



**HAL**  
open science

# Staphylococcus saccharolyticus : à propos d'un cas d'infection de dispositif cardiaque implantable, enjeux de l'identification et pathogénicité d'un germe méconnu

Simon Lanne

## ► To cite this version:

Simon Lanne. Staphylococcus saccharolyticus : à propos d'un cas d'infection de dispositif cardiaque implantable, enjeux de l'identification et pathogénicité d'un germe méconnu. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01323806

**HAL Id: dumas-01323806**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01323806>**

Submitted on 31 May 2016

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

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

**UNIVERSITE DE ROUEN**  
**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

Année 2016

N°

**THESE**

**pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 26 avril 2016

par *LANNE Simon*

Né(e) le 06 septembre 1989 à Caen (14)

***Staphylococcus saccharolyticus* : à propos d'un cas  
d'infection de dispositif cardiaque implantable,  
enjeux de l'identification et pathogénicité d'un  
germe méconnu**

**Directeur** : Madame le Docteur Noëlle FREBOURG, MCU-PH

**Co-directeur** : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON, PU-PH

**Président du jury** : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON, PU-PH

**Membres du jury** : Madame le Docteur Noëlle FREBOURG, MCU-PH

Monsieur le Professeur Pierre-Yves LITZLER, PU-PH

Monsieur le Docteur Arnaud SAVOURE, PH



## Remerciements

Je remercie chaleureusement **Madame le Docteur Noëlle FREBOURG**, directrice de thèse, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de superviser ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils, ainsi que pour les échanges que nous avons eus. La confiance que vous m'avez accordée dès mon premier semestre d'internat m'a permis de beaucoup progresser durant mon parcours en biologie médicale. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

Mes plus sincères remerciements à **Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON** pour la présidence du jury de cette thèse. Vous avez fortement contribué à enrichir ma passion pour la biologie médicale et particulièrement en bactériologie grâce à la qualité de vos conseils et de vos enseignements. Ce fut un réel plaisir d'échanger avec vous sur de nombreux sujets transversaux durant mon internat, je vous témoigne ma plus grande gratitude.

Tous mes remerciements à **Monsieur le Professeur Pierre-Yves LITZLER** pour avoir accepté de juger mon travail. Connaissant votre passion pour ce sujet, soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

Je remercie aussi tout particulièrement **Monsieur le Docteur Arnaud SAVOURE** pour sa participation à juger ce travail et pour m'avoir détaillé avec la plus grande gentillesse tous les renseignements techniques sur le patient index de cette thèse dont il a assuré la prise en charge.

A **Monsieur le Docteur Ludovic LEMEE**, dont les conseils en biologie moléculaire m'ont été d'une aide très précieuse. Merci pour votre temps, qui je le sais est parfois difficile à trouver face aux nombreuses sollicitations dont vous faites l'objet.

Mes remerciements vont assurément à **l'équipe de l'unité de recherche du GRAM** et à **l'ensemble des techniciennes et techniciens de bactériologie**, et particulièrement à **Marie-Andrée, Estelle et Cindy** pour leur aide face à mes difficultés en matière de techniques de biologie moléculaire.

A **Mesdames les Docteurs Marion DAVID et Anne PERDRIX**, pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse dans les meilleures conditions. Soyez convaincues de ma plus grande gratitude. Je vous remercie de plus pour ces deux semestres passés dans votre laboratoire et qui resteront assurément les meilleurs. Vous m'avez fait découvrir avec enthousiasme la biologie polyvalente.

Un grand merci à mes co-internes, **Victor B., Kévin C., Bénédicte A-S., Juliette R., Aurélie R., Aurélie S. et Simon V.** sur qui j'ai pu compter durant ces années d'internat, notamment grâce à leur soutien sans faille. J'espère que la biologie nous offrira la chance de continuer à collaborer professionnellement à l'avenir.

A **mes parents**, sans qui ces 9 années d'études n'auraient pas été aussi belles. Merci pour votre soutien et vos encouragements.

Tous mes remerciements à **mon frère, Baptiste**, pour ses encouragements et pour sa disponibilité sur Paris lorsque mes études m'ont mené jusque-là.

A **mes amis**, qui ne sont pas du milieu médical et qui n'ont jamais compris ce qu'est un pharmacien biologiste. Non je ne vends pas de médicaments et je ne suis pas non plus chercheur. Mais oui je suis quand même pharmacien et je travaille quand même dans un endroit que l'on nomme laboratoire. Mais je vous aime quand même...

A **Mathilde**, pour tout ton amour et ton soutien depuis ces nombreuses années. Jamais tout cela n'aurait été possible sans ta présence à mes côtés, merci d'avoir toujours cru en moi.

Merci à **Berlioz**, sans qui la vie serait quand même moins fun.

Et enfin...à **toi**, le petit bout qui verra le jour en cette année 2016...en espérant qu'un jour tu lises ces quelques lignes, et que cela te donne, pourquoi pas, la passion de la biologie médicale.

**L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen  
n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions  
émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 - 2016  
U.F.R. DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : Professeur Pierre FREGER  
 ASSESSEURS : Professeur Michel GUERBET  
 Professeur Benoit VEBER  
 Professeur Pascal JOLY  
 Professeur Stéphane MARRET

I – MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHO	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (surnombre)	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI communication	HCN	Informatique médicale et techniques de
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN (surnombre)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie-Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (surnombre)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE (surnombre)	HCN	Urologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie

Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie – Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUsETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Me Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr Jean-Christophe RICHARD (détachement)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Réanimation Médicale
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

#### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire



Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mme Rachel MARION-LETELLIER	UFR	Physiologie
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Christine RONDANINO	UFR	Physiologie de la Reproduction
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie

### PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

## II – PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON(PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX – NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL Toxicologie	
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEUIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEU	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER	Statistiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique

Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

### PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

### PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE	
Mme Sandrine DAHYOT	Bactériologie

### ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Souleymane ABDOUL-AZIZE	Biochimie
Mme Hanane GASMI	Galénique
Mme Caroline LAUGEL	Chimie organique
Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie

<b>LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES</b>
---

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR

Mr Jean-Loup HERMIL UFR Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel LEFEBVRE UFR Médecine Générale  
Mr Philippe NGUYEN THANH UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal BOULET UFR Médecine générale  
Mme Elisabeth MAUVIARD UFR Médecine générale  
Mme Yveline SEVRIN UFR Médecine générale  
Mme Marie Thérèse THUEUX UFR Médecine générale

### ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

#### PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med) Physiologie (ADEN)  
Mr Paul MULDER (phar) Sciences du Médicament  
Mme Su RUAN (med) Génie Informatique

#### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)  
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)  
Mme Carine CLEREN (med) Neurosciences (Néovasc)  
Mme Pascaline GAILDRAT (med) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)  
Mr Nicolas GUEROUT (med) Chirurgie Expérimentale  
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med) Physiologie (Unité Inserm 1076)  
Mr Frédéric PASQUET Sciences du langage, orthophonie  
Mme Isabelle TOURNIER (med) Biochimie (UMR 1079)

#### CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle  
CB - Centre Henri Becquerel  
CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME  
CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray  
SJ – Saint Julien Rouen

## Liste des abréviations

ADNr	ADN ribosomal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain-Heart infusion</i> (Bouillon Cœur-Cervelle)
BK	Bacille de Koch ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CIVD	Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
ETO	Echographie Trans-Œsophagienne
HSL	Homosérine Lactone
IV	Intra-Veineuse
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight mass spectrometry</i>
McF	Mc Farland
Méti-R	Résistant à la méticilline
Méti-S	Sensible à la méticilline
NR	Non Renseigné
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)
PIA	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesine</i>
PO	<i>Per Os</i>
PSMs	<i>Phenol-Soluble Modulins</i>
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SCC <i>mec</i>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SCN	Staphylocoques à Coagulase Négative
SLS	<i>Sample Loading Solution</i>
TS	Trypticase Soja
TSAB	Tryptone Soja au sang de mouton

