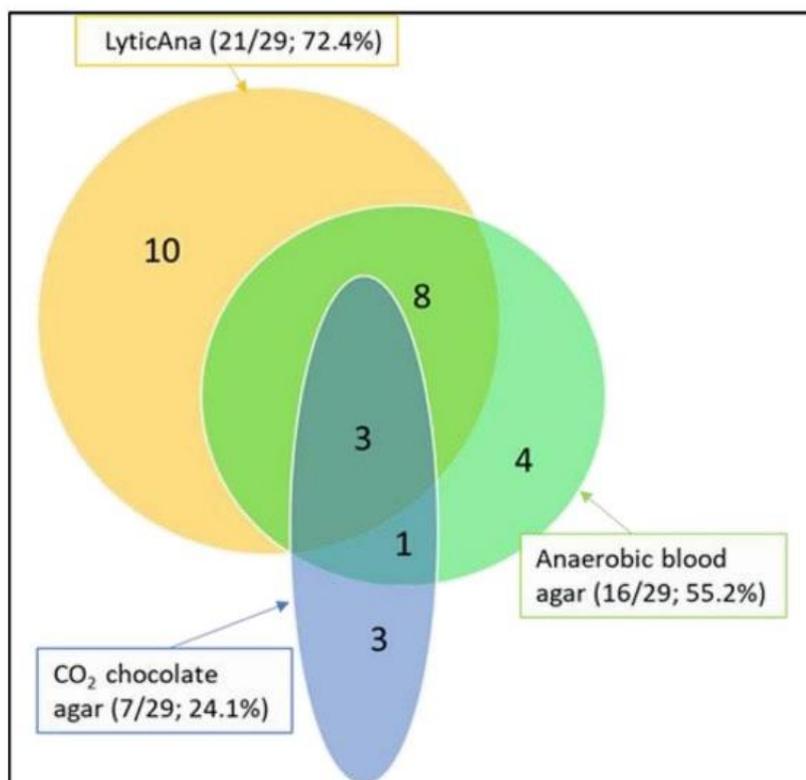
214 We were able to refute the hypothesis that differences in inoculum were the primary cause for
215 the variability in TTD. We show that both the genotype and the environment shape the culture
216 profile of *C.acnes*. The genotype could explain the presence or absence of biochemical
217 pathways that impact the growth on different media. However we have found that the *ex vivo*
218 or *ex vitro* origin of the bacteria exerts a major influence on the PR and TTD. There are many
219 ways in which the host environment could impact the growth kinetics of *C. acnes*: persistent
220 bacteria recovered from a biofilm would be expected to have a longer latency than bacteria
221 grown *in vitro*; intracellular microorganisms would be expected to use specific metabolic
222 pathways to survive in this niche. In both these cases, the switch to an *in vitro* environment
223 could require an adjustment period that could explain the lag in growth observed. Conversely,

TRAVAUX PERSONNELS

224 the *in vivo* induction of specific pathways could provide an advantage compared to strains
225 revived from cryobank storage and expected to grow on different media. Definitive evidence
226 would need to be gathered to fully address this issue.

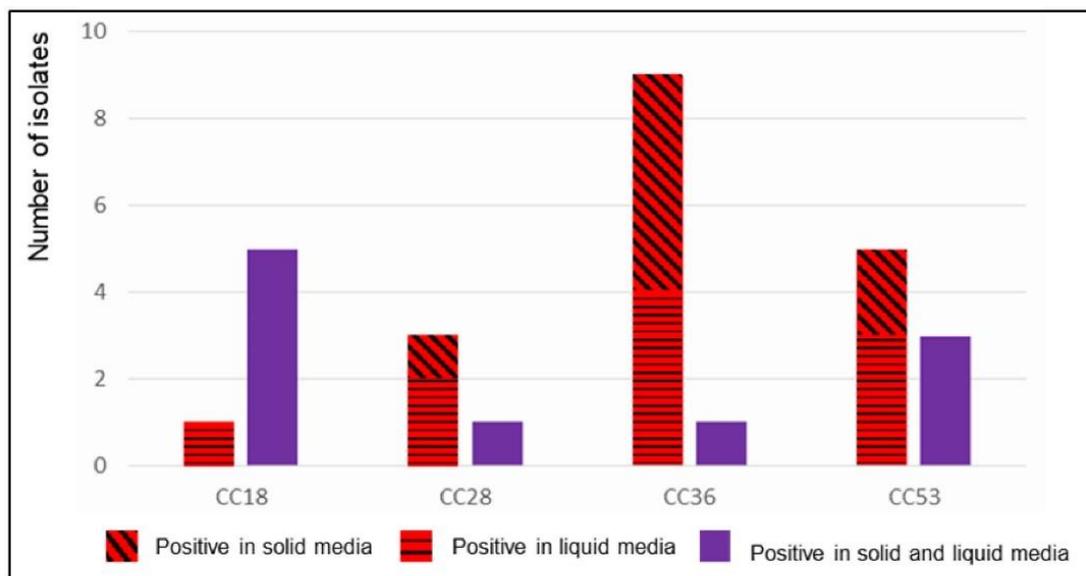
227 The practical consequences of this work are numerous for the clinical microbiologist: A full
228 evaluation of the BCM needs to be conducted prior to its implementation in an “off label”
229 application such as bone and joint samples enrichment. We confirm the need for an extended
230 incubation, even when BCM are used. Finally, we show the need for solid media in both CO₂
231 and anaerobic atmospheres.

232 The comparative analysis of the metabolic pathways based on CCs will be performed.
233 Similarly, the transcriptomic analysis of bacteria grown in host-mimicking environments, using
234 cell-culture or biofilm models, will provide clues to the metabolic changes impacting the
235 *C.acnes* culture profile.



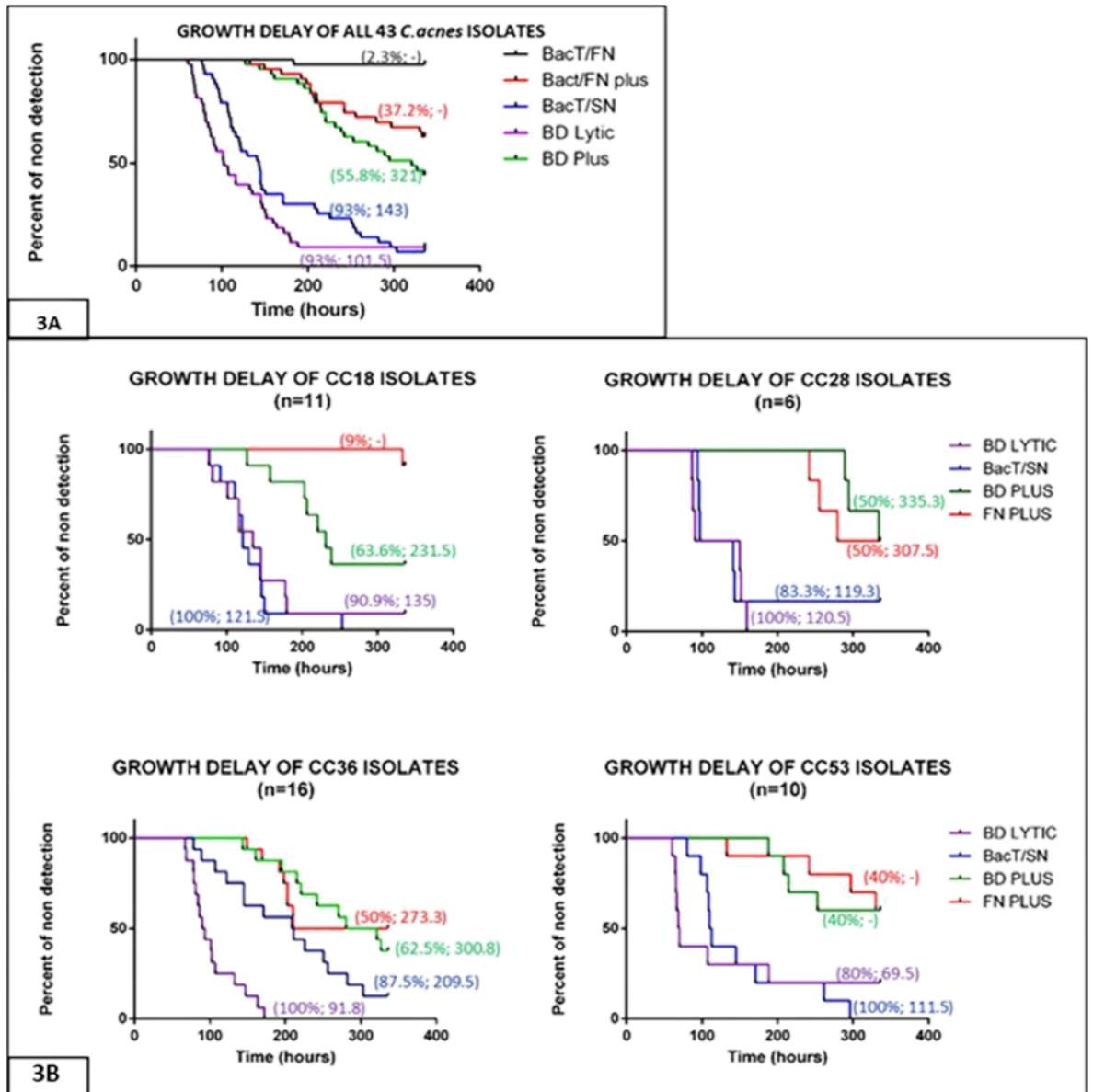
236

237 Figure1. *Ex vivo* growth characteristics of 29 *C. acnes* ODRI isolates.



238

239 Figure 2. Comparative *ex vivo* growth characteristics of 29 *C. acnes* isolates, depending on their clonal complex.

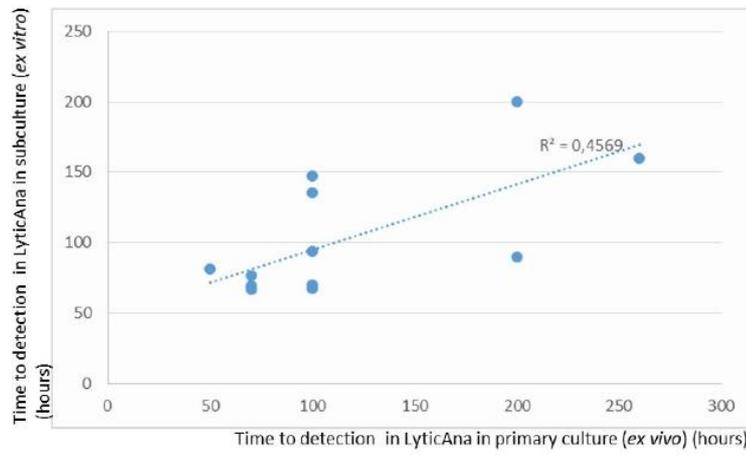


240

241 **Figure 3. Growth delay of 43 subcultured (*ex vitro*) *C. acnes* isolates in five different**
 242 **blood culture vials, all isolates included (3A) and by clonal complex group (3B).**

243 Positivity rate and median survival time to detection are indicated between brackets. In order to compare
 244 the different blood culture vials, we performed a survival analysis where the positivity of a vial was
 245 considered an event and a non-detected vial a censored subject. On this basis, a survival curve was
 246 built where positive vials “died” upon detection and “surviving” vials were never flagged positive.
 247 Calculation of the median survival TTD and survival curve analysis were performed using GraphPad
 248 Prism.

249



250

251 Figure 4. Correlation between time to detection in LyticAna in primary culture (*ex vivo*) and subculture (*ex vitro*).

252 Only *C. acnes* isolates positive in both primary culture and subculture were included in the analysis. As shown by the trendline, no correlation

253 exists between both time to detection.

254 REFERENCES

- 255 1. Hall, G. S. *et al.* Growth curve for propionibacterium acnes. *Curr. Eye Res.* (1994).
256 doi:10.3109/02713689408999875
- 257 2. Bossard, D. A. *et al.* Optimal length of cultivation time for isolation of
258 Propionibacterium acnes in suspected bone and joint infections is more than 7 days. *J.*
259 *Clin. Microbiol.* (2016). doi:10.1128/JCM.01435-16
- 260 3. Butler-Wu, S. M. *et al.* Optimization of periprosthetic culture for diagnosis of
261 Propionibacterium acnes prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* (2011).
262 doi:10.1128/JCM.00450-11
- 263 4. Frangiamore, S. J. *et al.* Early versus late culture growth of Propionibacterium acnes
264 in revision shoulder arthroplasty. *J. Bone Jt. Surg. - Am. Vol.* (2015).
265 doi:10.2106/JBJS.N.00881
- 266 5. Minassian, A. M. *et al.* Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for
267 diagnosis of prosthetic joint infections: Easy and fast. *BMC Infect. Dis.* (2014).
268 doi:10.1186/1471-2334-14-233
- 269 6. Peel, T. N. *et al.* Improved diagnosis of prosthetic joint infection by culturing
270 periprosthetic tissue specimens in blood culture bottles. *MBio* (2016).
271 doi:10.1128/mBio.01776-15
- 272 7. Portillo, M. E. *et al.* Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by
273 inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* (2015).
274 doi:10.1128/JCM.03683-14
- 275 8. Shen, H., Tang, J., Wang, Q., Jiang, Y. & Zhang, X. Sonication of explanted
276 prosthesis combined with incubation in BD Bactec bottles for pathogen-based
277 diagnosis of prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* (2015).
278 doi:10.1128/JCM.02863-14

TRAVAUX PERSONNELS

- 279 9. Rentenaar, R. J., Kusen, S. M., Riemens-Van Zetten, G. M. A. & Van Mourika, M. S.
280 M. Detection of clinical cutibacterium acnes isolates in different becton dickinson blood
281 culture vials. *Journal of Clinical Microbiology* (2018). doi:10.1128/JCM.01486-17
- 282 10. El Sayed, F. *et al.* Molecular Typing of Multiple Isolates Is Essential to Diagnose
283 *Cutibacterium acnes* Orthopedic Device–related Infection. *Clin. Infect. Dis.* (2018).
284 doi:10.1093/cid/ciy952
- 285 11. Roux, A. L. *et al.* Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a
286 periprosthetic specimen. *Clin. Microbiol. Infect.* (2011). doi:10.1111/j.1469-
287 0691.2010.03359.x
- 288 12. Schäfer, P. *et al.* Prolonged Bacterial Culture to Identify Late Periprosthetic Joint
289 Infection: A Promising Strategy. *Clin. Infect. Dis.* (2008). doi:10.1086/592973

3. Points importants

- L'association de milieux liquides et solides est nécessaire pour une détection optimale de *C. acnes* dans les prélèvements per-opératoires d'infection sur matériel ostéo-articulaire.
- Les différents flacons d'hémoculture disponibles dans le commerce présentent des performances variées vis-à-vis de la détection de *C. acnes ex vitro*.
- Les différents complexes clonaux de *C. acnes* présentent des caractéristiques culturelles différentes *ex vitro* et *ex vivo*.
- La comparaison des caractéristiques culturelles *ex vitro* et *ex vivo* des isolats de *C. acnes* a montré que celles-ci dépendent à la fois du génotype de la souche et des contraintes environnementales subies par la souche.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce manuscrit, nous avons dans un premier temps grâce aux résultats inattendus de la caractérisation génotypique des isolats de *C. acnes* responsables d'IMOA, démontré que la réponse immune de l'hôte (via la CRP) générée à l'arrivée d'une souche de *C. acnes* dans l'environnement périprothétique n'est pas dépendante du génotype de la souche. En effet, des isolats distincts appartenant à un même CC peuvent être associés à deux évènements différents : i) Dans un cas, un isolat appartenant à un CC donné sera capable de générer une réponse immune chez l'hôte. Il s'agit des isolats appartenant aux cas définis comme homotypiques dans le manuscrit. ii) Dans un autre cas, un isolat appartenant à ce même CC peut se retrouver à la surface du matériel ostéo-articulaire sans déclencher une réponse immune chez l'hôte. Il s'agit des isolats appartenant aux cas définis comme hétérotypiques dans le manuscrit. Ces résultats permettent à la fois d'apporter des éléments de réponse majeurs à la physiopathologie de l'IMOA à *C. acnes* mais aussi démontrent les limites de la définition microbiologique actuelle des IMOA.

Ces résultats ont pu être obtenus parce que dans notre démarche expérimentale, nous avons fait le choix de typer tous les isolats de *C. acnes* recueillis dans les IMOAs monomicrobiennes – choix jamais fait jusque là- et d'utiliser la technique de typage la plus discriminante qui existe, le MLST. Ce travail, certes fastidieux, a été fructueux et permis de répondre à une question majeure concernant la physiopathologie des IMOA à *C. acnes*.

Ayant en tête comme objectif final de nos travaux de recherche, l'amélioration de la prise en charge des IMOAs en général, et les IMOAs à *C. acnes* en particulier, nous avons voulu tester l'applicabilité de la SLST, une technique de typage de *C. acnes* récemment décrite et largement vendue par les différentes équipes comme la

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

technique de typage qui devrait remplacer le MLST. Cette technique présente des avantages notables par rapport au MLST : Elle consiste à amplifier et séquencer un unique locus contrairement au MLST qui, pour *C. acnes*, consiste à amplifier et séquencer 9 loci distincts. Cette technique sera donc largement moins coûteuse et plus utilisable en routine clinique au laboratoire de microbiologie que le MLST. Cependant, malheureusement, le SLST, avec le locus actuellement défini, n'a pas montré un pouvoir discriminant aussi puissant que le MLST. Seule l'intégration des techniques de séquençage nouvelle génération (NGS) du génome entier aux techniques de routine pratiquées au laboratoire de microbiologie pourrait apporter les mêmes éléments de réponse que le MLST en temps réel. Ceci permettra d'optimiser la prise en charge médico-chirurgicale des IMOAs à *C. acnes*, et par analogie aux autres germes potentiellement contaminants pour lesquels la définition microbiologique actuelle des IMOAs fait défaut.

De plus, nous avons mené une étude originale comparative des caractéristiques culturelles *ex vivo* (au sein des prélèvements per-opératoires) et *ex vitro* (à partir des cryobilles congelés à -80°C à partir des isolats de *C. acnes* recueillis de ces mêmes prélèvements) de notre collection d'isolats de *C. acnes* caractérisés génotypiquement. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les différences génomiques impactent d'une façon non négligeable le profil culturel de *C. acnes ex vivo* et *ex vitro* mais surtout de souligner l'importance des facteurs environnementaux, soit la pression qu'exerce la réponse immune de l'hôte sur la croissance de *C. acnes*, sur les caractéristiques culturelles de *C. acnes*.

Ces résultats rejoignent les résultats obtenus sur le modèle *in vitro* de la réponse inflammatoire générée (évaluée par la quantité de TNF α produite) par le couple *C.*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

acnes et macrophages THP-1. Ces travaux ont apporté deux éléments de réponse importants : i) le premier est que la réponse inflammatoire est dépendante des caractéristiques intrinsèques de la souche, et non de son appartenance à un CC donné. En effet, les isolats proinflammatoires étaient répartis d'une façon comparable entre les principaux CCs de *C. acnes*. ii) le second est que les modèles *in vitro* ne sont pas transposables *in vivo*. En effet, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'intensité de la réponse TNF α observée *in vitro* et celle de la réponse CRP observée *in vitro*. Ceci souligne le rôle clé de l'hôte dans la définition de la pathologie ostéo-articulaire à *C. acnes*.

Dans ce projet de thèse, la question de la physiopathologie des IMOAs à *C. acnes* a été abordée par des approches variées, à la fois génétiques, culturales et de virulence. Malgré la différence des approches, tous les résultats convergent vers une nouvelle hypothèse qui est le rôle majeur du couple souche de *C. acnes* et l'hôte. Ces résultats, en complément des données peu concluantes de la littérature, confirment deux points essentiels : i) le premier est que les modèles *in vitro* ne sont pas optimaux pour la compréhension de la physiopathologie de *C. acnes*, ii) le second est que la connaissance génomique de la population de *C. acnes* au-delà du niveau ST est essentielle dans la détermination des facteurs clés dans la pathogénie de *C. acnes*.

Suite à ces résultats, nous avons entrepris le séquençage du génome complet par NGS de l'ensemble des isolats de *C. acnes* de notre collection. Les analyses sont en cours. Les données de « whole genome sequencing » nous permettraient de confirmer l'hétérotypie observée par le MLST mais aussi de définir des éventuels liens entre les différents STs isolés d'une façon concomitante au sein d'un même environnement périprothétique. Ces liens pourraient orienter vers une évolution intra-

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

hôte de *C. acnes* pour s'adapter à l'environnement périprothétique mais pourraient également déterminer le facteur commun déterminant la capacité de tous ces isolats ou une partie d'entre eux à disséminer, survivre et provoquer ou pas des infections dans l'environnement ostéo-articulaire. Le séquençage du génome complet permettra d'affiner la caractérisation génomique de nos cas et potentiellement confirmer ou infirmer leur classification en épisode infectieux.

A plus long terme, nous envisageons d'entreprendre l'analyse transcriptomique *ex vivo* de la relation *C. acnes* et hôte, en analysant l'ARN détecté dans les prélèvements per-opératoires de patients pris en charge pour suspicion d'IMOA à *C. acnes*. Cette approche s'est montrée d'un grand apport dans le domaine du sepsis. Nous espérons par cette même approche éclaircir des points encore obscurs dans la physiopathologie des IMOAs à *C. acnes*, dans un premier temps et de toutes les IMOAs, dans un second temps. Pour cela, nous avons entrepris la mise en place d'une plateforme transcriptomique et génomique au laboratoire de microbiologie du groupement hospitalier qui sera dédiée à l'analyse en temps réel des prélèvements per-opératoires sur matériel ostéo-articulaire.

En conclusion, nos travaux constituent un tournant dans la littérature de *C. acnes* dans les IMOAs. Ils montrent qu'une approche multifactorielle, intégrant à la fois la génomique et la réponse de l'hôte, est nécessaire pour comprendre la physiopathologie des IMOAs à *C. acnes*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Achermann, Y. *et al.* (2014) 'Propionibacterium acnes: From Commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen', *Clinical Microbiology Reviews*. doi: 10.1128/CMR.00092-13.
- Achermann, Y. *et al.* (2015) 'Immunoproteomic identification of in vivo-produced *Propionibacterium acnes* proteins in a rabbit biofilm infection model', *Clinical and Vaccine Immunology*. doi: 10.1128/CVI.00760-14.
- Agak, G. W. *et al.* (2014) 'Propionibacterium acnes induces an IL-17 response in acne vulgaris that is regulated by vitamin A and vitamin D', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1038/jid.2013.334.
- Aghazadeh, J. *et al.* (2017) 'Modic changes in the adjacent vertebrae due to disc material infection with *Propionibacterium acnes* in patients with lumbar disc herniation.', *European spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 26(12), pp. 3129–3134. doi: 10.1007/s00586-016-4887-4.
- Albert, H. B. *et al.* (2007) 'Antibiotic treatment in patients with low-back pain associated with Modic changes Type 1 (bone oedema): a pilot study', *British Journal of Sports Medicine*, 42(12), pp. 969–973. doi: 10.1136/bjism.2008.050369.
- Albert, H. B. *et al.* (2013) 'Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): A double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy', *European Spine Journal*. doi: 10.1007/s00586-013-2675-y.
- Albert, H. B. and Manniche, C. (2007) 'Modic changes following lumbar disc herniation', *European Spine Journal*, 16(7), pp. 977–982. doi: 10.1007/s00586-007-0336-8.
- Alexeyev, O. *et al.* (2006) 'Association between the presence of bacterial 16S RNA in prostate specimens taken during transurethral resection of prostate and subsequent risk of prostate cancer (Sweden)', *Cancer Causes and Control*. doi: 10.1007/s10552-006-0054-2.
- Alexeyev, O. A. *et al.* (2007) 'Direct visualization of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue by multicolor fluorescent in situ hybridization assay', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.01543-07.
- Alexeyev, O. A. and Jahns, A. C. (2012) 'Sampling and detection of skin *Propionibacterium acnes*: Current status', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.07.001.
- Alijanipour, P., Bakhshi, H. and Parvizi, J. (2013) 'Diagnosis of periprosthetic joint infection: The threshold for serological markers', in *Clinical Orthopaedics and Related Research*. doi: 10.1007/s11999-013-3070-z.
- Annunziato, F. *et al.* (2012) 'Defining the human T helper 17 cell phenotype', *Trends in Immunology*. doi: 10.1016/j.it.2012.05.004.
- Archer, N. K. *et al.* (2011) '*Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease', *Virulence*. doi: 10.4161/viru.2.5.17724.
- Asseray, N. *et al.* (2010) 'Improving diagnostic criteria for *Propionibacterium acnes* osteomyelitis: A retrospective analysis', *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.3109/00365540903527330.
- Atkins, B. L. *et al.* (1998) 'Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty', *Journal of Clinical Microbiology*.
- Aubin, G. G. *et al.* (2015) 'Staphylokinase and ABO group phenotype: New players in

Staphylococcus aureus implant-associated infections development', *Future Microbiology*. doi: 10.2217/fmb.15.112.

Aubin, G. G. *et al.* (2016) '*Propionibacterium namnetense* sp. nov., isolated from a human bone infection', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/ijsem.0.001204.

Aubin, G. G., Ada Da Silva, G., *et al.* (2017a) 'Immune discrepancies during in vitro granuloma formation in response to *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* infection', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.08.014.

Aubin, G. G., Lavigne, J. P., *et al.* (2017b) 'Tropism and virulence of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* involved in implant-associated infection', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.04.009.

Bae, Y. *et al.* (2014) 'Intracellular *Propionibacterium acnes* infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0090324.

Banzon, J. M. *et al.* (2017) '*Propionibacterium acnes* endocarditis: a case series', *Clinical Microbiology and Infection*. doi: 10.1016/j.cmi.2016.12.026.

Barnard, E. *et al.* (2015) 'Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.02460-14.

Baughman, R. P., Lower, E. E. and du Bois, R. M. (2003) 'Sarcoidosis¹⁶', *The Lancet*. doi: 10.1056/NEJMc073481.

Bayston, R. *et al.* (2007) 'Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials in vitro and in vivo: Impact on diagnosis and treatment', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. doi: 10.1002/jbm.a.31145.

Berbari, E. F. *et al.* (1998) 'Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study.', *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. doi: 10.1086/514991.

Berend, K. R. *et al.* (2013) 'Primary and revision anterior supine total hip arthroplasty: an analysis of complications and reoperations.', *Instructional course lectures*.

Bergmann, S., Rohde, M. and Hammerschmidt, S. (2004) 'Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* Is A Surface-Displayed Plasminogen-Binding Protein', *Infection and Immunity*. doi: 10.1128/IAI.72.4.2416-2419.2004.

Berthelot, J. M., Corvec, S. and Hayem, G. (2018) 'SAPHO, autophagy, IL-1, FoxO1, and *Propionibacterium* (*Cutibacterium*) *acnes*', *Joint Bone Spine*. doi: 10.1016/j.jbspin.2017.04.010.

Beylot, C. *et al.* (2014) '*Propionibacterium acnes*: An update on its role in the pathogenesis of acne', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. doi: 10.1111/jdv.12224.

Bossard, D. A. *et al.* (2016) 'Optimal length of cultivation time for isolation of *Propionibacterium acnes* in suspected bone and joint infections is more than 7 days', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.01435-16.

Boyle, K. *et al.* (2017) 'Hemolysis is a diagnostic adjuvant for *Propionibacterium acnes* orthopaedic shoulder infection', *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. doi: 10.1016/j.jse.2016.12.036.

De Brouwer, B. *et al.* (2015) '*Propionibacterium acnes* isolated from lymph nodes of patients with sarcoidosis', *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*.

Brüggemann, H. *et al.* (2004) 'The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin', *Science*. doi: 10.1126/science.1100330.