# Table des matières

<b>1. Introduction.....</b>	<b>18</b>
<b>2. <i>S. saccharolyticus</i> et les staphylocoques à coagulase négative.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Classification des staphylocoques.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Le biofilm.....</b>	<b>21</b>
2.2.1. Biochimie et organisation structurale du biofilm .....	21
2.2.2. Biofilm et infections de bio-matériel .....	25
<b>2.3. Autres facteurs de virulence.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. Méthodes d'identification des staphylocoques à coagulase négative.....</b>	<b>30</b>
2.4.1. Galeries d'identification biochimique.....	30
2.4.2. Biologie moléculaire.....	32
2.4.2.1. L'ADNr 16S .....	32
2.4.2.2. Autres gènes d'intérêt.....	32
2.4.3. Spectrométrie de masse .....	34
<b>2.5. Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques des SCN.....</b>	<b>35</b>
<b>2.6. <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>, une espèce encore méconnue .....</b>	<b>37</b>
2.6.1. Ecologie de <i>S. saccharolyticus</i> .....	37
2.6.2. Aspects microscopiques et macroscopiques .....	37
2.6.3. Profil biochimique.....	37
2.6.4. Relations taxonomiques et études génomiques.....	39
2.6.5. Cas cliniques .....	43
2.6.6. Objectifs de ce travail.....	49
<b>3. Matériels et méthodes.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Recrutement des patients/prélèvements .....</b>	<b>50</b>
3.1.1. Cas index : Monsieur M.L.....	50
3.1.2. Autres patients .....	52
<b>3.2. Identification.....</b>	<b>53</b>
3.2.1. Caractères culturels, macroscopiques et microscopiques.....	53
3.2.2. Galeries d'identification biochimique et autres caractères biochimiques .....	53
3.2.3. Spectrométrie de masse .....	53
3.2.4. Biologie moléculaire.....	54
3.2.4.1. Choix des gènes et des amorces .....	54
3.2.4.2. Extraction et amplification par PCR .....	54
3.2.4.3. Réaction de séquence et séquençage .....	55

<b>3.3. Synthèse de biofilm .....</b>	<b>56</b>
3.3.1. Tests de croissance en milieux liquides.....	56
3.3.2. Synthèse de biofilm en bouillon TS glucosé à 1% .....	57
3.3.3. Synthèse de biofilm en bouillon Schaedler® .....	57
<b>3.4. Antibiogrammes.....</b>	<b>58</b>
<b>4. Résultats .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. Identification.....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Caractères culturels, macroscopiques et microscopiques.....	59
4.1.2. Galeries d'identification biochimique et autres caractères biochimiques .....	60
4.1.3. Spectrométrie de masse .....	64
4.1.4. Biologie moléculaire.....	64
<b>4.2. Synthèse de biofilm .....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Tests de croissance en milieux liquides.....	66
4.2.2. Synthèse de biofilm en bouillon TS glucosé à 1% .....	67
4.2.3. Synthèse de biofilm en bouillon Schaedler® .....	68
4.2.4. Synthèse des résultats.....	69
<b>4.3. Antibiogrammes.....</b>	<b>70</b>
<b>5. Discussion.....</b>	<b>71</b>
<b>6. Conclusion .....</b>	<b>78</b>
<b>7. Bibliographie.....</b>	<b>79</b>
<b>8. Annexes .....</b>	<b>85</b>

# Figures

Figure 1 : représentation graphique des découvertes de staphylocoques au cours du temps (nombre cumulé représenté graphiquement en bleu), de la fin du XIXème siècle à nos jours. Les noms figurant en rouge concernent les staphylocoques à coagulase positive, ceux figurant en bleu concernent les SCN. Sur les histogrammes, sont aussi représentées les espèces ayant été retirées ou transférées (violet), reclassifiées car appartenant avant à un autre genre (vert), validées avec certitude au rang d'espèce (rouge). D'après Becker et al. 2014 <sup>1</sup> .....	19
Figure 2 : Classification clinique et épidémiologique des staphylocoques en fonction du résultat de la coagulase et du pouvoir pathogène. D'après Becker et al. 2014 <sup>1</sup> .....	20
Figure 3: Cycle de développement et échanges métaboliques d'un biofilm bactérien. D'après Lebeaux et al. 2012 <sup>10</sup> .....	22
Figure 4 : comparaison des opérons <i>ica</i> présents chez <i>S. caprae</i> , <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> à l'opéron <i>ica</i> de <i>S. lugdunensis</i> . D'après Frank et al. 2007 <sup>13</sup> .....	23
Figure 5 : Biofilm de <i>S. lugdunensis</i> observé par microscopie électronique (à gauche x 1.800, à droite x 13.000) et se développant sur une surface siliconée. D'après Frank et al. 2007 <sup>13</sup> .....	24
Figure 6 : fréquence des germes incriminés dans les endocardites infectieuses sur dispositif cardiaque implantable. D'après Sohail et al. 2007 <sup>18</sup> .....	26
Figure 7 : Principales infections liées au matériel et associées au biofilm. D'après Lebeaux et al. 2012 <sup>10</sup> .....	27
Figure 8: Stimulateur ou défibrillateur cardiaque implantable inséré dans une enveloppe antibactérienne bio-absorbable. D'après A. Bouzeman, 2016 <sup>25</sup> .....	29
Figure 9 : Organisation des <i>SCCmec</i> conférant la résistance à la méticilline chez les staphylocoques. D'après Becker et al. 2014 <sup>1</sup> .....	36
Figure 10 : dendrogramme de la relation taxonomique entre <i>P. saccharolyticus</i> et d'autres espèces de staphylocoques basé sur l'étude de l'ADNr 16S. D'après Ludwig et al. 1981 <sup>62</sup> .....	42
Figure 11 : photographies thoraciques de face (à gauche) et de profil (à droite) de Monsieur M.L. lors de l'épisode de menace d'extériorisation du boîtier de défibrillateur .....	51
Figure 12 : aspect macroscopique des colonies de la souche de <i>S. saccharolyticus</i> du patient index sur gélose TSAB après 72h en anaérobiose à 37°C. ....	59

Figure 13 : aspect microscopique de la souche de <i>S. saccharolyticus</i> du patient index au grossissement x1000. Disposition des cocci à Gram positif, 1 : en amas, 2 : par paires, 3 : isolé, 4 : en tétrades.....	60
Figure 14 : photographie de la galerie API® 20A obtenue pour la souche CIP de <i>S. saccharolyticus</i> .....	61
Figure 15 : photographie de la galerie API® Staph pour la souche de <i>S. saccharolyticus</i> du patient index.....	63
Figure 16 : photographies des gels de migration révélant les bandes de fragments d'ADN amplifiés pour chaque gène ( <i>tuf 1</i> , <i>rpoB</i> , <i>sodA</i> , <i>tuf 2</i> , <i>gap</i> ) et pour chaque souche. Puits n°1 : 4582 n°2 : 3579 n°3 : 0138 n°4 : 2988 n°5 : CIP 103275T (-) : témoin négatif (+) : marqueur de poids moléculaire.....	64
Figure 17 : dendrogramme issu du séquençage 16S de la souche de <i>S. saccharolyticus</i> du patient index 3579.....	65
Figure 18 : dendrogramme issu du séquençage du gène <i>tuf</i> de la souche de <i>S. saccharolyticus</i> 4582.....	66
Figure 19 : histogrammes reflétant l'importance du biofilm produit par les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon TS glucosé à 1%.....	67
Figure 20 : histogrammes reflétant l'importance du biofilm produit par les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon Schaedler®.....	68
Figure 21 : histogrammes reflétant la production de biofilm selon les souches et les bouillons utilisés.....	69