- Brüggemann, H. (2005) 'Insights in the pathogenic potential of *Propionibacterium acnes* from its complete genome', *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. doi: 10.1016/j.sder.2005.03.001.
- Brüggemann, H. *et al.* (2012) 'CriSPR/cas loci of type II *Propionibacterium acnes* confer immunity against acquisition of mobile elements present in type I *P. acnes*', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0034171.
- Brzuszkiewicz, E. *et al.* (2011) 'Comparative genomics and transcriptomics of *Propionibacterium acnes*', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0021581.
- Butler-Wu, S. M., Sengupta, D. J., *et al.* (2011b) 'Genome sequence of a novel species, *Propionibacterium humerusii*', *Journal of Bacteriology*. doi: 10.1128/JB.05036-11.
- Butler-Wu, S. M., Burns, E. M., *et al.* (2011a) 'Optimization of periprosthetic culture for diagnosis of *Propionibacterium acnes* prosthetic joint infection', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.00450-11.
- Capoor, M. N. *et al.* (2018) 'Importance of *Propionibacterium acnes* hemolytic activity in human intervertebral discs: A microbiological study', *PLOS ONE*. Edited by A. Cortegiani, 13(11), p. e0208144. doi: 10.1371/journal.pone.0208144.
- Cebrián, R. *et al.* (2017) 'Optimization of genotypic and biochemical methods to profile *P. acnes* isolates from a patient population', *Journal of Microbiological Methods*. doi: 10.1016/j.mimet.2017.07.008.
- Chiu, I. M. *et al.* (2013) 'Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation', *Nature*. doi: 10.1038/nature12479.
- Choi, J. Y. *et al.* (2008) '*Propionibacterium acnes* stimulates pro-matrix metalloproteinase-2 expression through tumor necrosis factor- α in human dermal fibroblasts', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1038/sj.jid.5701188.
- Chronnell, C. M. *et al.* (2001) 'Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions.', *The Journal of investigative dermatology*, 117(5), pp. 1120–5. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01569.x.
- Coenye, T., Peeters, E. and Nelis, H. J. (2007) 'Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased ...', *Research in Microbiology*.
- Cohen, R. J. *et al.* (2005) '*Propionibacterium acnes* associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: A possible link to cancer evolution?', *Journal of Urology*. doi: 10.1097/01.ju.0000158161.15277.78.
- Colina, M. and Trotta, F. (2014) 'Antibiotics may be useful in the treatment of SAPHO syndrome', *Modern Rheumatology*. doi: 10.3109/14397595.2013.874760.
- Corvec, S., Luchetta, J. and Aubin, G. G. (2015) 'Is hemolysis a clinical marker of *Propionibacterium acnes* orthopedic infection or a phylogenetic marker?', *American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)*, 44(3), pp. E61-2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750950> (Accessed: 25 February 2019).
- Crane, J. K. *et al.* (2013) 'Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from shoulder surgery', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi: 10.1128/AAC.00463-13.
- CUMMINS, C. S. and JOHNSON, J. L. (1973) '*Corynebacterium parvum*: a Synonym for *Propionibacterium acnes*?', *Journal of General Microbiology (1974)*,. doi: 10.1099/00221287-80-2-433.
- Dagnelie, M. A., Khammari, A., *et al.* (2018a) '*Cutibacterium acnes* molecular typing: time to standardize the method', *Clinical Microbiology and Infection*. doi: 10.1016/j.cmi.2018.03.010.

- Dagnelie, M. A., Corvec, S., *et al.* (2018b) 'Decrease in diversity of *Propionibacterium acnes* phlotypes in patients with severe acne on the back', *Acta Dermato-Venereologica*. doi: 10.2340/00015555-2847.
- Davidsson, S. *et al.* (2012) 'Multilocus sequence typing and repetitive-sequence-based PCR (DiversiLab) for molecular epidemiological characterization of *Propionibacterium acnes* isolates of heterogeneous origin', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.04.015.
- Davidsson, S. *et al.* (2016) 'Frequency and typing of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer', *Infectious Agents and Cancer*. doi: 10.1186/s13027-016-0074-9.
- Davidsson, S. *et al.* (2017) 'Prevalence of Flp Pili-encoding plasmids in *Cutibacterium acnes* isolates obtained from prostatic tissue', *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2017.02241.
- Dekio, I. *et al.* (2013) 'Correlation between phylogroups and intracellular proteomes of *Propionibacterium acnes* and differences in the protein expression profiles between anaerobically and aerobically grown cells', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/151797.
- Dekio, I. *et al.* (2015) 'Dissecting the taxonomic heterogeneity within *Propionibacterium acnes*: Proposal for *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. Nov. And *Propionibacterium acnes* subsp. *Elongatum* subsp. Nov', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/ijsem.0.000648.
- Dennis, L. K., Lynch, C. F. and Torner, J. C. (2002) 'Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer', *Urology*. doi: 10.1016/S0090-4295(02)01637-0.
- Dessinioti, C. and Katsambas, A. D. (2010) 'The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies', *Clinics in Dermatology*. doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.03.012.
- Dileepan, T. *et al.* (2011) 'Robust antigen specific th17 t cell response to group a streptococcus is dependent on il-6 and intranasal route of infection', *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1002252.
- Dréno, B. *et al.* (2018) '*Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. doi: 10.1111/jdv.15043.
- Drott, J. B. *et al.* (2010) '*Propionibacterium acnes* infection induces upregulation of inflammatory genes and cytokine secretion in prostate epithelial cells.', *BMC microbiology*. doi: 10.1186/1471-2180-10-126.
- Dudli, S. *et al.* (2016) '*Propionibacterium acnes* infected intervertebral discs cause vertebral bone marrow lesions consistent with Modic changes', *Journal of Orthopaedic Research*. doi: 10.1002/jor.23265.
- Eishi, Y. *et al.* (2002) 'Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.40.1.198-204.2002.
- Fassi Fehri, L. *et al.* (2011) 'Prevalence of *Propionibacterium acnes* in diseased prostates and its inflammatory and transforming activity on prostate epithelial cells', *International Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.014.
- Ferlay, J., Parkin, D. M. and Steliarova-Foucher, E. (2010) 'Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.', *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 46(4), pp. 765–81. doi: 10.1016/j.ejca.2009.12.014.
- Fernandez Sampedro, M. *et al.* (2009) 'Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes*

phylotypes associated with orthopedic implants', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(2), pp. 138–145. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.024.

Fischer, N. *et al.* (2013) 'Deciphering the intracellular fate of *Propionibacterium acnes* in macrophages', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/603046.

Fitz-Gibbon, S. *et al.* (2013) '*Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1038/jid.2013.21.

Francisco, A. P. *et al.* (2009) 'Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach', *BMC Bioinformatics*. doi: 10.1186/1471-2105-10-152.

Frangiamore, S. J. *et al.* (2015) 'Early versus late culture growth of *Propionibacterium acnes* in revision shoulder arthroplasty', *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*. doi: 10.2106/JBJS.N.00881.

Freiberg, J. A., Mclver, K. S. and Shirtliff, M. E. (2014) '*In vivo* expression of *Streptococcus pyogenes* immunogenic proteins during tibial foreign body infection.', *Infection and immunity*. Edited by A. Camilli, 82(9), pp. 3891–9. doi: 10.1128/IAI.01831-14.

Funke, G. *et al.* (1997) 'Clinical microbiology of Coryneform bacteria', *Clinical Microbiology Reviews*. doi: 10.1128/CMR.10.1.125.

Furukawa, A. *et al.* (2009) 'Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism', *Microbial Pathogenesis*. doi: 10.1016/j.micpath.2008.10.013.

Furustrand Tabin, U. *et al.* (2015) 'Occurrence and new mutations involved in rifampicin-resistant *Propionibacterium acnes* strains isolated from biofilm or device-related infections', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.003.

Furustrand Tabin, U., Trampuz, A. and Corvec, S. (2013) 'In vitro emergence of rifampicin resistance in *Propionibacterium acnes* and molecular characterization of mutations in the *rpoB* gene', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi: 10.1093/jac/dks428.

Gabrilovich, M. I. *et al.* (2013) 'Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis', *Clinical and Experimental Immunology*. doi: 10.1111/cei.12138.

Gehse, M. *et al.* (1983) 'Propionibacteria in patients with acne vulgaris and in healthy persons', *Archives of Dermatological Research*. doi: 10.1007/BF00412883.

Ghanem, E. *et al.* (2009) 'Staged revision for knee arthroplasty infection: What is the role of serologic tests before reimplantation?', in *Clinical Orthopaedics and Related Research*. doi: 10.1007/s11999-009-0742-9.

Giovannucci, E. *et al.* (2007) 'Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study', *International Journal of Cancer*, 121(7), pp. 1571–1578. doi: 10.1002/ijc.22788.

Gomes, A. *et al.* (2018) 'Sonication of heart valves detects more bacteria in infective endocarditis', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-018-31029-w.

Graham, G. M. *et al.* (2004) 'Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL', *British Journal of Dermatology*. doi: 10.1046/j.1365-2133.2004.05762.x.

Grice, E. A. *et al.* (2008) 'A diversity profile of the human skin microbiota', *Genome Research*. doi: 10.1101/gr.075549.107.

Grice, E. A. *et al.* (2009) 'Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome', *Science*. doi: 10.1126/science.1171700.

- Grice, E. A. and Segre, J. A. (2011) 'The skin microbiome', *Nature Reviews Microbiology*. doi: 10.1038/nrmicro2537.
- Hall, G. S. *et al.* (1994) 'Growth curve for *Propionibacterium acnes*', *Current Eye Research*. doi: 10.3109/02713689408999875.
- Hauck, Y. *et al.* (2015) 'A novel multiple locus variable number of tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) method for *Propionibacterium acnes*', *Infection, Genetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.meegid.2015.05.009.
- Heckmann, N. *et al.* (2018) '*Propionibacterium Acnes* Persists Despite Various Skin Preparation Techniques', *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. doi: 10.1016/j.arthro.2018.01.019.
- Hoeffler, U. (1977) 'Enzymatic and hemolytic properties of *Propionibacterium acnes* and related bacteria', *Journal of Clinical Microbiology*.
- Hofmann, S. *et al.* (2008) 'Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng.198.
- Holland, C. *et al.* (2010) 'Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*', *BMC Microbiology*. doi: 10.1186/1471-2180-10-230.
- Holmberg, A. *et al.* (2009) 'Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates', *Clinical Microbiology and Infection*. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02747.x.
- Holmberg K, F. U., Holmberg, K. and Forsum, U. (1973) 'Identification of *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacterionema*, *Rothia*, and *Propionibacterium* species by defined immunofluorescence', *Appl. Microbiol.*
- Ishige, I. *et al.* (1999) 'Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis.', *Lancet (London, England)*. doi: 10.1016/S0140-6736(98)12310-3.
- Jahns, A. C. and Alexeyev, O. A. (2014) 'Three dimensional distribution of *Propionibacterium acnes* biofilms in human skin', *Experimental Dermatology*. doi: 10.1111/exd.12482.
- Jahns, A. C. and Alexeyev, O. A. (2016) 'Microbial colonization of normal skin: Direct visualization of 194 skin biopsies', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.11.011.
- Jasson, F. *et al.* (2013) 'Different strains of *Propionibacterium acnes* modulate differently the cutaneous innate immunity', *Experimental Dermatology*. doi: 10.1111/exd.12206.
- Jensen, T. S. *et al.* (2008) 'Vertebral endplate signal changes (Modic change): a systematic literature review of prevalence and association with non-specific low back pain', *European Spine Journal*, 17(11), pp. 1407–1422. doi: 10.1007/s00586-008-0770-2.
- Jiao, Y. *et al.* (2019) '*Propionibacterium acnes* induces discogenic low back pain via stimulating nucleus pulposus cells to secrete pro-algesic factor of IL-8/CINC-1 through TLR2-NF-κB p65 pathway.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 97(1), pp. 25–35. doi: 10.1007/s00109-018-1712-z.
- Jousimies-Somer, H. and Sutter, V. L. (2002) *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*. 6th ed. Belmont Calif.: Star Pub. Available at: <https://www.worldcat.org/title/wadsworth-ktl-anaerobic-bacteriology-manual/oclc/47995625?referer=di&ht=edition> (Accessed: 31 January 2019).
- Jugeau, S. *et al.* (2005) 'Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*', *British Journal of Dermatology*. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06933.x.
- Kachlany, S. C. *et al.* (2000) 'Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in Bacteria and Archaea', *Journal of Bacteriology*. doi:

10.1128/JB.182.21.6169-6176.2000.

- Kadler, B., Mehta, S. and Funk, L. (2015) 'Propionibacterium acnes infection after shoulder surgery', *International Journal of Shoulder Surgery*, 9(4), p. 139. doi: 10.4103/0973-6042.167957.
- Kakegawa, T. et al. (2017) 'Frequency of *Propionibacterium acnes* infection in prostate glands with negative biopsy results is an independent risk factor for prostate cancer in patients with increased serum PSA titers', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0169984.
- Kalis, C. et al. (2005) 'Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*', *Journal of Immunology*. doi: 174/7/4295 [pii].
- Kamata, M. et al. (2013) 'ICAM-1 deficiency exacerbates sarcoid-like granulomatosis induced by *Propionibacterium acnes* through impaired IL-10 production by regulatory T cells', *American Journal of Pathology*. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.021.
- Kanafani, Z. A. et al. (2009) 'Postoperative Joint Infections Due to *Propionibacterium* Species: A Case-Control Study', *Clinical Infectious Diseases*. doi: 10.1086/605577.
- Kapadia, B. H. et al. (2016) 'Periprosthetic joint infection', *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61798-0.
- Kar Choudhury, T. K. (1978) 'Synergistic lysis of erythrocytes by *Propionibacterium acnes*', *Journal of Clinical Microbiology*.
- Kasimatis, G. et al. (2013) 'Analysis of complete genomes of *Propionibacterium acnes* reveals a novel plasmid and increased pseudogenes in an acne associated strain', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/918320.
- Khasseba, J. et al. (2015) 'Antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from orthopaedic implant-associated infections', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.12.006.
- Kilian, M., Scholz, C. F. P. and Lomholt, H. B. (2012) 'Multilocus sequence typing and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes*', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.r06129-11.
- Kishishita, M. et al. (1979) 'Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin', *Applied and Environmental Microbiology*.
- Kistowska, M. et al. (2014) 'IL-1 β drives inflammatory responses to *Propionibacterium acnes* in vitro and in vivo', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1038/jid.2013.438.
- Klouche, S., Sariali, E. and Mamoudy, P. (2010) 'Total hip arthroplasty revision due to infection: A cost analysis approach', *Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research*. doi: 10.1016/j.otsr.2009.11.004.
- Korting, H. C. et al. (1992) 'Influence of the pH-value on the growth of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* in continuous culture.', *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine*.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, S. J. (2013) 'Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. doi: 10.1101/cshperspect.a010306.
- Kozyreva, V. K. et al. (2017) 'Validation and implementation of clinical laboratory improvements act-compliant whole-genome sequencing in the public health microbiology laboratory', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.00361-17.
- Kurtz, S. M. et al. (2012) 'Economic burden of periprosthetic joint infection in the united states', *Journal of Arthroplasty*. doi: 10.1016/j.arth.2012.02.022.

- Kusano, K. *et al.* (1997) '*Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant omega-cyclohexyl fatty acid-containing *Propionibacterium* isolated from spoiled orange juice', *International Journal of Systematic Bacteriology*. doi: 10.1099/00207713-47-3-825.
- Kwong, J. C. *et al.* (2015) 'Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology', *Pathology*. doi: 10.1097/PAT.0000000000000235.
- Laan, M. *et al.* (1999) 'Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. doi: 10.1016/S0022-3697(03)00274-9.
- Lavergne, V. *et al.* (2017) 'Clinical impact of positive *Propionibacterium acnes* cultures in orthopedic surgery', *Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research*. doi: 10.1016/j.otsr.2016.12.005.
- Lawrence, H. *et al.* (2017) '*Propionibacterium acnes* pleural empyema following medical thoracoscopy', *Respirology Case Reports*. doi: 10.1002/rcr2.249.
- Lee, M. J. *et al.* (2014) '*Propionibacterium* persists in the skin despite standard surgical preparation', *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*. doi: 10.2106/JBJS.M.01474.
- Lee, S. E. *et al.* (2010) 'Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*', *Archives of Dermatological Research*. doi: 10.1007/s00403-010-1074-z.
- Lheure, C. *et al.* (2016) 'TLR-2 Recognizes *Propionibacterium acnes* CAMP Factor 1 from Highly Inflammatory Strains.', *PloS one*. doi: 10.1371/journal.pone.0167237.
- Li, Z. J. *et al.* (2014) '*Propionibacterium acnes* activates the NLRP3 inflammasome in human sebocytes', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1038/jid.2014.221.
- Lindell, F. *et al.* (2018) 'Prosthetic valve endocarditis caused by *Propionibacterium* species: a national registry-based study of 51 Swedish cases', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi: 10.1007/s10096-017-3172-8.
- Loke, W. S. J., Herbert, C. and Thomas, P. S. (2013) 'Sarcoidosis: Immunopathogenesis and Immunological Markers', *International Journal of Chronic Diseases*, 2013, pp. 1–13. doi: 10.1155/2013/928601.
- Lomholt, H. B. *et al.* (2017) '*Propionibacterium acnes* phylogenetic type III is associated with progressive macular hypomelanosis', *European Journal of Microbiology and Immunology*. doi: 10.1556/1886.2016.00040.
- Lomholt, H. B. and Kilian, M. (2010) 'Population genetic analysis of *Propionibacterium acnes* identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne', *PLoS ONE*, 5(8). doi: 10.1371/journal.pone.0012277.
- Lutz, M. F. *et al.* (2005) 'Arthroplastic and osteosynthetic infections due to *Propionibacterium acnes*: A retrospective study of 52 cases, 1995-2002', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi: 10.1007/s10096-005-0040-8.
- Mahylis, J. M. *et al.* (2018) 'Hemolytic strains of *Propionibacterium acnes* do not demonstrate greater pathogenicity in periprosthetic shoulder infections', *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. doi: 10.1016/j.jse.2017.12.025.
- Mak, T. N. *et al.* (2013) 'Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Propionibacterium acnes* isolates from radical prostatectomy specimens.', *The Prostate*, 73(7), pp. 770–777. doi: 10.1002/pros.22621.
- Marmor, S. *et al.* (2016) 'Multiplex antibody detection for noninvasive genus-level diagnosis of prosthetic joint infection', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.02885-15.
- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. (2002) 'The Inflammasome: A molecular platform triggering

activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β ', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3.

McCaskill, J. G. *et al.* (2006) 'Pulmonary immune responses to *Propionibacterium acnes* in C57BL/6 and BALB/c mice', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. doi: 10.1165/rcmb.2005-0285OC.

McDowell, A. *et al.* (2005) '*Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.43.1.326-334.2005.

McDowell, A. *et al.* (2008) 'A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*', *Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1099/jmm.0.47489-0.

McDowell, A. *et al.* (2011) 'A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes* and characterization of type I cell surface-associated antigens', *Microbiology*. doi: 10.1099/mic.0.049676-0.

McDowell, A., Barnard, E., *et al.* (2012a) 'An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: Investigation of "pathogenic", "commensal" and antibiotic resistant strains', *PLoS ONE*, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0041480.

McDowell, A., Hunyadkürti, J., *et al.* (2012b) 'Draft genome sequence of an antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* strain, PRP-38, from the novel type IC cluster', *Journal of Bacteriology*. doi: 10.1128/JB.00479-12.

McDowell, A. *et al.* (2013) 'The Opportunistic Pathogen *Propionibacterium acnes*: Insights into Typing, Human Disease, Clonal Diversification and CAMP Factor Evolution', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0070897.

McDowell, A. *et al.* (2016) 'Proposal to reclassify *Propionibacterium acnes* type i as *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* type ii as *Propionibacterium acnes* subsp. *defendens* subsp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/ijsem.0.001521.

McDowell, A. (2017) 'Over a Decade of *recA* and *tly* Gene Sequence Typing of the Skin Bacterium *Propionibacterium acnes*: What Have We Learnt?', *Microorganisms*. doi: 10.3390/microorganisms6010001.

Minassian, A. M. *et al.* (2014) 'Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: Easy and fast', *BMC Infectious Diseases*. doi: 10.1186/1471-2334-14-233.

Minegishi, K. *et al.* (2015) 'Genetic profiles of *Propionibacterium acnes* and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep09832.

Modic, M. T. *et al.* (1988) 'Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging.', *Radiology*. doi: 10.1148/radiology.166.1.3336678.

Mohsen, A. H. *et al.* (2001) '*Propionibacterium acnes* endocarditis in a native valve complicated by intraventricular abscess: A case report and review', *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.1080/003655401750174066.

Montanaro, L. *et al.* (2011) 'Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics', *Future Microbiology*. doi: 10.2217/fmb.11.117.

Moradi Tuchayi, S. *et al.* (2015) 'Acne vulgaris', *Nature reviews. Disease primers*. doi: 10.1038/nrdp.2015.29.

Nagy, E. *et al.* (2013) 'MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I,

II and III of *Propionibacterium acnes*', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.01.007.

Nagy, I. *et al.* (2005) 'Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23705.x.

Nagy, I. *et al.* (2006) '*Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes', *Microbes and Infection*. doi: 10.1016/j.micinf.2006.04.001.

Nakase, K. *et al.* (2014) 'Relationship between the severity of acne vulgaris and antimicrobial resistance of bacteria isolated from acne lesions in a hospital in Japan', *Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1099/jmm.0.067611-0.

Nakatsuji, T. *et al.* (2011) '*Propionibacterium acnes* camp factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence: Potential targets for inflammatory acne treatment', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0014797.

Namdari, S. *et al.* (2019) 'Comparative study of cultures and next-generation sequencing in the diagnosis of shoulder prosthetic joint infections', *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 28(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.jse.2018.08.048.

Negi, M. *et al.* (2012) 'Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium', *Modern Pathology*. doi: 10.1038/modpathol.2012.80.

Nelson, C. L. *et al.* (2005) 'Is aseptic loosening truly aseptic?', in *Clinical Orthopaedics and Related Research*. doi: 10.1097/01.blo.0000175715.68624.3d.

Nodzo, S. R. *et al.* (2014) 'Hemolysis as a clinical marker for *Propionibacterium acnes* orthopedic infection.', *American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)*.

Olsson, J. *et al.* (2012) 'Chronic Prostatic Infection and Inflammation by *Propionibacterium acnes* in a Rat Prostate Infection Model', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0051434.

Oprica, C. *et al.* (2005) 'European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*', *Clinical Microbiology and Infection*. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01055.x.

Osmon, D. R. *et al.* (2013) 'Diagnosis and management of prosthetic joint infection: Clinical practice guidelines by the infectious diseases Society of America', *Clinical Infectious Diseases*. doi: 10.1093/cid/cis803.

Park, H. J. *et al.* (2011) 'Clinical significance of *Propionibacterium acnes* recovered from blood cultures: Analysis of 524 episodes', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01842-10>.

Parsek, M. R. and Singh, P. K. (2003) 'Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis', *Annual Review of Microbiology*. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720.

Parvizi, J. *et al.* (2011) 'New definition for periprosthetic joint infection: From the workgroup of the musculoskeletal infection society', in *Clinical Orthopaedics and Related Research*. doi: 10.1007/s11999-011-2102-9.

Patel, A. *et al.* (2009) '*Propionibacterium acnes* colonization of the human shoulder', *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. doi: 10.1016/j.jse.2009.01.023.

Peck, A. and Mellins, E. D. (2010) 'Precarious balance: Th17 cells in host defense', *Infection and Immunity*. doi: 10.1128/IAI.00929-09.

Peel, T. N. *et al.* (2016) 'Improved diagnosis of prosthetic joint infection by culturing periprosthetic

tissue specimens in blood culture bottles', *mBio*. doi: 10.1128/mBio.01776-15.

Pérez-Prieto, D. *et al.* (2017) 'C-reactive protein may misdiagnose prosthetic joint infections, particularly chronic and low-grade infections', *International Orthopaedics*. doi: 10.1007/s00264-017-3430-5.

Perry, A. L. *et al.* (2003) 'Analysis of clinical isolates of *Propionibacterium acnes* by optimised RAPD', *FEMS Microbiology Letters*. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00720-1.

Petrova, O. E. and Sauer, K. (2016) 'Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion', *Current Opinion in Microbiology*. doi: 10.1016/j.mib.2016.01.004.

Phadnis, J. *et al.* (2016) 'Frequent isolation of *Propionibacterium acnes* from the shoulder dermis despite skin preparation and prophylactic antibiotics', *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. doi: 10.1016/j.jse.2015.08.002.

Piper, K. E. *et al.* (2010) 'C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate and orthopedic implant infection', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0009358.

Portillo, M. E. *et al.* (2013) '*Propionibacterium acnes*: An underestimated pathogen in implant-associated infections', *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/804391.

Portillo, M. E. *et al.* (2015) 'Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.03683-14.

Del Pozo, J. L. *et al.* (2009) 'Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.00096-09.

Qi, X. *et al.* (2008) 'Biofilm formation of the pathogens of fatal bacterial granuloma after trauma: Potential mechanism underlying the failure of traditional antibiotic treatments', *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.1080/00365540701632998.

Qiu, B. *et al.* (2018) '*Cutibacterium acnes* and the shoulder microbiome', *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. doi: 10.1016/j.jse.2018.04.019.

Rajasekaran, S. *et al.* (2017) 'ISSLS PRIZE IN CLINICAL SCIENCE 2017: Is infection the possible initiator of disc disease? An insight from proteomic analysis.', *European spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 26(5), pp. 1384–1400. doi: 10.1007/s00586-017-4972-3.

Ramage, G. *et al.* (2003) 'Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials', *Biomaterials*.

Rentenaar, R. J. *et al.* (2018) 'Detection of clinical *cutibacterium acnes* isolates in different becton dickinson blood culture vials', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.01486-17.

Renz, N. *et al.* (2018) 'Orthopedic implant-associated infections caused by *Cutibacterium* spp. – A remaining diagnostic challenge', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0202639.

Rieger, U. M. *et al.* (2009) 'Sonication of removed breast implants for improved detection of subclinical infection', *Aesthetic Plastic Surgery*. doi: 10.1007/s00266-009-9333-0.

Rieger, U. M. *et al.* (2013) 'Bacterial biofilms and capsular contracture in patients with breast implants', *British Journal of Surgery*. doi: 10.1002/bjs.9084.

Roux, A. L. *et al.* (2011) 'Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen', *Clinical Microbiology and Infection*. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03359.x.

- Rukavina, I. (2015) 'SAPHO syndrome: a review', *Journal of Children's Orthopaedics*, 9(1), pp. 19–27. doi: 10.1007/s11832-014-0627-7.
- Ryan, S. *et al.* (2009) 'Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: Regulation and role in acid tolerance', *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01782.x.
- Sanford, J. A. *et al.* (2016) 'Inhibition of HDAC8 and HDAC9 by microbial short-chain fatty acids breaks immune tolerance of the epidermis to TLR ligands', *Science Immunology*. doi: 10.1126/sciimmunol.aah4609.
- Sayanjali, B. *et al.* (2016) '*Propionibacterium acnes* inhibits FOXM1 and induces cell cycle alterations in human primary prostate cells', *International Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.06.006.
- Schaller, M. *et al.* (2005) 'Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with *Propionibacterium acnes* and coproporphyrin III', *British Journal of Dermatology*. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06530.x.
- Scholz, C. F. P. *et al.* (2014) 'A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes* *in vivo*', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0104199.
- Scholz, C. F. P. and Kilian, M. (2016) 'The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *acidipropionibacterium* gen. nov., *cutibacterium* gen. nov. and *pseudopropionibacterium* gen. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/ijsem.0.001367.
- Schreiner, H. C. *et al.* (2003) 'Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1237223100.
- Schupp, J. C. *et al.* (2015) 'Immune response to *Propionibacterium acnes* in patients with sarcoidosis - *in vivo* and *in vitro*', *BMC Pulmonary Medicine*. doi: 10.1186/s12890-015-0070-7.
- Scott, M. T. and Milas, L. (1977) 'The distribution and persistence *in vivo* of *Corynebacterium parvum* in relation to its antitumor activity', *Cancer Research*.
- de Seynes, C. *et al.* (2018) 'Contribution of a multiplex serological test for the preoperative diagnosis of prosthetic joint infection: a prospective study', *Infectious Diseases*. doi: 10.1080/23744235.2018.1453945.
- Shaheen, B. and Gonzalez, M. (2011) 'A microbial aetiology of acne: What is the evidence?', *British Journal of Dermatology*. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10375.x.
- Shan, Z. *et al.* (2017) 'The Influence of direct inoculation of *Propionibacterium acnes* on modic changes in the spine: Evidence from a rabbit model', *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*. doi: 10.2106/JBJS.16.00146.
- Shen, H. *et al.* (2015) 'Sonication of explanted prosthesis combined with incubation in BD Bactec bottles for pathogen-based diagnosis of prosthetic joint infection', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.02863-14.
- Shiono, Y. *et al.* (2016) 'Delayed *Propionibacterium acnes* surgical site infections occur only in the presence of an implant.', *Scientific reports*, 6(1), p. 32758. doi: 10.1038/srep32758.
- Shirodkar, A. R. *et al.* (2012) 'Delayed-versus acute-onset endophthalmitis after cataract surgery', *American Journal of Ophthalmology*. doi: 10.1016/j.ajo.2011.08.029.
- Siegel, R. *et al.* (2011) 'Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial

disparities on premature cancer deaths.’, *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), pp. 212–36. doi: 10.3322/caac.20121.

Sörensen, M. *et al.* (2010) ‘Mutagenesis of *Propionibacterium acnes* and analysis of two CAMP factor knock-out mutants’, *Journal of Microbiological Methods*. doi: 10.1016/j.mimet.2010.09.008.

Stevens, W. . *et al.* (2013) ‘Risk factor analysis for capsular contracture: a 5-year Sientra study analysis using round, smooth, and textured implants for breast augmentation’, *Plastic and reconstructive surgery*. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/01.prs.0000435317.76381.68>.

Stirling, A. *et al.* (2001) ‘Association between sciatica and *Propionibacterium acnes*.’, *Lancet (London, England)*, 357(9273), pp. 2024–5. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05109-6.

Tafin, U. F. *et al.* (2012) ‘Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi: 10.1128/AAC.05552-11.

Tagini, F. and Greub, G. (2017) ‘Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review’, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi: 10.1007/s10096-017-3024-6.

Takizawa, Y. *et al.* (2014) ‘Severe inflammation associated with synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteitis (SAPHO) syndrome was markedly ameliorated by single use of minocycline’, *Modern Rheumatology*. doi: 10.3109/14397595.2013.874744.

Tanabe, T. *et al.* (2006) ‘Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.07.006.

Tande, A. J. and Patel, R. (2014) ‘Prosthetic joint infection.’, *Clinical microbiology reviews*, 27(2), pp. 302–45. doi: 10.1128/CMR.00111-13.