# Tableaux

Tableau 1 : Profil du métabolisme biochimique de <i>S. saccharolyticus</i> selon les travaux de Foubert et Douglas, Westblom et al. et Evans et al <sup>58,60,57</sup> .....	38
Tableau 2 : Composition de la membrane et du peptidoglycane, type de cytochrome et composition en GC de l'ADN de certains staphylocoques et peptocoques dont <i>P. saccharolyticus</i> . D'après Kilpper et al. 1981 <sup>59</sup> .....	40
Tableau 3 : pourcentage d'homologie entre différentes espèces de staphylocoques et de streptocoques dont <i>P. saccharolyticus</i> , basé sur une technique d'hybridation de l'ADN. D'après Kilpper et al. 1980 <sup>61</sup> .....	41
Tableau 4 : Description de l'ensemble des <i>cases reports</i> impliquant <i>S. saccharolyticus</i> ... 45	
Tableau 5 : séquences d'amorces et références utilisées pour les gènes <i>tuf</i> , <i>rpoB</i> , <i>sodA</i> , <i>gap</i> et pour l'ADNr 16S. ....	54
Tableau 6 : résultats de l'identification des souches patients et CIP de <i>S. saccharolyticus</i> par galerie API® 20A. Le pourcentage d'identification estime la proximité relative du profil observé aux différents taxons de la base de données. La typicité exprime le caractère typique de la souche à l'intérieur d'un taxon. Sa valeur qui varie de 0 à 1 reflète le nombre de caractère biochimique à l'encontre.....	60
Tableau 7 : profil nécessaire pour l'identification la plus fiable d'un <i>S. saccharolyticus</i> par galerie API® 20A.....	61
Tableau 8 : résultats de l'identification des souches patients et CIP de <i>S. saccharolyticus</i> par galerie API® Staph. ....	62
Tableau 9 : profil des caractères biochimiques obtenus sur galerie API® Staph pour la souche de <i>S. saccharolyticus</i> du patient index. ....	63
Tableau 10 : résultats de l'identification des souches patients et CIP par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Un score supérieur à 2 avec une catégorisation en A correspond à une bonne identification de la souche au rang d'espèce.....	64
Tableau 11 : Résultats de l'identification des souches patients et CIP par biologie moléculaire via l'étude de l'ADNr 16S et des gènes <i>tuf</i> , <i>rpoB</i> et <i>gap</i> . ....	65
Tableau 12 : valeurs d'absorbance (DO) mesurées à 495 nm pour le test de synthèse de biofilm réalisé en triplicate sur les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon TS glucosé à 1%. ....	67

Tableau 13 : valeurs d'absorbance (DO) mesurées à 495 nm pour le test de production de biofilm réalisé en triplicate sur les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon Schaedler®.....	68
Tableau 14 : profils de sensibilité aux antibiotiques pour l'ensemble des souches de <i>S. saccharolyticus</i> de l'étude.....	70

## 1. Introduction

Les staphylocoques sont des germes connus depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle avec la découverte de *Staphylococcus aureus* et dont les études, notamment sur les nombreux staphylocoques à coagulase négative (SCN), n'ont cessé de croître de façon exponentielle jusqu'à ce jour (plus de 15 000 références pour « *coagulase negative staphylococci* » dans la base de données bibliographique PubMed) <sup>1</sup>.

Les facteurs de virulence responsables de la pathogénicité chez l'homme de certains de ces SCN sont aujourd'hui connus, le principal étant la production de biofilm, qui est par exemple très impliquée dans la pathogénicité de *Staphylococcus lugdunensis*. Pour d'autres SCN le pouvoir pathogène s'exprime avec un tropisme particulier pour un ou plusieurs sites anatomiques tel que le tractus génito-urinaire pour *Staphylococcus saprophyticus* <sup>1</sup>. Les staphylocoques peuvent en outre poser des problèmes de résistance aux antibiotiques dont certains mécanismes, tels que la résistance à la méticilline, ont été fréquemment rapportés et peuvent mettre les cliniciens et microbiologistes face à des difficultés thérapeutiques ou épidémiologiques <sup>2</sup>. La diversité des SCN, tant en terme de virulence que de résistance, se rapporte souvent à leur espèce et justifie donc une identification la plus fiable et rapide possible, ce qui a longtemps constitué un réel défi technique.

Parmi les SCN, *Staphylococcus saccharolyticus* est un germe peu étudié avec de très rares études dans la littérature. Il n'est pas considéré comme appartenant à un groupe virulent ou ayant un tropisme particulier générant des infections spécifiques. Seuls quelques rares *cases reports* indiquent des cas d'infections à *S. saccharolyticus* mais ces cas n'ont pas entraîné d'études de la bactérie ni de son pouvoir pathogène. Le présent travail, dont le point de départ a été un cas clinique du service de cardiologie de notre établissement, s'intéresse spécifiquement à *S. saccharolyticus*, et tente d'aborder plusieurs aspects de cette espèce méconnue : les difficultés de son identification, sa pathogénicité et sa virulence, et sa résistance aux antibiotiques.

La première partie de notre introduction rappellera les principales caractéristiques des staphylocoques à coagulase négative : leurs techniques d'identification, leur virulence principalement liée à la production de biofilm, et leur résistance aux antibiotiques, notamment aux bêta-lactamines. La seconde partie de cette introduction s'intéressera spécifiquement à *S. saccharolyticus* : son écologie, ses caractéristiques bactériologiques, sa taxonomie et les cas cliniques publiés à ce jour.

## 2. *S. saccharolyticus* et les staphylocoques à coagulase négative

### 2.1. Classification des staphylocoques

Les SCN sont des cocci à Gram positif se différenciant de *S. aureus* qui possède, outre la fabrication d'un pigment doré, la propriété de coaguler le plasma <sup>3</sup>. La figure ci-dessous montre qu'il existe actuellement 47 espèces et 23 sous-espèces de staphylocoques, découvertes en majorité ces 20 dernières années grâce aux nouvelles méthodes d'identification, et ayant des implications variables en terme de pathogénicité chez l'homme. *S. epidermidis* reste à ce jour le SCN le plus fréquemment isolé en médecine humaine <sup>1</sup>.