Tchaptchet, S. *et al.* (2012) ‘TLR9-dependent and independent pathways drive activation of the immune system by *Propionibacterium acnes*’, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0039155.

Titécat, M. *et al.* (2013) ‘Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study’, *Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research*. doi: 10.1016/j.otsr.2013.02.011.

Tomich, M., Planet, P. J. and Figurski, D. H. (2007) ‘The tad locus: Postcards from the widespread colonization island’, *Nature Reviews Microbiology*. doi: 10.1038/nrmicro1636.

Tomida, S. *et al.* (2013) ‘Pan-Genome and Comparative Genome Analyses of’, *American Society for Microbiology*. doi: 10.1128/mBio.00003-13.Editor.

Török, M. E. and Peacock, S. J. (2012) ‘Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory-pipe dream or reality?’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi: 10.1093/jac/dks247.

Toulson, C. *et al.* (2009) ‘Treatment of Infected Total Hip Arthroplasty With a 2-Stage Reimplantation Protocol. Update on “Our Institution’s” Experience From 1989 to 2003’, *Journal of Arthroplasty*. doi: 10.1016/j.arth.2008.07.004.

Toyoda, M., Nakamura, M. and Morohashi, M. (2002) ‘Neuropeptides and sebaceous glands’, *European Journal of Dermatology*. doi: 15107237.

Trampuz, A. *et al.* (2007) ‘Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection’, *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJMoa061588.

Tsukayama, D. T., ESTRADA, R. and GUSTILO, R. B. (1996) ‘Infection after Total Hip Arthroplasty. A Study of the Treatment of One Hundred and Six Infections*’, *The Journal of Bone & Joint Surgery*.

doi: 10.2106/00004623-199604000-00005.

Tunney, M. M. *et al.* (1999) 'Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1097/00013611-200109000-00010.

Tuttle, R. L. and North, R. J. (1975) 'Mechanisms of antitumor action of *Corynebacterium parvum*: nonspecific tumor cell destruction at site of an immunologically mediated sensitivity reaction to *C. parvum*', *Journal of the National Cancer Institute*. doi: 10.1093/jnci/55.6.1403.

Tyner, H. and Patel, R. (2016) '*Propionibacterium acnes* biofilm - A sanctuary for *Staphylococcus aureus*?', *Anaerobe*. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.05.014.

Uçkay, I. *et al.* (2010) 'Spondylodiscitis due to *Propionibacterium acnes*: Report of twenty-nine cases and a review of the literature', *Clinical Microbiology and Infection*. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02801.x.

Unna, P. G. (2010) 'The Histological Pathology of Diseases of the Skin', *British Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 7(3), pp. 83–85. doi: 10.1111/j.1365-2133.1895.tb16839.x.

Urquhart, D. M. *et al.* (2015) 'Could low grade bacterial infection contribute to low back pain? A systematic review.', *BMC medicine*, 13(1), p. 13. doi: 10.1186/s12916-015-0267-x.

Valanne, S. *et al.* (2005) 'CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: A new protein family differentially expressed by types I and II', *Microbiology*. doi: 10.1099/mic.0.27788-0.

Van Valen, R. *et al.* (2016) 'Prosthetic valve endocarditis due to *Propionibacterium acnes*', *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. doi: 10.1093/icvts/ivw087.

Valeyre, D. *et al.* (2014) 'Sarcoidosis', *The Lancet*, 383(9923), pp. 1155–1167. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60680-7.

Walter, G. *et al.* (2014) 'Bone and joint infections due to anaerobic bacteria: An analysis of 61 cases and review of the literature', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi: 10.1007/s10096-014-2073-3.

Wang, Y. *et al.* (2018) 'The Anti-Inflammatory Activities of *Propionibacterium acnes* CAMP Factor-Targeted Acne Vaccines', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1016/j.jid.2018.05.032.

Webster, G. F. *et al.* (1985) 'Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to killing and degradation by human neutrophils and monocytes in vitro', *Infection and Immunity*. doi: 10.1016/j.pcl.2016.04.008.

Webster, G. F. (2002) 'Clinical review Acne vulgaris', *Bmj*.

Webster, G. F. and Cummins, C. S. (1978) 'Use of bacteriophage typing to distinguish *Propionibacterium acnes* types I and II', *Journal of Clinical Microbiology*.

Werner, J. L. *et al.* (2017) 'Induction of pulmonary granuloma formation by *Propionibacterium acnes* is regulated by MyD88 and Nox2', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. doi: 10.1165/rcmb.2016-0035OC.

Wollenberg, M. S. *et al.* (2014) '*Propionibacterium*-produced coproporphyrin III induces staphylococcus aureus aggregation and Biofilm formation', *mBio*. doi: 10.1128/mBio.01286-14.

Yamada, T. *et al.* (2002) 'In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition', *Journal of Pathology*. doi: 10.1002/path.1243.

Yamamoto, R. *et al.* (2018) 'Silent Native-valve Endocarditis Caused by *Propionibacterium acnes*.', *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 57(16), pp. 2417–2420. doi: 10.2169/internalmedicine.9833-17.

- Yang, Y. *et al.* (2016) 'Different *Propionibacterium acnes* Phylotypes Induce Distinct Immune Responses and Express Unique Surface and Secreted Proteomes', *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.615.
- Yu, J. L. *et al.* (1997) 'Fibronectin binding by *Propionibacterium acnes*', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. doi: 10.1016/S0928-8244(97)00092-8.
- Zeller, V. *et al.* (2007) '*Propionibacterium acnes*: An agent of prosthetic joint infection and colonization', *Journal of Infection*. doi: 10.1016/j.jinf.2007.02.006.
- Zhao, M. M. *et al.* (2017) 'High throughput 16SrRNA gene sequencing reveals the correlation between *Propionibacterium acnes* and sarcoidosis', *Respiratory Research*. doi: 10.1186/s12931-017-0515-z.
- Zimmerli, W. *et al.* (1982) 'Pathogenesis of foreign body infection: Description and characteristics of an animal model', *Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.1093/infdis/146.4.487.
- Zimmerli, W. (2014) 'Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection', *Journal of Internal Medicine*. doi: 10.1111/joim.12233.
- Zimmerli, W., Trampuz, A. and Ochsner, P. E. (2004) 'Prosthetic-Joint Infections', *New England Journal of Medicine*, 351(16), pp. 1645–1654. doi: 10.1056/NEJMra040181.
- Zimmermann, P. and Curtis, N. (2019) 'The role of *Cutibacterium acnes* in auto-inflammatory bone disorders.', *European journal of pediatrics*, 178(1), pp. 89–95. doi: 10.1007/s00431-018-3263-2.

ANNEXES

Annexes 1 et 2

N° patient	Données démographiques			Données chirurgicales et antécédents chirurgicaux et septiques							Données cliniques					Données biologiques pré-opératoires				
	Sexe	Age (ans)	IMC	Site de l'implant	Type d'implant	Nature de l'intervention chirurgicale	Antécédents d'infection sur site	Antécédents d'incident cicatriciel	Antécédents d'infections sur le site	N reprises antérieures	N° implant sur le site	intervalle libre ^a (mois)	Désunion	Douleur locale	Fièvre	Ecoulement local	Inflammation locale	Globules blancs (G/L)	Polynucléaires neutrophiles (G/L)	CRP sérique (mg/L)
1	M	21	21	TIBIA	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	24	N	O	N	N	N	5,5	3,5	26
2	M	66	27	FEMUR	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	19	N	N	N	N	N	7,4	4	NP
3	M	81	29	HANCHE	PROTHESE	Changement en un temps de la prothèse	N	N	N	0	1	195	O	O	N	O	N	6,28	4,18	29
4	M	58	24	EPAULE	PROTHESE	Changement en deux temps de la prothèse	N	N	N	0	1	15	N	O	N	N	O	7,6	4,93	48
5	M	85	24	HANCHE	PROTHESE	Changement en un temps de la prothèse	O	O	O	1	1	21	O	N	N	O	N	5,7	4,25	39
6	M	72	26	EPAULE	PROTHESE	Changement en un temps de la prothèse	N	N	N	0	1	3	O	N	N	O	O	6,6	4,88	13
7	M	78	22	GENOU	PROTHESE	Changement en un temps de la prothèse	N	N	N	0	1	5	N	N	O	O	O	6,4	5	55
8	M	28	24	EPAULE	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	1	N	N	N	N	O	NP	NP	NP
9	F	21	27	RACHIS	MATERIEL	Exérèse d'un kyste avec maintien du matériel en place	N	N	N	1	1	6	O	N	N	O	N	8,7	NP	32
10	F	87	26	HANCHE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	N	N	N	0	2	178	N	N	N	N	O	NP	NP	57
11-1	M	23	26	FEMUR	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	O	N	O	1	1	7	N	N	N	N	N	NP	NP	32
11-2	M	23	26	FEMUR	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	O	N	O	2	1	15	N	N	N	N	O	NP	NP	12
12	F	36	24	RACHIS	MATERIEL	Ablation du matériel rachidien	O	N	O	1	1	183	N	O	N	N	N	5,4	NP	4
13	F	54	23	GENOU	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	O	N	O	1	1	31	N	N	N	N	N	NP	NP	13
14	M	68	25	HANCHE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	O	O	O	1	1	81	N	N	N	O	N	NP	NP	8
15	M	39	27	TIBIA	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	8	O	O	N	N	N	NP	NP	NP
16	F	54	30	RACHIS	MATERIEL	Ablation du matériel rachidien	O	N	O	1	1	49	N	O	N	N	O	11,9	NP	124
17	F	43	18	RACHIS	MATERIEL	Ablation du matériel rachidien	N	N	N	0	1	170	N	O	N	N	N	NP	NP	NP
18	F	88	25	GENOU	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	N	N	N	0	1	2	O	O	N	N	O	11,4	NP	39
19	F	23	19	RACHIS	MATERIEL	Ablation du matériel d'arthrodèse	N	N	N	0	1	44	N	O	N	N	O	15,3	NP	150
20	M	34	20	GENOU	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	49	N	O	N	N	N	NP	NP	NP
21	M	48	25	HANCHE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	N	N	N	1	1	146	N	O	N	N	N	7,2	4	2
22	M	67	23	CHEVILLE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	O	N	N	1	2	14	N	N	N	N	O	NP	NP	<5
24	M	77	31	HANCHE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	N	N	N	2	3	15	N	N	N	N	N	NP	NP	<2
26	M	69	27	HANCHE	PROTHESE	Changement en un temps de la prothèse	N	N	N	0	1	57	N	O	N	N	N	10,5	5	NP
28	M	16	20	COUDE	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	3	N	O	N	N	O	NP	NP	5
29	M	29	26	TIBIA	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	O	N	O	1	1	9	N	O	N	N	N	5	NP	3
30	M	66	21	EPAULE	PROTHESE	Changement en un temps de la prothèse	N	N	N	0	2	25	N	O	N	N	N	9,9	8,1	75
31	M	69	25	HANCHE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	N	N	N	0	1	71	N	O	N	N	N	NP	NP	NP
32	M	22	20	FEMUR	MATERIEL	Changement du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	1	N	O	O	N	O	18	14,22	320
33	M	58	27	EPAULE	MATERIEL	Changement du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	8	N	O	N	N	N	5,8	3,6	NP
34	M	34	25	CHEVILLE	MATERIEL	Ablation du matériel d'ostéosynthèse	N	N	N	0	1	6	O	N	N	O	N	7	NP	NP
35	M	64	25	HANCHE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	N	N	N	0	1	426	N	N	N	N	O	NP	NP	NP
36	M	32	21	COUDE	PROTHESE	Premier temps d'un changement de prothèse (dépose)	N	N	N	0	1	110	N	O	N	N	O	NP	NP	<5

Annexe 1. Données démographiques et clinico-biologiques des 34 cas d'infections sur matériel ostéo-articulaire monomicrobiennes à *C. acnes*.

^a Délai entre la pose de l'implant et la reprise chirurgicale ; NP = non précisé dans le dossier patient