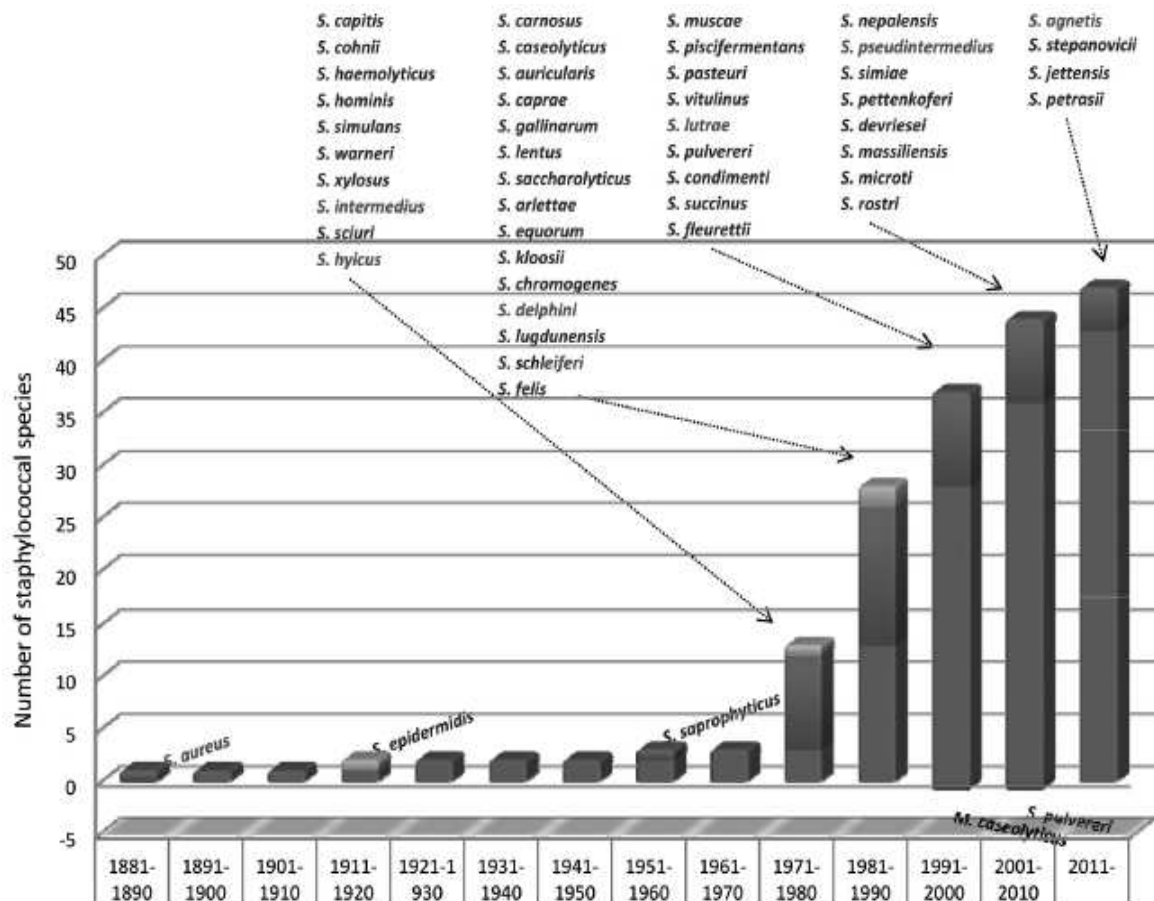


Figure 1 : représentation graphique des découvertes de staphylocoques au cours du temps (nombre cumulé représenté graphiquement en bleu), de la fin du XIXème siècle à nos jours. Les noms figurant en rouge concernent les staphylocoques à coagulase positive, ceux figurant en bleu concernent les SCN. Sur les histogrammes, sont aussi représentées les espèces ayant été retirées ou transférées (vert), reclassifiées car appartenant avant à un autre genre (vert), validées avec certitude au rang d'espèce (rouge). D'après Becker et al. 2014 <sup>1</sup>.

La classification des staphylocoques, séparés en deux grands groupes puis sous-groupes, est basée de nos jours sur leurs propriétés pathogènes : *S. aureus*, coagulase positive et considéré comme pathogène, et les SCN dont seulement certains sont considérés pathogène. Dans ce groupe, *S. saprophyticus* est par exemple remarquable par son tropisme pour le tractus génito-urinaire <sup>1</sup>. Environ 7% des femmes sont colonisées par ce germe qui représente le deuxième pathogène le plus fréquemment impliqué dans les infections du tractus urinaire chez la femme jeune en âge de procréer <sup>4,5</sup>. Ce pouvoir infectieux est favorisé par la localisation préférentielle de la colonisation de *S. saprophyticus*, dépendante de l'âge et des saisons, qui se situe dans le tractus génito-urinaire et le rectum <sup>6</sup>. Autre SCN reconnu comme étant virulent et découvert plus récemment, *S. lugdunensis* dispose d'un profil de virulence important responsable entre autres d'endocardites infectieuses, avec une mortalité de 38,8% à 78%, ou d'infections sur matériel implanté très sévères <sup>1</sup>.

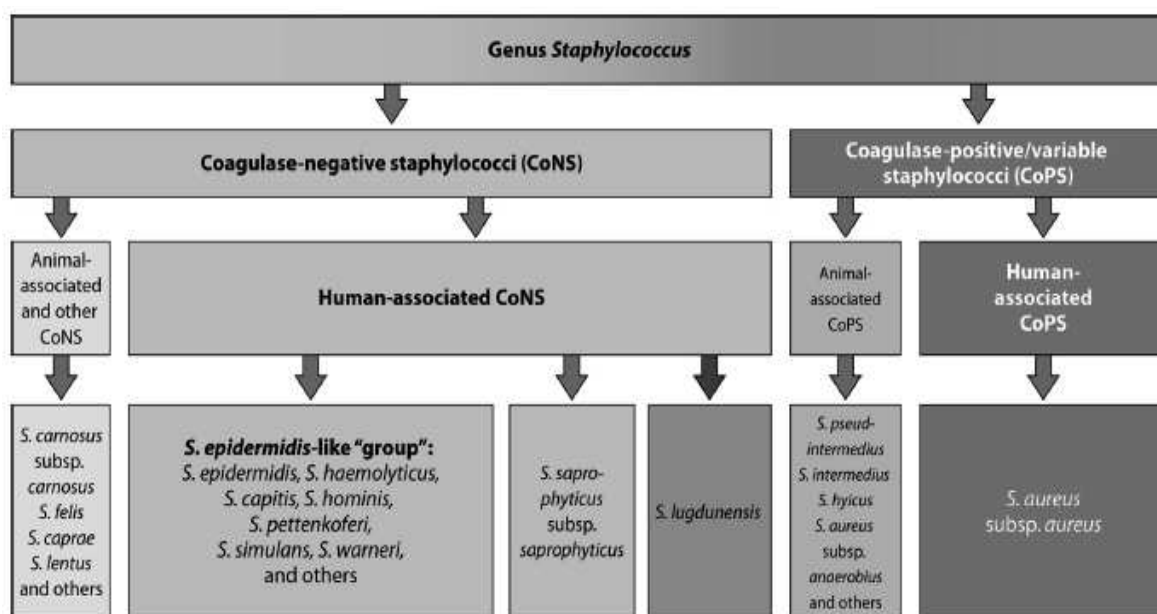


Figure 2 : Classification clinique et épidémiologique des staphylocoques en fonction du résultat de la coagulase et du pouvoir pathogène. D'après Becker et al. 2014 <sup>1</sup>.

La barrière cutanéomuqueuse, plus vaste organe du corps humain, constitue le principal réservoir de SCN. Ce site anatomique, colonisé par de nombreux genres bactériens, forme un habitat hétérogène pour ces bactéries du fait de la présence de muqueuses, de glandes, de follicules pileux ou de niches écologiques qui diffèrent en fonction de la localisation telles que les fosses nasales ou les plis axillaires <sup>7</sup>.

## 2.2. Le biofilm

La pathogénicité de la plupart des SCN repose principalement sur la synthèse d'un polysaccharide bactérien appelé biofilm, expliquant que les infections les plus fréquemment rencontrées, détaillées dans les paragraphes suivants, soient des infections chroniques et des infections de bio-matériel.

### 2.2.1. Biochimie et organisation structurale du biofilm

Déjà étudié quelques années auparavant dans la colonisation des canalisations ou des coques de bateaux, le biofilm a été décrit dans les années 1980 et 1990 lors de la prise de conscience de sa forte implication en pathologie humaine. Il fut défini comme une communauté de bactéries adhérant à une surface inerte ou vivante et ancrée dans une matrice d'exo-polysaccharide <sup>8,9</sup>. Il existe à ce jour de nombreuses espèces bactériennes possédant la capacité de produire du biofilm dans leur arsenal de facteurs de virulence. Les plus souvent incriminés sont les staphylocoques (*S. aureus* et *S. epidermidis*) ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* <sup>9</sup>.

Le mécanisme désormais bien connu de développement de ce biofilm est scindé en quatre grandes étapes représentées schématiquement dans la figure ci-dessous <sup>1,9,10</sup> :

- 1 - une phase d'attachement des bactéries planctoniques sur la surface du matériel ou la paroi du tissu cible.
- 2 - une phase d'accumulation des bactéries en plusieurs couches donnant naissance à des microcolonies.
- 3 – une phase de maturation des bactéries formant ainsi la structure du biofilm.
- 4 - une dernière phase de détachement et dispersion sous forme d'embols ou de bactéries planctoniques responsables de la dissémination métastatique de l'infection.

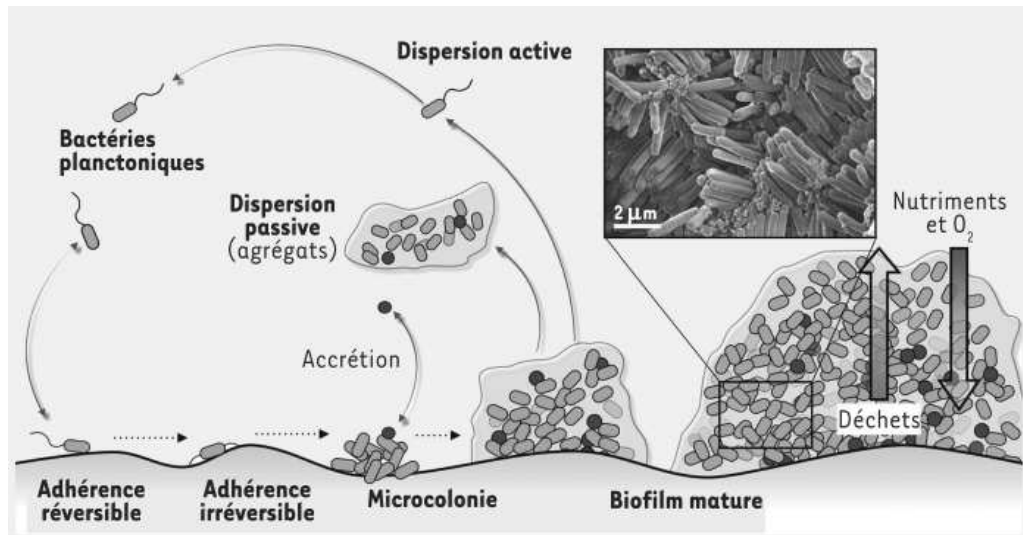


Figure 3: Cycle de développement et échanges métaboliques d'un biofilm bactérien. D'après Lebeaux et al. 2012<sup>10</sup>.

La phase d'adhésion des bactéries planctoniques sur le matériel implanté ou le tissu biologique est conditionnée par de nombreuses interactions physico-chimiques. Elles regroupent les forces de polarité, de Van der Waal's ou d'interactions hydrophobes et sont médiées par divers acteurs chimiques telles que les protéines d'association de surface, dont les autolysines Atl font partie <sup>1,11</sup>. Ces dernières sont les plus répandues chez les staphylocoques et ont été décrites en premier lieu chez *S. epidermidis* (AtlE) et *S. aureus* (Atl), et plus récemment chez plusieurs autres espèces de SCN : *S. caprae* (AtlC), *S. saprophyticus* (Aas), *S. lugdunensis* (AtlL) ou encore *S. warneri* (AtlWM). La fonction enzymatique de ces autolysines permet l'adhérence initiale des bactéries sur la surface cible via une liaison au peptidoglycane et faisant intervenir les acides teichoïques <sup>1</sup>. La protéine Bap (*Biofilm-Associated Protein*), découverte chez *S. aureus* lors d'études sur les mammites bovines, est aussi un partenaire majeur dans cette phase d'adhérence. Comme pour Atl, des études ont démontré par la suite la présence de protéines homologues (*Bap-Homologous Protein*) chez d'autres staphylocoques <sup>1,11</sup>. D'autres protéines interagissant par reconnaissance de molécules de l'hôte et ayant un rôle dans cette première phase de formation du biofilm ont été regroupées dans la famille des MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), avec par exemple la protéine Fbe (*Fibrinogen binding protein*) chez *S. epidermidis*, très proche du *Clumping factor* de *S. aureus* <sup>1</sup>. Les molécules servant de récepteurs bactériens chez l'hôte et facilitant l'adhérence des bactéries sur le matériel médical implanté sont : le fibrinogène, la fibronectine, le collagène, la vitronectine, la thrombospondine, la laminine ou encore le facteur von Willebrand <sup>1,11,12</sup>. Enfin, cette première phase d'adhésion est dépendante d'un second messenger appelé di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc), une petite

molécule diffusible dont la concentration intracellulaire est régulée par des signaux environnementaux et qui permet de moduler l'expression de gènes impliqués dans la formation du biofilm <sup>10</sup>.

Les étapes d'accumulation et de maturation font elles aussi intervenir de nombreux acteurs moléculaires afin de multiplier et d'accumuler les bactéries sur plusieurs strates au niveau du tissu ou matériel cible en favorisant l'adhésion intercellulaire <sup>11</sup>. La protéine Atl, indispensable pour initier la phase d'adhérence décrite précédemment, est aussi nécessaire pour la prolifération et l'adhésion intercellulaire <sup>1</sup>. La médiation de ces processus est régie par l'expression d'opérons, dont *icaABCD* est l'un des plus connus et étudiés à ce jour comme le montre la figure ci-dessous. Son expression régule notamment la synthèse des adhésines PIA (*Polysaccharide Intercellular Adhesine*), composantes de la matrice extracellulaire et ayant un rôle majeur dans l'accumulation du biofilm chez les staphylocoques <sup>11,13,14</sup>. En effet, l'étude de bactéries dépourvues du locus *ica* a montré leur perte de capacité à former du biofilm ou à produire des PIA <sup>15</sup>. Cependant, quelques études ont aussi démontré chez *S. aureus* et *S. epidermidis* une formation de biofilm indépendante de la présence du locus *ica* <sup>16</sup>.

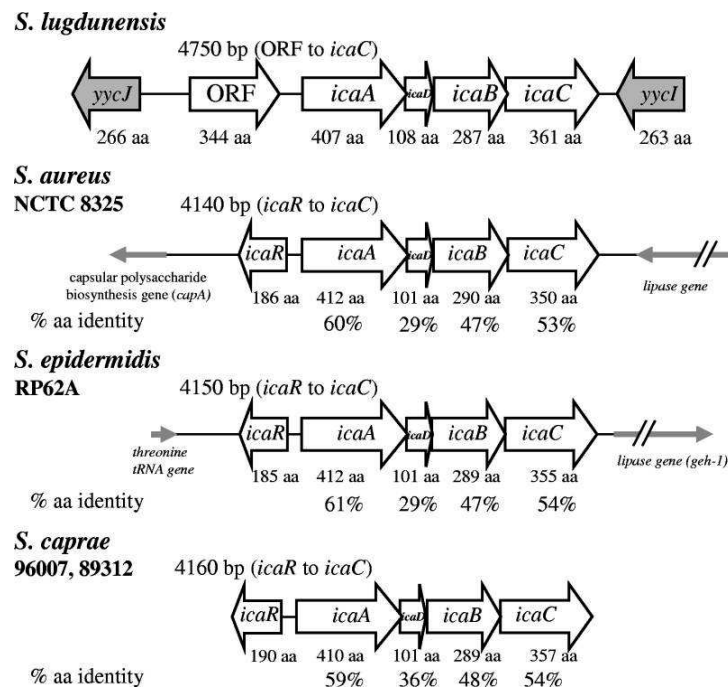


Figure 4 : comparaison des opérons *ica* présents chez *S. caprae*, *S. epidermidis* et *S. aureus* à l'opéron *ica* de *S. lugdunensis*. D'après Frank et al. 2007 <sup>13</sup>.



La structure du biofilm semble aussi pouvoir être modulée par la résistance à la méticilline, comme le suggèrent des travaux récents sur *S. aureus*. Les souches sensibles à la méticilline utiliseraient les voies classiques de formation du biofilm en recrutant l'opéron *ica* et les PIA, tandis que les souches résistantes à la méticilline développeraient un biofilm indépendamment d'*ica* et des PIA mais en recrutant des protéines de surface telles que la *fibronectin binding protein* ainsi que des médiateurs comme Atl ou l'ADN extracellulaire. Les structures des deux biofilms formés sont alors différentes sur le plan moléculaire et microscopique <sup>16</sup>.

Les voies de communication entre bactéries ont été initialement décrites chez le bacille Gram négatif *via* la production d'acyl-homosérine lactones (HSL) sous le nom de *quorum sensing*. Ce mode de régulation est basé sur une production croissante d'HSL par les bactéries en fonction de l'accumulation de ces dernières. Il permet alors, lorsqu'un certain seuil de production d'HSL est atteint, de déclencher l'activation de gènes cibles responsables de la formation du biofilm <sup>8</sup>. Chez *S. aureus*, le système de *quorum sensing* est porté par le locus *agr* (*accessory gene regulator*) <sup>14</sup> et les molécules sécrétées ne sont pas des HSL mais de petits peptides qui induisent la réponse phénotypique collective lorsque le seuil de concentration est atteint <sup>10,14</sup>.

La formation du biofilm donne naissance à une structure tridimensionnelle compacte de bactéries enchâssées dans une matrice extracellulaire <sup>10</sup> comme en témoignent les photos suivantes <sup>13</sup> obtenues en microscopie électronique.