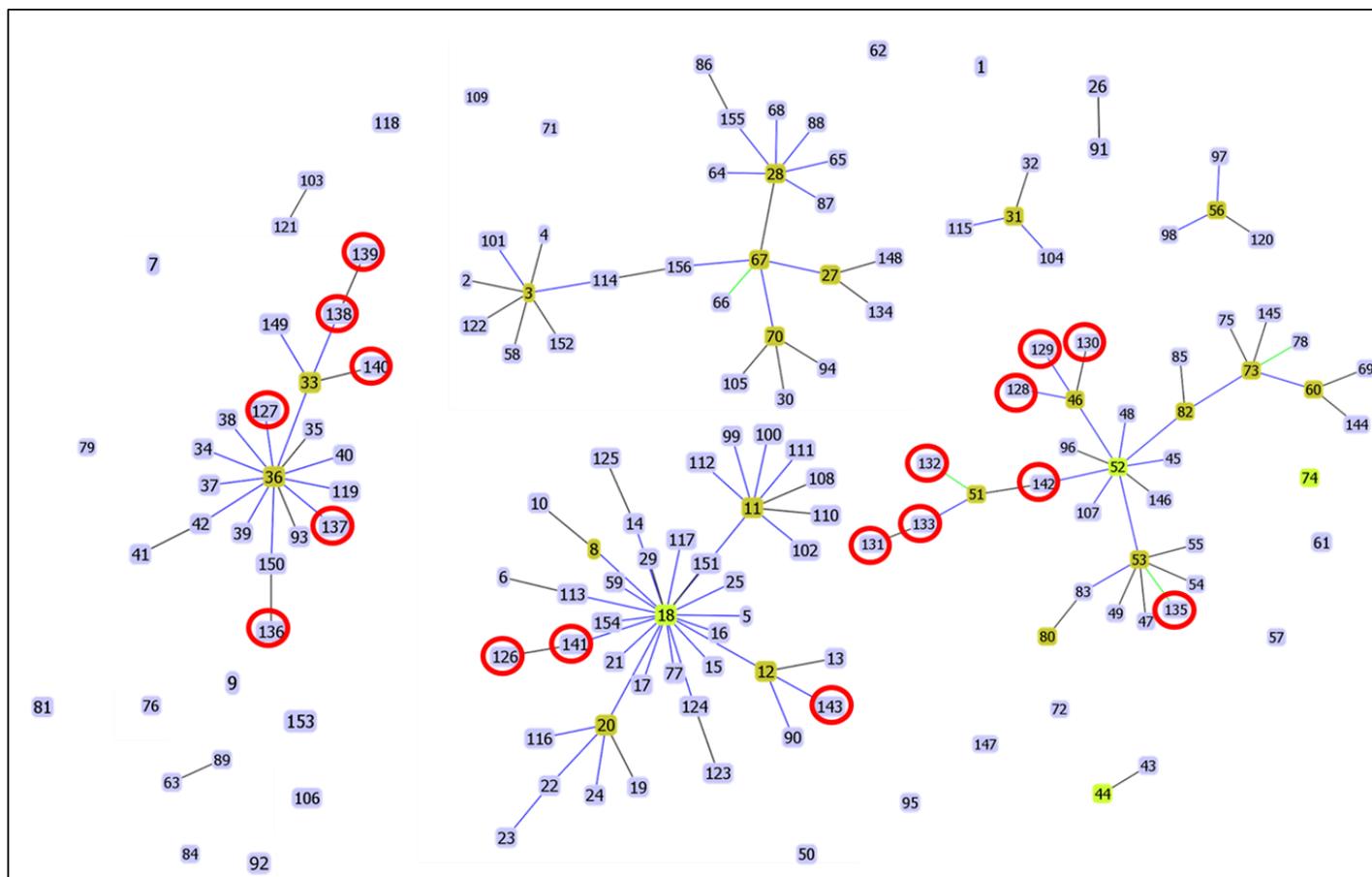
Annexes 1 et 2

N° patient	Sexe	Age (ans)	Site de l'implant	Type d'implant	CRP sérique pré-opératoire	Données génotypiques et microbiologiques																		Catégorisation génotypique	
						ST n°1	Phylotype	CC	N isolats	ST n°2	Phylotype	CC	N isolats	ST n°3	Phylotype	CC	N isolats	ST n°4	Phylotype	CC	N isolats	N total d'isolats	N prélèvements positifs à <i>C. acnes</i>		N prélèvements réalisés
18	F	88	GENOU	PROTHESE	39	18	IA1	CC18	1	70	IA2	CC28	1	33	IB	CC36	1	46	II	CC53	1	4	4	10	Hétérotypique
11-1	M	23	FEMUR	MATERIEL	32	126	IA1	CC18	1	18	IA1	CC18	6	36	IB	CC36	2					9	10	10	Hétérotypique
15	M	39	TIBIA	MATERIEL	NP	131	II	CC53	1	132	II	CC53	1	133	II	CC53	2					4	5	5	Hétérotypique
28	M	16	COUDE	MATERIEL	5	141	IA1	CC18	1	18	IA1	CC18	1									2	3	3	Hétérotypique
36	M	32	COUDE	PROTHESE	<5	143	IA1	CC18	1	27	IA2	CC28	1									2	2	4	Hétérotypique
11-2	M	23	FEMUR	MATERIEL	12	18	IA1	CC18	2	29	IA1	CC18	3									5	5	5	Hétérotypique
8	M	28	EPAULE	MATERIEL	NP	27	IA2	CC28	1	33	IA1	CC36	1									2	5	5	Hétérotypique
6	M	72	EPAULE	PROTHESE	13	27	IA2	CC28	1	36	IB	CC36	2									3	5	5	Hétérotypique
14	M	68	HANCHE	PROTHESE	8	130	II	CC53	1	36	IB	CC36	3									4	5	5	Hétérotypique
21	M	48	HANCHE	PROTHESE	2	135	II	CC53	1	53	II	CC53	1									2	2	5	Hétérotypique
12	F	36	RACHIS	MATERIEL	4	33	IB	CC36	1	127	IA1	CC36	1									2	4	5	Hétérotypique
13	F	54	GENOU	PROTHESE	13	128	II	CC53	1	129	II	CC53	1									2	2	5	Hétérotypique
22	M	67	CHEVILLE	PROTHESE	<5	136	IB	CC36	1	137	IB	CC36	1									2	2	5	Hétérotypique
24	M	77	HANCHE	PROTHESE	<2	139	IB	CC36	1	138	IB	CC36	2									3	3	3	Hétérotypique
1	M	21	TIBIA	MATERIEL	26	18	IA1	CC18	2													2	3	3	Homotypique
2	M	66	FEMUR	MATERIEL	NP	36	IB	CC36	2													2	3	3	Homotypique
3	M	81	HANCHE	PROTHESE	29	36	IB	CC36	2													2	5	5	Homotypique
4	M	58	EPAULE	PROTHESE	48	18	IA1	CC18	2													2	4	5	Homotypique
5	M	85	HANCHE	PROTHESE	39	36	IB	CC36	2													2	2	5	Homotypique
7	M	78	GENOU	PROTHESE	55	12	IA1	CC18	3													3	5	5	Homotypique
9	F	21	RACHIS	MATERIEL	32	18	IA1	CC18	2													2	2	5	Homotypique
10	F	87	HANCHE	PROTHESE	57	18	IA1	CC18	4													4	8	9	Homotypique
16	F	54	RACHIS	MATERIEL	124	27	IA2	CC28	4													4	4	5	Homotypique
17	F	43	RACHIS	MATERIEL	NP	18	IA1	CC18	3													3	5	5	Homotypique
19	F	23	RACHIS	MATERIEL	150	134	IA2	CC28	9													9	9	10	Homotypique
20	M	34	GENOU	MATERIEL	NP	41	IB	CC36	5													5	5	5	Homotypique
26	M	69	HANCHE	PROTHESE	NP	140	IB	CC36	2													2	5	5	Homotypique
29	M	29	TIBIA	MATERIEL	3	142	II	CC53	3													3	5	5	Homotypique
30	M	66	EPAULE	PROTHESE	75	36	IB	CC36	3													3	7	7	Homotypique
31	M	69	HANCHE	PROTHESE	NP	52	II	CC53	3													3	3	4	Homotypique
32	M	22	FEMUR	MATERIEL	320	20	IA1	CC18	3													3	3	3	Homotypique
33	M	58	EPAULE	MATERIEL	NP	27	IA2	CC28	2													2	5	5	Homotypique
34	M	34	CHEVILLE	MATERIEL	NP	31	IA1	CC31	2													2	2	5	Homotypique
35	M	64	HANCHE	PROTHESE	NP	36	IB	CC36	4													4	4	4	Homotypique

Annexe 2. Données génotypiques et microbiologiques des 34 cas d'infections sur matériel ostéo-articulaire monomicrobiennes à *C. acnes*.

NP = non précisé dans le dossier patient

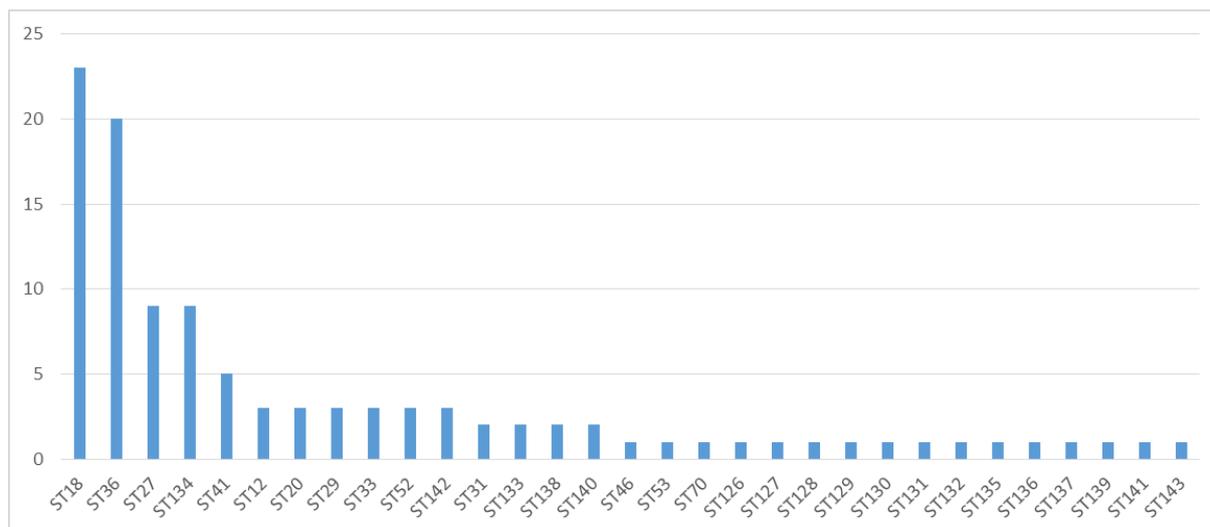
Annexe 3



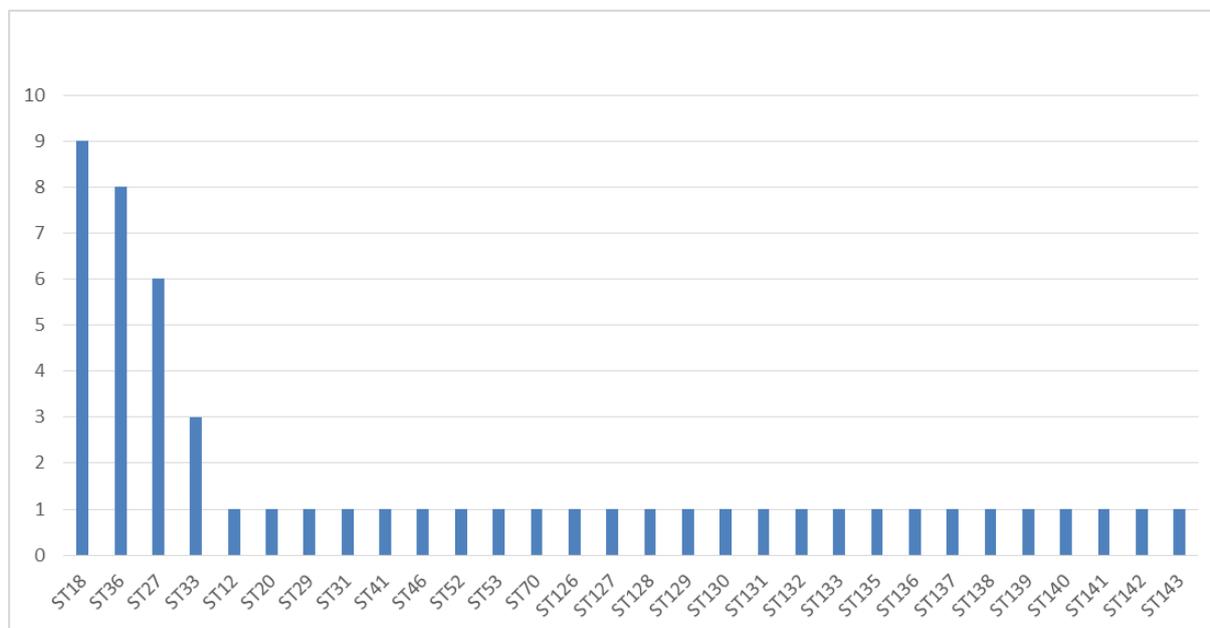
Annexe 3. Snapshot par goeBurst de la population globale de *C. acnes* et la place des nouveaux STs décrits grâce ces travaux de thèse par l'analyse génotypique par MLST9 d'isolats de *C. acnes* recueillis dans des prélèvements peropératoires périprothétiques réalisés dans le cadre d'une suspicion d'infection sur matériel ostéo-articulaire.

Analyse faite par le logiciel PhyloViz 2.0 utilisant l'algorithme goeBurst –tiebreak level TLV (triple locus variant). Les STs colorés en vert clair correspondent au ST « group founder », les STs colorés en vert foncé correspondent au ST « subgroup founder ». Les lignes noires sont tracées sans avoir recours au tiebreak rule, les bleues en ayant recours à la règle tiebreak n°1 (nombre de SLV ou single locus variant), les vertes en ayant recours à le règle tiebreak n°2 (nombre de DLV ou double locus variant). Les nouveaux STs sont entourés d'un cercle rouge.

Annexes 4 et 5



Annexe 4. Nombre d'isolats de *C. acnes* par ST dans la collection d'isolats recueillis de cas diagnostiqués et pris en charge comme infection sur matériel ostéo-articulaire.



Annexe 5. Représentativité des différents STs en fonction du nombre de cas les impliquant dans notre série des 34 cas d'IMOA monomicrobiennes à *C. acnes*.

Annexes 6 et 7

```
GTTGCACACCAGGGGGTCAACTTGGCGTCCTCAGTTCAAAATTGATTCAAACCTAACAGTT
CCATGTCGGGAAACAGCACCAGGAAGCTCGTGACATATCGTCTTTCATTGCGAGAAACAT
CTTACTTATGTACATTTCTAAGCTATAGCGTCTACCCTTGTGACAGCCAGGACGATGGGT
GTCACCTCCCCTTTCTAGTCAACCTAAGAGAGGAGGAAATGCCGCGATATATGTTCCACC
CTGTCATCACGAACGCCACCACAATCTATCCCAGAACAGCCGGCACTTCACTCACGATG
CCCCGATGCTGGATTCTATTGTCGCCCTTATTAGGGCAAGCGGTGCCAGTAGCAGAATA
GTCACCTCAACAACCTCGATCCGCCCTGCCATTACATGGGTAACATATCCATGGAGGTT
CGATGTATACTCGAGGATACAGTCGTCCATCACGCCCGCCTACATACCCATTACATCAGC
ATAG
```

Annexe 6. Séquence nucléotidique correspondant au locus SLST de *C. acnes* (484 pb) dans l'isolat n°59 du patient 18.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
883 bits(478)	0.0	482/484(99%)	0/484(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTTGCACACCAGGGGGTCAACTTGGCGTCCTCAGTTCAAAATTGATTCAAACCTAACAGTT	60		
Sbjct 1	GTTGCACACCAGGGGGTCAACTTGGCGTCCTCAGTTCAAAATTGATTCAAACCTAACAGTT	60		
Query 61	CCATGTCGGGAAACAGCACCAGGAAGCTCGTGACATATCGTCTTTCATTGCGAGAAACAT	120		
Sbjct 61	CCATGTCGGGAAACAGCACCAGGAAGCTCGTGACATATCGTCTTTCATTGCGAGAAACAT	120		
Query 121	CTTACTTATGTACATTTCTAAGCTATAGCGTCTACCCTTGTGACAGCCAGGACGATGGGT	180		
Sbjct 121	CTTACTTATGTACATTTCTAAGCTATAGCGTCTACCCTTGTGACAGCCAGGACGATGGGT	180		
Query 181	GTCACCTCCCCTTTCTAGTCAACCTAAGAGAGGAGGAAATGCCGCGATATATGTTCCACC	240		
Sbjct 181	GTCACCTCCCCTTTCTAGTCAACCTAAGAGAGGAGGAAATGCCGCGATATATGTTCCACC	240		
Query 241	CTGTCATCACGAACGCCACCACAATCTATCCCAGAACAGCCGGCACTTCACTCACGATGC	300		
Sbjct 241	CTGTCATCACGAACGCCACCACAATCTATCCCAGAACAGCCGGCACTTCACTCACGATGC	300		
Query 301	CCCCGATGCTGGATTCTATTGTCGCCCTTATTAGGGCAAGCGGTGCCAGTAGCAGAATAT	360		
Sbjct 301	CCCCGATGCTGGATTCTATTGTCGCCCTTATTAGGGCAAGCGGTGCCAGTAGCAGAATAT	360		
Query 361	GTCACCTCAACAACCTCGATCCGCCCTGCCATTACATGGGTAACATATCCATGGAGGTT	420		
Sbjct 361	GTCACCTCAACAACCTCGATCCGCCCTGCCATTACATGGGTAACATATCCATGGAGGTT	420		
Query 421	CGATGTATACTCGAGGATACAGTCGTCCATCACGCCCGCCTACATACCCATTACATCAGC	480		
Sbjct 421	CGATGTATACTCGAGGATACAGTCGTCCATCACGCCCGCCTACATACCCATTACATCAGC	480		
Query 481	ATAG	484		
Sbjct 481	ATAG	484		

Annexe 7. Alignement (par nblast) du nouveau SLST type désigné comme F20 avec le SLST type F4 de la banque de données SLST *C. acnes*.