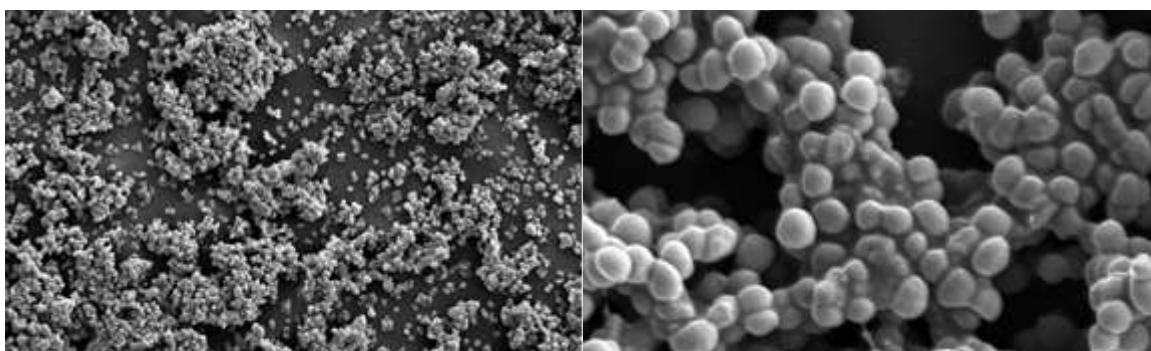


Figure 5 : Biofilm de *S. lugdunensis* observé par microscopie électronique (à gauche x 1.800, à droite x 13.000) et se développant sur une surface silicée. D'après Frank et al. 2007 <sup>13</sup>.

Au cours du cycle de développement du biofilm (Fig. 3), l'agglomérat conduit à l'apparition d'un gradient d'oxygène et de nutriments depuis la surface du biofilm jusqu'en son cœur où l'environnement devient anaérobie, avec accumulation de déchets et raréfaction des nutriments. Cependant, il existe un réseau de canaux aqueux permettant la

circulation de l'oxygène et des nutriments jusqu'aux bactéries enfouies et l'évacuation des déchets qu'elles produisent. Ces constatations suggèrent que l'état métabolique des bactéries au sein du biofilm varie en fonction de leur localisation <sup>8,10</sup>.

Enfin, la dernière étape de ce processus concerne la dispersion du biofilm. Ce phénomène peut se dérouler selon deux modes distincts, (Fig. 3): les bactéries peuvent être libérées par fragments sous forme d'embols passifs, mais peuvent aussi se dissocier du biofilm sous une forme planctonique isolée <sup>10</sup>. Ces bactéries seront donc libérées dans la circulation sanguine, favorisant la dissémination métastatique de l'infection du fait de leur disponibilité pour former un biofilm dans un autre site <sup>1</sup>. La désintégration du biofilm est engendrée par deux grands mécanismes utilisant, pour le premier, une activité enzymatique extracellulaire, et pour le second, les molécules de *phénol-soluble modulins* (PSMs) <sup>1</sup>.

### **2.2.2. Biofilm et infections de bio-matériel**

Grace au progrès médical et du fait du vieillissement de la population, le recours aux dispositifs médicaux a considérablement augmenté ces dernières années. Par exemple, le nombre d'implants et prothèses utilisés chaque année aux Etats-Unis est de l'ordre de 5 millions, générant autant de risques d'infection et contribuant fortement à l'augmentation des infections nosocomiales <sup>10,11</sup>. Ce nombre ne va cesser de s'accroître ces prochaines années, ainsi le nombre d'interventions pour prothèses de hanches et genoux aux Etats-Unis d'ici 2030 devrait excéder 3,5 millions <sup>17</sup>. Outre le problème de santé publique, ces infections ont un impact économique direct très important. En effet, le coût imputable aux seules bactériémies sur infection de cathéters centraux est estimé aux Etats-Unis entre 296 millions et 2,3 milliards de dollars US <sup>11</sup>.

Les germes incriminés sont très variés mais les staphylocoques demeurent les pathogènes les plus représentés dans ce type d'infections, et tout particulièrement *S. epidermidis*, majoritairement retrouvé dans ces situations, suivi de *S. aureus*. Cette épidémiologie est valable pour les dispositifs cardiaques implantables, comme en témoigne la répartition des germes responsables de ces infections présentée ci-dessous <sup>1,18</sup>.

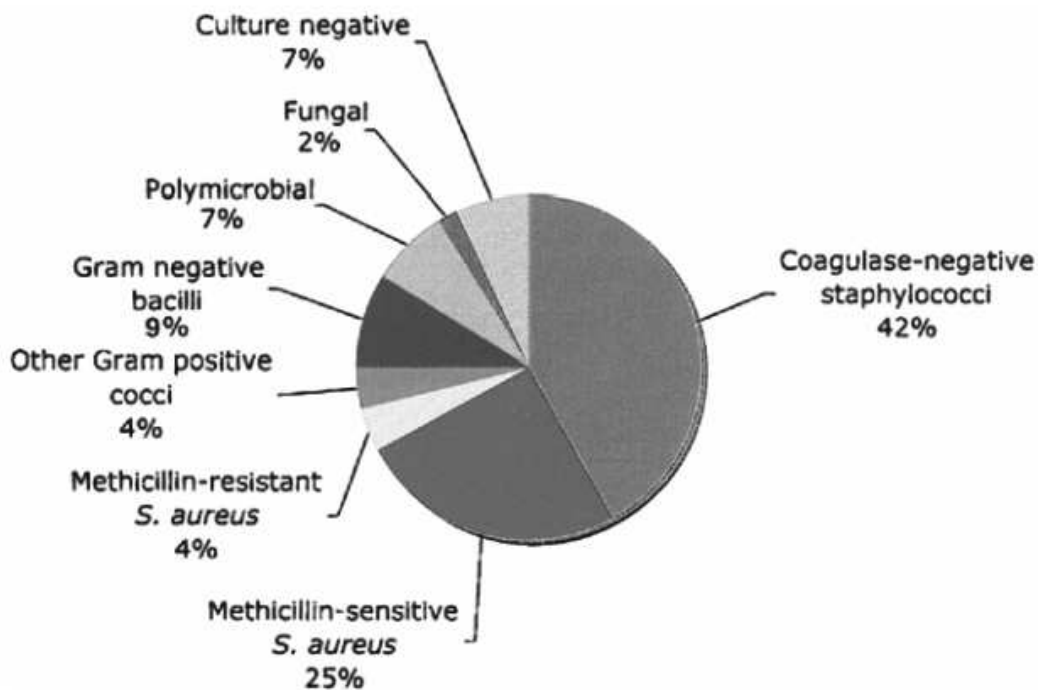


Figure 6 : fréquence des germes incriminés dans les endocardites infectieuses sur dispositif cardiaque implantable. D'après Sohail et al. 2007<sup>18</sup>.

De fait, les infections liées aux dispositifs médicaux implantés représentent la première cause d'infection à SCN<sup>1</sup>. L'un des premier cas, décrit au début des années 1980, fut celui d'une infection de stimulateur cardiaque à *S. aureus* chez un patient ayant fait plusieurs épisodes successifs de bactériémies. Le retrait du dispositif et son étude par microscopie électronique permit alors de révéler la présence d'un biofilm bactérien<sup>19</sup>. Le biofilm se développe préférentiellement sur des tissus morts ou des surfaces inertes tels que les dispositifs médicaux, mais peut aussi se greffer sur du tissu vivant comme dans le cas des endocardites<sup>9</sup>. Comme l'indique la figure ci-dessous<sup>10</sup>, deux types d'infections engendrées par le biofilm sont donc distinguables : les infections liées au matériel avec un développement sur une surface inerte (prothèses, sondes urinaires, cathéters...) et les infections chroniques de tissus vivants (endocardites infectieuses, pneumopathies du patient atteint de mucoviscidose...).