Annexe 8

Patient n°	ST (MLST9)	Complexe clonal (CC)	Hétérotypique ou Homotypique (basé sur MLST)	Infection ou contamination (basé sur MLST)	SLST type	Hétérotypique ou Homotypique (basé sur SLST)	Infection ou contamination (basé sur SLST)
1	ST18	CC18	Homotypique	Infection	A1	Homotypique	Infection
1	ST18	CC18			A1		
2	ST36	CC36	Homotypique	Infection	H4	Homotypique	Infection
3	ST36	CC36	Homotypique	Infection	H1	Homotypique	Infection
3	ST36	CC36			H1		
4	ST18	CC18	Homotypique	Infection	A1	Homotypique	Infection
4	ST18	CC18			A1		
5	ST36	CC36	Homotypique	Infection	H1	Homotypique	Infection
5	ST36	CC36			H1		
6	ST27	CC28	Hétérotypique	Infection	D1	Hétérotypique	Infection
6	ST36	CC36			H1		
6	ST36	CC36			H1		
7	ST12	CC18	Homotypique	Infection	A1	Homotypique	Infection
7	ST12	CC18			A1		
7	ST12	CC18			A1		
8	ST27	CC28	Hétérotypique	Contamination	D1	Hétérotypique	Contamination
8	ST33	CC36			H1		
9	ST18	CC18	Homotypique	Infection	A1	Homotypique	Infection
9	ST18	CC18			A1		
10	ST18	CC18	Homotypique	Infection	A1	Homotypique	Infection
10	ST18	CC18			A1		
10	ST18	CC18			A1		
10	ST18	CC18			A1		
11.1	ST18	CC18	Hétérotypique	Infection	A1	Hétérotypique	Infection
11.1	ST18	CC18			A1		
11.1	ST18	CC18			A1		
11.1	ST18	CC18			A1		
11.1	ST36	CC36			H1		
11.1	ST18	CC18			A1		
11.1	ST36	CC36			H1		
11.1	ST18	CC18			A1		
11.1	ST126	CC18			A1		
11.2	ST29	CC18	Hétérotypique	Infection	A1	Homotypique	Infection
11.2	ST29	CC18			A1		
11.2	ST18	CC18			A1		
11.2	ST18	CC18			A1		
12	ST127	CC36	Hétérotypique	Contamination	H1	Homotypique	Infection
12	ST33	CC36			H1		
13	ST128	CC53	Hétérotypique	Contamination	K7	Homotypique	Infection
13	ST129	CC53			K7		
14	ST130	CC53	Hétérotypique	Infection	K2	Hétérotypique	Infection
14	ST36	CC36			H1		
14	ST36	CC36			H1		
14	ST36	CC36			H1		
15	ST131	CC53	Hétérotypique	Contamination	K1	Homotypique	Infection
15	ST132	CC53			K1		
15	ST133	CC53			K1		
15	ST133	CC53			K1		
16	ST27	CC28	Homotypique	Infection	D1	Homotypique	Infection
16	ST27	CC28			D1		
16	ST27	CC28			D1		
16	ST27	CC28			D1		
17	ST18	CC18	Homotypique	Infection	A1	Homotypique	Infection
17	ST18	CC18			A1		
17	ST18	CC18			A1		
18	ST33	CC36	Hétérotypique	Contamination	H1	Hétérotypique	Contamination
18	ST70	CC28			F20		
18	ST18	CC18			A1		
18	ST46	CC53			K2		
19	ST134	CC28	Homotypique	Infection	D1	Homotypique	Infection
19	ST134	CC28			D1		
19	ST134	CC28			D1		
19	ST134	CC28			D1		
19	ST134	CC28			D1		
19	ST134	CC28			D1		
19	ST134	CC28			D1		
19	ST134	CC28			D1		
20	ST41	CC36	Homotypique	Infection	H1	Homotypique	Infection
20	ST41	CC36			H1		
20	ST41	CC36			H1		
20	ST41	CC36			H1		
20	ST41	CC36			H1		
21	ST53	CC53	Hétérotypique	Contamination	K1	Homotypique	Infection
21	ST135	CC53			K1		
22	ST136	CC36	Hétérotypique	Contamination	H1	Homotypique	Infection
22	ST137	CC36			H1		
24	ST138	CC36	Hétérotypique	Infection	H1	Homotypique	Infection
24	ST139	CC36			H1		
24	ST138	CC36			H1		
26	ST140	CC36	Homotypique	Infection	H1	Homotypique	Infection
26	ST140	CC36			H1		
28	ST141	CC18	Hétérotypique	Contamination	A1	Homotypique	Infection
28	ST18	CC18			A1		
29	ST142	CC53	Homotypique	Homotypique	K1	Homotypique	Infection
29	ST142	CC53			K1		
29	ST142	CC53			K1		
30	ST36	CC36	Homotypique	Homotypique	H1	Homotypique	Infection
30	ST36	CC36			H1		
30	ST36	CC36			H1		
31	ST52	CC53	Homotypique	Homotypique	K8	Homotypique	Infection
31	ST52	CC53			K8		
31	ST52	CC53			K8		
32	ST20	CC18	Homotypique	Homotypique	A1	Homotypique	Infection
32	ST20	CC18			A1		
32	ST20	CC18			A1		
33	ST27	CC28	Homotypique	Homotypique	D1	Homotypique	Infection
33	ST27	CC28			D1		
34	ST31	CC31	Homotypique	Homotypique	E3	Homotypique	Infection
34	ST31	CC31			E3		
35	ST36	CC36	Homotypique	Homotypique	H1	Homotypique	Infection
35	ST36	CC36			H1		
35	ST36	CC36			H1		
35	ST36	CC36			H1		
36	ST27	CC28	Hétérotypique	Contamination	D1	Hétérotypique	Contamination
36	ST143	CC18			A1		

Annexe 8. Catégorisation des 34 cas d'IMOA à *C. acnes* en infection/contamination et hétérotypique/homotypique sur la base des données MLST vs SLST.

In-Host Adaptation of *Salmonella enterica* Serotype Dublin during Prosthetic Hip Joint Infection

Faten El Sayed, Guillaume Sapriel, Nizar Fawal, Aurelia Gruber, Thomas Bauer, Beate Heym, Caroline Dupont, Henri-Jean Garchon, Jean-Louis Gaillard, Martin Rottman, Simon Le Hello

Genome degradation has been central to the adaptation of *Salmonella enterica* serotypes to their hosts throughout evolution. We witnessed the patho-adaptation of a strain of *Salmonella* Dublin (a cattle-adapted serotype) to a human host during the course of a recurrent prosthetic hip joint infection evolving over several years.

Salmonella enterica serotype Dublin is a host-adapted bacterium with cattle as a predominant reservoir and is responsible for invasive, potentially life-threatening infections in humans (1,2). In France, the epidemiology of *Salmonella* Dublin infections among humans corroborates surveillance data from the United States (1). *Salmonella* Dublin causes substantially more bloodstream infections and hospitalizations than other *Salmonella* serotypes. It is also much more likely to be isolated in metastatic foci of infection secondary to bacteremia. The prevalence of prosthetic joints in *Salmonella* Dublin patients is significantly greater than for other *Salmonella* cases (Table).

Host adaptation is central to pathogen evolution and is associated with gene acquisition, genome degradation (gene inactivation or deletion), or both. Genome degradation has played a major role in the adaptation of *S. enterica* serotypes Typhi and Paratyphi A to the human host throughout evolution (3). Degradation also has been recently reported in a severely immunocompromised patient in whom recurrent systemic *Salmonella* Enteritidis infections developed over 15 years (4). We report the phenotypic and genomic changes

Author affiliations: University of Versailles Saint-Quentin, Montigny-le-Bretonneux, France (F. El Sayed, G. Sapriel, B. Heym, H.-J. Garchon, J.-L. Gaillard); Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France (F. El Sayed, A. Gruber, T. Bauer, B. Heym, C. Dupont, J.-L. Gaillard, M. Rottman); Atelier de Bioinformatique, Paris, France (G. Sapriel); Institut Pasteur, Paris (N. Fawal, S. Le Hello); Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France (M. Rottman)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2412.180214>

undergone by *Salmonella* Dublin throughout a recurrent prosthetic hip infection in an immunocompetent patient.

The Study

In May 2011, a 74-year-old woman with bilateral hip prostheses (implanted in 1998 [right] and 2001 [left]) was admitted to intensive care for sepsis and left hip pain (online Technical Appendix Figure, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/24/12/18-0214-Techapp1.pdf>). Blood cultures and a joint aspiration yielded pure cultures of *Salmonella* spp. She underwent debridement and implant retention surgery, followed by a 6-week intravenous course of cefotaxime and ciprofloxacin. Three years later, she sought care at the emergency department with acute-onset fever and prosthesis joint infection of the right hip and underwent right hip debridement and implant retention surgery. Blood cultures, joint aspirates, and all interoperative periprosthetic tissue samples yielded *Salmonella* spp. The patient received 2 weeks of intravenous amoxicillin and oral ofloxacin, was discharged, and received oral antimicrobial drugs for 10 more weeks. Six weeks after surgery, the surgical wound was healed, and the patient walked normally. One year later (2015), her primary care physician referred her to the hospital because of night fevers without local signs or implant dysfunction. Radiolucosintigraphy showed right hip inflammation. Bilateral hip biopsies were performed, and the right hip biopsy sample tested positive for *Salmonella* spp. A right hip 1-stage exchange procedure was performed. All intraoperative periprosthetic tissue samples yielded *Salmonella* spp. A 6-week course of intravenous therapy with ceftriaxone and ciprofloxacin was administered. One year later (2016), the patient appeared to be free from infection and walked normally.

We characterized isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and serotyping (French National Reference Center for *Salmonella*). We assessed carbohydrate metabolic activity using the API50CH system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and biofilm formation using crystal violet (5). Antimicrobial susceptibility testing was performed using 2015 EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) guidelines (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). We conducted high-throughput whole-genome sequencing using the Illumina NextSeq 500 system (Illumina, San Diego, CA, USA).

Annexe 9

Table. Demographic characteristics of patients and sources for *Salmonella enterica* serotype Dublin and other *Salmonella* isolates, France, 2010–2016

Patient characteristic	<i>Salmonella</i> Dublin, no (%)	Other <i>Salmonella</i> , no. (%)	p value*
All cases, N = 63,264	642	62,622	
Sex†			
F	266	30,762	<0.01
M	363	30,401	
Age group, y‡			
<1	4 (0.6)	3,767 (6.0)	<0.01
1–5	33 (5.1)	15,302 (24.4)	<0.01
6–14	19 (3.0)	8,636 (13.8)	<0.01
15–64	199 (31.0)	23,653 (37.8)	NS
≥65	375 (58.4)	9,801 (15.7)	<0.01
Unknown	12 (1.9)	1463 (2.3)	NS
Type of human sample§¶			
Feces	218 (34.0)	55,824 (89.1)	<0.01
Blood	264 (41.1)	3,268 (5.2)	<0.01
Urine	72 (11.2)	2,257 (3.6)	<0.01
Articular	20 (3.1)	30 (0.05)	<0.01
Pus	11 (1.7)	65 (0.1)	<0.01
Bile	1 (0.2)	32 (<0.1)	NS
Cerebrospinal fluid	0	23 (<0.1)	NS
Other	56 (8.7)	1123 (1.8)	<0.01
Hospitalization	368 (57.3)	20,556 (32.8)	<0.01

*Pearson χ^2 test used for statistical comparisons with significant difference if $p < 0.05$. NS, nonsignificant.

†Numbers do not add to total because of patients for whom sex was unknown.

‡Median ages: *Salmonella* Dublin, 69.7 y (range <1–99); other *Salmonella*, 29.5 y (range <1–103); $p < 0.01$.

§Ratio of blood to 1,000 fecal isolates: *Salmonella* Dublin, 1,211; other *Salmonella*, 58; $p < 0.01$.

¶Prosthetic joint prevalence among patients: *Salmonella* Dublin, $n = 10/642$ (1.5%); other *Salmonella*, $11/62,622$ (<0.1%); $p < 0.01$.

For each isolate, the paired-end reads were aligned against 2 *Salmonella* Dublin CT_020221853 and 3246 reference genomes to increase the single-nucleotide polymorphism (SNP) detection (GenBank accession nos. CP001144.1 and CM001151.1, respectively) (6) (online Technical Appendix). We annotated putative coding sequences using GeneMark (7) and performed ortholog identification, based on the prototypal human reference genome CT_020221853, using BLAST+ (8) with a 1×10^{-10} E-value threshold and confirmed by a synteny conservation check. We first identified candidate pseudogenized sequences using a proteome/proteome BLASTp approach (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): protein sequences of strains Str.2011, Str.2014, and Str.2015 with Query Coverage <80% relative to the reference strain orthologs were selected as potentially pseudogenized sequences. We then analyzed nucleic acid level sequences corresponding to the previously selected candidates to confirm the change in coding sequences, and to precisely determine the genetic event kind of nucleic acid change involved (frame-shift mutation or indel).

We studied 3 patient strains: Str.2011 (May 2011, left hip intraoperative periprosthetic tissue [HIPT]), Str.2014 (April 2014, right HIPT), and Str.2015 (June 2015, right HIPT). Unlike Str.2011, Str.2014 and Str.2015 were non-motile with no detectable H antigen and had lost the ability to use 9 of the 18 carbohydrates used by Str.2011, with slight profile variations (Figure). All strains could form biofilms and had identical wild-type antimicrobial drug susceptibility profiles and unchanged MICs for β -lactams and quinolones, without mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*,

and *parE* genes. All 3 strains belonged to the sequence type 10 *Salmonella* Dublin population (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). The mapping of Str.2011, Str.2014, and Str.2015 genomes against the *Salmonella* Dublin CT_020221853 and str.3246 reference genomes detected 451 and 268 SNPs, respectively, whereas the 3 patient strains differed by only 6 SNPs, strongly suggesting they derived from a single infecting strain. Four SNPs were nonsynonymous in coding genes; 2 SNPs were in an intergenic region (Figure).