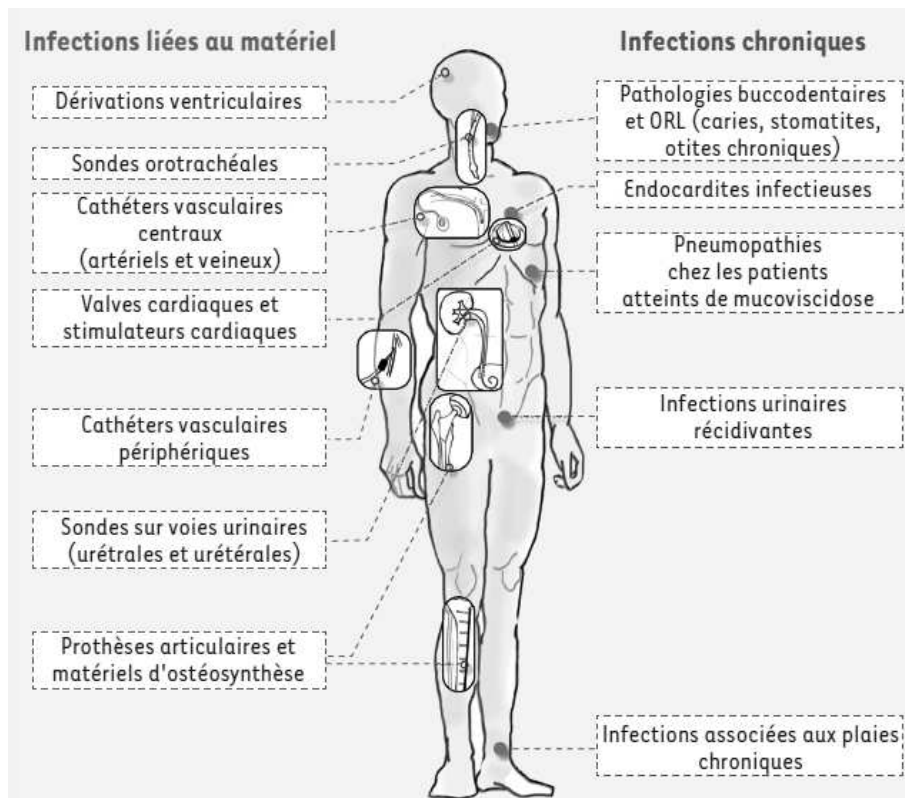


Figure 7 : Principales infections liées au matériel et associées au biofilm. D'après Lebeaux et al. 2012 <sup>10</sup>.

La formation d'un biofilm en surface d'un dispositif médical est consécutive à une simple contamination initiale mais peut conduire à une bactériémie secondaire <sup>10</sup>. Par conséquent, en France, environ 45% des bactériémies nosocomiales sont imputables à une porte d'entrée liée à un dispositif invasif, et 20% directement liées aux seuls cathéters et chambres implantables <sup>20</sup>. Les endocardites sur dispositifs cardiaques implantables représentent une part importante des infections sur bio-matériels, avec une incidence annuelle de 55 et 65/100 000, intermédiaire entre celle de l'endocardite sur valve native (30/100 000/an) et celle de l'endocardite sur valve prothétique (300/100 000/an) <sup>21,22</sup>. Plusieurs types d'infections sur dispositif cardiaque implantable sont observés : l'infection non compliquée de la loge du boîtier sans signes généraux (hémocultures négatives), l'infection compliquée de la loge du boîtier se traduisant cliniquement par des signes généraux (avec hémocultures positives), l'infection sur sonde avec signes cliniques généraux mais sans atteinte de la loge du boîtier, et enfin l'endocardite vraie avec atteinte valvulaire détectée par l'échocardiographie chez un patient avec un dispositif implanté <sup>23</sup>. Dans toutes ces circonstances le matériel retiré génère des cultures bactériennes positives. Cependant, une récente étude décrit un phénomène de colonisation de matériel implanté sans aucun signe clinique d'infection. Cette simple colonisation, objectivée sur les

dispositifs retirés pour remplacement de boîtier ou révision de sondes, concernerait environ un tiers des patients. Elle peut naturellement engendrer une infection (7,5% des cas) avec le même germe que celui de la colonisation <sup>24</sup>.

Les bactéries présentes au sein du biofilm présentent une tolérance particulière aux agressions extérieures telles que les antibiotiques, les agents physiques (ultraviolets) ou chimiques (acides, métaux lourds...) notamment dans le milieu industriel. En effet, les nombreuses modifications génétiques et physiologiques des bactéries en biofilm réduisent l'impact des agents extérieurs. A ces modifications s'ajoute la diffusion réduite des antibiotiques par défaut de pénétration de la matrice extracellulaire et le ralentissement métabolique limitant l'action des antibiotiques actifs en phase de croissance. En outre, l'un des mécanismes les plus importants serait la présence de bactéries persistantes (*persisters cells*), échappant au système immunitaire et aux antibiotiques. A l'arrêt de l'antibiothérapie, ces bactéries dormantes peuvent constituer un nouveau biofilm, causant une récurrence clinique. Tous ces mécanismes rendent donc ces bactéries différentes de leurs congénères présentes sous forme planctonique, mais cet état a été décrit comme transitoire et réversible, laissant la possibilité au pathogène de revenir à son état initial <sup>9,10</sup>.

Face à l'accroissement de l'utilisation de matériels médicaux et donc du développement de biofilm chez les patients concernés, différents moyens de lutte ont été proposés. Outre les mesures d'hygiène préventives et le retrait du matériel, de nombreuses mesures basées sur l'utilisation des antibiotiques ont été développées <sup>1,10,11</sup>. Ces antibiothérapies peuvent être administrées par voie systémique classique, par voie locale sous forme de verrous de manière préventive ou curative, ou encore par imprégnation directe du dispositif médical <sup>10,25</sup>. Les techniques d'imprégnation concernent principalement les cathéters centraux et les implants orthopédiques <sup>10</sup>, et peuvent utiliser des antibiotiques, des agents désinfectants ou antiseptiques, ou encore des ions métalliques<sup>11</sup>. Certains implants cardiaques peuvent aussi être insérés dans une enveloppe antibactérienne <sup>25</sup>, comme le montre la Figure 8. Cette approche est principalement efficace pour les dispositifs de courte durée ou pour la prévention per-opératoire ou post-opératoire précoce <sup>10</sup>, du fait d'un relargage de l'anti-infectieux limité à quelques jours.

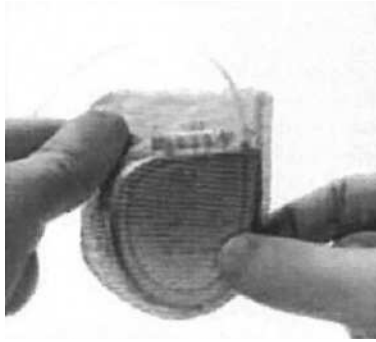


Figure 8: Stimulateur ou défibrillateur cardiaque implantable inséré dans une enveloppe antibactérienne bio-absorbable. D'après A. Bouzeman, 2016 <sup>25</sup>.

Différentes études rétrospectives et prospectives ont démontré l'efficacité de ces enveloppes, qui peuvent être bio-absorbables. Chez les patients porteurs de tels dispositifs les taux d'infections varient de 0% à 0,5% pour des durées de suivi de 2 mois à 2 ans, contre 3% dans les groupes contrôles <sup>25</sup>. Enfin, les caractéristiques physico-chimiques des matériaux entrant dans la composition du dispositif semblent impacter directement la formation du biofilm, et leur choix permet donc de réduire le risque infectieux. Ainsi, des travaux menés sur différentes valves cardiaques en carbone pyrolytique ont démontré que la rugosité et l'énergie libre de surface (somme des forces de dispersion et forces polaires) des prothèses influençaient la phase d'adhésion dans la formation du biofilm, dans un modèle de bioréacteur *in vitro*, pour *S. epidermidis* et *P. aeruginosa*, mais pas pour *S. aureus* <sup>26</sup>.