Comparative proteome/proteome analysis detected putative pseudogenized sequences that were due to indels within 3 coding sequences in Str.2014 and Str.2015. These pseudogenes were involved in carbohydrate transport (*ptsA*) (14-bp deletion), lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis (*waaY*) (16-bp insertion), and protein synthesis (*tufB*) (790-bp deletion, total gene deletion); we identified no pseudogene among the genes of the flagellar regulon. The pseudogene involved in carbohydrate transport, *ptsA*, controls the import of carbohydrates, such as mannose, fructose, and N-acetyl-glucosamine (9), 3 carbohydrates used by Str.2011 but not Str.2014 or Str.2015. Mutation of the LPS biosynthesis gene *waaY* in Str.2014 and Str.2015 had apparently no effect on the expression of the *Salmonella* Dublin O antigen but might have affected flagellar assembly and function, as described for *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* (10,11). The mutation of *tufB* in Str.2014 and Str.2015 leads to a one third decrease in the production of the translation elongation factor EF-Tu (the other two thirds is synthesized from *tufA*) (12).

Annexe 9

DISPATCHES

The patient in this study had no detectable gallbladder or intestinal carriage, which has been associated with recurrent *Salmonella* infections (13). She had no apparent immunodeficiency, a well-documented risk factor for invasive *Salmonella* Dublin infection. *Salmonella* Dublin

most likely persisted as a biofilm at the surface of the implants, leading to recurrence of chronic disease despite prolonged antimicrobial therapy until the ablation of the infected material (14). The genomic changes we observed involved carbohydrate metabolism and LPS biosynthesis,

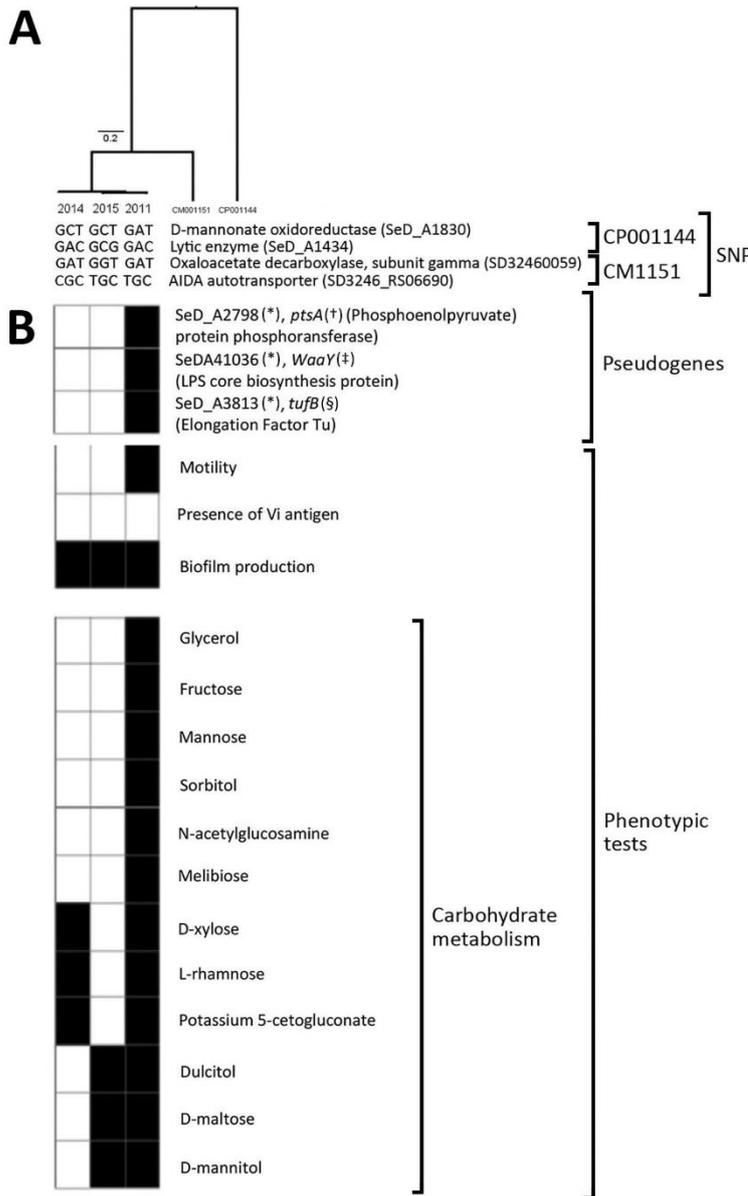


Figure. Genomic and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype Dublin isolates Str.2011, Str.2014, and Str.2015 from a 74-year-old woman who had recurrent infections involving hip joint prostheses, France. A) Tree constructed after mapping the sequences of the isolates to reference genomes of *Salmonella* Dublin strains CT_020221853 and 3246 (GenBank accession nos. CP001144.1 and CM001151.1, respectively). The 4 nonsynonymous SNPs and the corresponding coding genes are shown. Scale bar indicates genetic distance. B) Genes in Str.2011 and altered in Str.2014 and Str.2015 (reference strain *Salmonella* Dublin CT_02021853) are indicated by black and white boxes, respectively. Positive phenotypic tests are indicated as black boxes. For carbohydrate metabolism, only carbohydrates used by Str.2011 and not used by Str.2014 and/or Str.2015 are shown. *Gene ID annotation based on reference strain *Salmonella* Dublin str. CT_02021853 (GenBank accession no. CP001144.1). Genetic events found: †14-bp deletion; ‡16-bp insertion; §790-bp deletion (total gene deletion). SNP, single-nucleotide polymorphism.

as similarly reported for *Salmonella* Enteritidis isolates recovered from the bloodstream of a severely immunocompromised patient, years after the initial infection (4). Changes in carbon source availability are known to affect virulence gene regulators. In the presence/absence of a specific carbon source, specific virulence genes can be turned on or switched off, enabling pathogens to adapt to their new niche (9). Because LPS and flagellin are potent triggers of the inflammatory response, LPS alterations and the loss of flagellin expression (15) might have limited the host's innate immune response to *Salmonella* Dublin and facilitated its persistence at the implant interface.

Conclusions

This clinical case and other recent reports of patients with chronic infections highlight the remarkable adaptability of pathogens to a new niche. More specifically, these results show that the process of patho-adaptation of *Salmonella* serotypes may be extremely rapid and relies on mechanisms of genomic reshaping reminiscent of those found during the evolution of this pathogen in contact with humans. Enhanced awareness is warranted for *Salmonella* Dublin, especially in the elderly bearing prostheses.

Acknowledgments

We thank Vincent Enouf and Laetitia Fabre for processing the whole-genome sequencing and microbiological information, respectively. We are grateful to all the microbiological laboratories that participated in the human *Salmonella* network for processing the isolates.

This work was supported by the French National Reference Center for *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*, co-funded by Santé Publique France and belonging to the Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases Laboratory of Excellence funded by the French Government Investissement d'Avenir program (grant no. ANR-10-LABX-62-IBED).

Genomics sequence assemblies used in this project are available online on the National Center for Biotechnology Information network under accession no. PRJNA433355 (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/433355>).

About the Author

Ms. El Sayed is a postgraduate fellow in clinical bacteriology of Ambroise Paré Teaching Hospital in Paris. Her research interests include bacteria adaptation and epidemiology in bone and joint infections context.

References

- Harvey RR, Friedman CR, Crim SM, Judd M, Barrett KA, Tolar B, et al. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Dublin infections among humans, United States, 1968–2013. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:1493–501. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2309.170136>
- Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:901–37. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
- McClelland M, Sanderson KE, Clifton SW, Latreille P, Porwollik S, Sabo A, et al. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet*. 2004;36:1268–74. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1470>
- Klemm EJ, Gkrania-Klotsas E, Hadfield J, Forbester JL, Harris SR, Hale C, et al. Emergence of host-adapted *Salmonella* Enteritidis through rapid evolution in an immunocompromised host. *Nat Microbiol*. 2016;1:1–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.23>
- Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38:428–32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>
- Kuijpers LMF, Le Hello S, Fawal N, Fabre L, Tourdjman M, Dufour M, et al. Genomic analysis of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi A during an outbreak in Cambodia, 2013–2015. *Microb Genom*. 2016;2:e000092. <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000092>
- Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:2607–18. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.12.2607>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:421. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Mitchell WJ. The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a central feature of carbohydrate accumulation by enteric bacteria. *Microbiol Sci*. 1985;2:330–4, 339.
- Deditius JA, Felgner S, Spöring I, Kühne C, Frahm M, Rohde M, et al. Characterization of novel factors involved in swimming and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One*. 2015;10:e0135351. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135351>
- Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:635–700. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Hughes D. Both genes for EF-Tu in *Salmonella* Typhimurium are individually dispensable for growth. *J Mol Biol*. 1990;215:41–51. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80093-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80093-2)
- Crawford RW, Rosales-Reyes R, Ramirez-Aguilar ML, Chapa-Azucla O, Alpuche-Aranda C, Gunn JS. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:4353–8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1000862107>
- McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manning MM, Calhoun JH, Shirliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*. 2014;9:987–1007. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.64>
- Yim L, Sasias S, Martínez A, Betancor L, Estevez V, Scavone P, et al. Repression of flagella is a common trait in field isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin and is associated with invasive human infections. *Infect Immun*. 2014;82:1465–76. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01336-13>

Address for correspondence: Simon Le Hello, Institut Pasteur, Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France; email: simon.le-hello@pasteur.fr; Faten El Sayed, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, UVSQ, 2, avenue Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France; email: faten.elsayed@aphp.fr

Titre : Bases de pathogénicité de *Cutibacterium acnes* dans les infections sur matériel ostéo-articulaire : corrélation entre le génotype et la réponse immune.

Mots clés : *Cutibacterium acnes*, typage moléculaire, infections ostéo-articulaires

Résumé

L'objectif de ces travaux de thèse a été de contribuer à la compréhension de la physiopathologie des infections sur matériel ostéo-articulaire (IMOA) à *C. acnes*.

Dans un premier temps, nous avons typé par MLST 108 isolats de *C. acnes* responsables de 34 cas d'IMOA monomicrobiennes et corrélé les résultats de typage aux données clinico-biologiques. Nous avons ainsi montré que les IMOA à *C. acnes* correspondent à 2 entités cliniques : i) les cas « homotypiques » qui sont des vraies infections dues à un clone de *C. acnes* responsable d'une réponse inflammatoire de l'hôte ii) les cas hétérotypiques qui sont une colonisation ou contamination itérative du matériel ostéo-articulaire en l'absence de réponse inflammatoire de l'hôte. Ces données de typage ont souligné les limites de la définition microbiologique actuelle d'une IMOA quand il s'agit de *C. acnes* et la nécessité d'intégrer un outil moléculaire fiable dans le diagnostic microbiologique de routine de ces infections. Nous avons par conséquent évalué la technique SLST développée pour un typage rapide et optimal de *C. acnes* en routine. Le pouvoir discriminant de cette technique était insuffisant suggérant que seule la mise en place du NGS en temps réel dans les laboratoires de microbiologie pourrait répondre au besoin de typage moléculaire pour améliorer le diagnostic microbiologique de ces infections.

Nos résultats de typage ont montré que la clonalité de l'infection plutôt que le complexe clonal (CC) est le principal facteur déterminant du processus physiopathologique et inflammatoire de l'IMOA à *C. acnes*. Cette conclusion est concordante avec les résultats que nous avons obtenus dans un modèle *in vitro* d'infection de macrophages THP-1 par *C. acnes*. Grâce à ce modèle, nous avons pu montrer que la réponse inflammatoire *in vitro* de nos isolats est souche –et non CC– dépendante. De plus, les réponses inflammatoires *in vitro* et *in vivo* n'étaient pas corrélées. Ceci souligne les limites des modèles *in vitro* dans l'étude de la physiopathologie des IMOA à *C. acnes* dans lesquels l'adaptation de la bactérie à l'hôte est complètement négligée lors de l'étude de la réponse immune.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons confirmé l'importance de l'environnement dans le conditionnement du comportement de la bactérie. Nous avons mené une étude comparative des caractéristiques culturelles *ex vivo* et *ex vitro* de nos isolats de *C. acnes*. Nous avons montré l'impact du CC et des conditions environnementales, par extension la pression que peut exercer l'hôte, sur le profil culturel de *C. acnes*.

En conclusion, nos travaux montrent qu'une approche multifactorielle, intégrant à la fois la génomique et la réponse de l'hôte, est nécessaire pour comprendre la physiopathologie des IMOA à *C. acnes*.

Title: Pathogenicity basis of *Cutibacterium acnes* orthopedic-device related infections: Correlation between genotype and immune response.

Keywords: *Cutibacterium acnes*, molecular typing, bone and joint infections

Abstract

The aim of this thesis was to contribute to the understanding of the physiopathology of *C. acnes* orthopedic-device related infections (ODRI).

Firstly, we typed by MLST 108 *C. acnes* isolates responsible for 34 cases of monomicrobial ODRI and correlated typing results with bio-clinical data. We have shown that *C. acnes* ODRI correspond to two clinical entities: i) "homotypic" cases corresponding to true infections with a single pathogenic clone of *C. acnes* eliciting an inflammatory response ii) heterotypic cases corresponding to colonization or iterative contamination of the implant without systemic inflammatory response. These typing data highlighted the limitations of the current microbiological definition of ODRI when it comes to *C. acnes* and the need to incorporate a reliable molecular tool into the routine microbiological diagnosis of these infections. We therefore evaluated the SLST technique developed for a rapid and optimal typing of *C. acnes*. The discriminating power of this technique was insufficient suggesting that only the establishment of real-time NGS in microbiology laboratories could improve the microbiological diagnosis.

Our typing results showed that the clonal status of the infection and not CC is the main determining factor in the physiopathological and inflammatory process of *C. acnes* ODRI. This conclusion is consistent with our results obtained on an *in vitro* model of a macrophage THP-1 infection. Using this model, we have shown that the *in vitro* inflammatory response of our isolates is strain- and non-CC-dependent. In addition, the *in vitro* and *in vivo* inflammatory responses were not correlated. This underscores the limitations of *in vitro* models in the study of *C. acnes* ODRI in which the adaptation of the bacteria to the host is completely neglected during the study of the immune response. Finally, we confirmed the importance of the environment in the conditioning of the behavior of the bacterium. We conducted a comparative study of the *ex vivo* and *ex vitro* growth characteristics of our *C. acnes* isolates. We have shown the impact of CC and environmental conditions, by extension the pressure that can exert the host, on the cultural profile of *C. acnes*.

In conclusion, our work shows that a multifactorial approach, integrating both genomics and host response, is needed to understand the physiopathology of *C. acnes* ODRI.