### 2.3. Autres facteurs de virulence

La virulence par production de toxine, bien que majoritairement décrite chez *S. aureus*, peut être également observée chez certains SCN qui produisent des toxines cytolytiques appelées PSMs (*Phénol-Soluble Modulins*) induisant le détachement et la dissémination du biofilm. En revanche, les toxines exfoliatives ou superantigéniques ne semblent exister que chez *S. aureus* et n'ont jamais été décrites chez les SCN <sup>1</sup>. Ces derniers possèdent néanmoins de nombreux autres facteurs de virulence pouvant majorer leur pathogénicité, tels que l'internalisation et la persistance dans les cellules hôtes, les interférences avec le système immunitaire du sujet infecté, la faculté de régulation lors de processus pathogènes ou la capacité de sécrétions de lantibiotiques (*antibiotic-like* ou *lanthionine-containing antibiotic peptides*) <sup>1</sup>. L'internalisation dans les cellules hôtes est un mécanisme bien connu chez *S. aureus* et utilisé par certains SCN tel que *S. epidermidis* afin d'échapper aux défenses immunitaires mises en place par l'organisme infecté ou aux

éventuels traitements antibiotiques administrés. Cette internalisation s'opère dans les phagocytes dits « non professionnels » des cellules hôtes *via* la présence d'adhésines ou autolysines Atl et AtlE, ainsi que par la protéine Hsc70 (*heat shock cognate protein 70*). Chez les mutants *atl/atlE* ou *hsc70* inactivés l'internalisation du pathogène est fortement altérée et le rend donc accessible pour sa destruction dans le milieu extracellulaire<sup>1,27</sup>. De même que l'internalisation, la persistance intracellulaire a été décrite plus largement chez *S. aureus* mais ce mécanisme existe aussi chez de nombreux bacilles à Gram négatif ou cocci à Gram positif tels que *S. epidermidis*. Ce mécanisme concerne quelques bactéries du foyer infectieux capables de modifier leurs fonctions métaboliques afin de survivre en état de latence ou de persistance dans le milieu intracellulaire pour échapper aux défenses de l'hôte ou aux antibiothérapies<sup>1</sup>. Ces bactéries survivantes sont appelées *Small Colony Variant* (SCV). D'autres mécanismes permettent aux SCN d'interférer avec le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, les acides teichoïques ou le peptidoglycane, composants majeurs de la paroi bactérienne, peuvent stimuler la production de molécules pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-1 et IL-6) par les monocytes<sup>1,28</sup>. La production extracellulaire de certaines enzymes, telles que des lipases ou protéases, permet également aux SCN d'échapper au système immunitaire et d'envahir les tissus de l'hôte par inactivation ou destruction de certaines protéines de défense<sup>1</sup>. Enfin, les lantibiotiques, appartenant à la classe des peptides cationiques antimicrobiens (CAMPs), sont des molécules synthétisées par certains SCN et ayant une action contre les bactéries à Gram positif, déséquilibrant la flore locale au profit des SCN. Parmi ces molécules, l'epidermine sécrétée par *S. epidermidis* ou la gallidermine sécrétée par *S. gallinarum* présentent un potentiel intérêt thérapeutique<sup>1,29</sup>.

## 2.4. Méthodes d'identification des staphylocoques à coagulase négative

### 2.4.1. Galeries d'identification biochimique

Les infections à SCN sont très fréquentes, notamment en milieu hospitalier. La virulence, l'antibio-résistance et l'épidémiologie variant selon les espèces, le laboratoire doit pouvoir réaliser quand cela est nécessaire une identification fiable au rang d'espèce. Avant l'essor des techniques de biologie moléculaire ou de spectrométrie de masse, l'identification était basée sur un ensemble de caractères biochimiques, associés aux caractères culturels et au profil de sensibilité aux antibiotiques, propres à chaque espèce. Le premier arbre décisionnel d'identification fut proposé au milieu des années 1970 par

Kloos et Schleifer et resta pendant de nombreuses années la méthode de référence. Il permettait une identification relativement bonne des SCN, de l'ordre de 80 à 90%, mais relevait de techniques très lourdes à mettre en œuvre (réalisation de 13 tests unitaires comprenant la coagulase, l'hémolyse, la réduction du nitrate, la fermentation de certains sucres...) <sup>6</sup>.

Les galeries d'identification biochimique commerciales, permettant d'identifier les SCN par un panel de tests biochimiques standardisés, ont supplanté la technique de référence de Kloos et Schleifer. Différents kits ont été commercialisés, tels que les galeries API® Staph, ID32® Staph et Rapidec® Staph (BioMérieux®) ou des techniques semi-automatisées telles que le système Vitek® (BioMérieux®), le Pos ID Panel® (Siemens Healthcare Diagnostics®), le kit BBL Crystal Rapid Gram-Positive ID® (BD Diagnostic Systems®) ou le système Phoenix® (BD Diagnostic Systems®)<sup>1</sup>. En plus des tests purement biochimiques, des mesures de sensibilité à certains composants antibiotiques, tels que la bacitracine, l'optochine ou la novobiocine, sont parfois utilisés afin d'optimiser l'identification <sup>30,31</sup>. Ces différentes techniques permettent une bonne identification des espèces de SCN d'importance clinique significative, atteignant 95% pour *S. epidermidis* ou *S. haemolyticus* et 100% pour *S. saprophyticus*. Cependant, d'autres espèces de moindre impact clinique demeurent mal identifiées avec des scores compris entre 61 et 82% selon les kits <sup>30,32,33,34</sup>. Des techniques d'identification artisanales utilisant un nombre restreint de caractères et permettant l'obtention de résultats très rapides, en 4 heures, ont été proposées<sup>35</sup>. Leur performance, avec un taux d'identification de 97,5% et 100%, était supérieure à celle de la galerie API® Staph, mais elles n'ont jamais été commercialisées<sup>35,36,37</sup>.

L'espèce *S. saccharolyticus* est particulière au sein du genre car il s'agit du seul staphylocoque anaérobie strict. D'une façon générale, l'identification des bactéries anaérobies relève de galeries biochimiques spécifiques telles que la galerie API® 20A (BioMérieux®) ou le système RapID® ANA (Innovative Diagnostic Systems®), qui incluent *S. saccharolyticus* dans leurs bases de données. Cependant, les études d'évaluation de ces techniques incluent principalement les espèces *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, et non des staphylocoques. Leurs performances se situent, selon les kits, entre 50 et 74% de bonnes identifications <sup>38</sup>.



## 2.4.2. Biologie moléculaire

### 2.4.2.1. L'ADNr 16S

L'arrivée de la biologie moléculaire et notamment les techniques de PCR et de séquençage dans les années 80 ont considérablement contribué à l'évolution de la taxonomie bactérienne. D'une façon générale, le séquençage d'un fragment de gène conduit à l'élaboration d'un arbre appelé dendrogramme et génère des grappes génétiques d'espèces bactériennes appelées *clusters* : au sein d'un *cluster* les nœuds séparant les espèces comportent une valeur appelée *bootstrap*, représentant la probabilité qu'un nœud soit correct au sein du dendrogramme et que la séparation taxonomique entre espèces soit fiable. On considère généralement que deux espèces sont bien séparées lorsque cette valeur est supérieure à 95%. La PCR 16S, parfois appelée « PCR universelle », amplifie un fragment d'ADN codant pour l'ARN 16S ribosomal, afin de le purifier et de le séquencer. Ce gène a été l'un des premiers utilisés pour l'identification bactérienne du fait de la rareté de ses mutations, offrant une séquence spécifique pour de nombreuses espèces. Les bases de données génomiques se sont donc largement enrichies de ces séquences pour toutes les espèces de staphylocoques connues et ont permis d'établir une taxonomie basée sur les relations phylogénétiques entre les différentes espèces. L'arbre phylogénétique obtenu grâce à cette méthode permet de distinguer 12 *clusters*, donnant des résultats très proches de ceux fournis par les techniques d'hybridation ADN-ADN <sup>39</sup>. Cependant le pouvoir discriminant de cette technique s'est révélé rapidement trop faible pour une identification optimale des SCN en routine en raison d'une forte homologie entre certaines espèces (environ 98%) <sup>40</sup>. Ainsi, cette technique peut engendrer plus de 15% d'erreurs d'identification <sup>41</sup>.

### 2.4.2.2. Autres gènes d'intérêt

Le séquençage d'autres gènes présents chez tous les staphylocoques, et souvent relativement bien conservés, a permis d'enrichir l'arsenal d'identification moléculaire<sup>1,40,41,42,43,44,45,46</sup>. Ces gènes sont les suivants :

- *gap* (codant pour la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase)
- *sodA* (codant pour la manganese-dependent superoxide dismutase)
- *rpoB* (codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase)
- *tuf* (codant pour le facteur d'élongation TU)

- *hsp60* (codant pour la protéine de choc thermique de 60 kDa)
- *dnaJ* ou *hsp40* (codant pour la protéine de choc thermique de 40 kDa)

Le séquençage de ces différents gènes permet une discrimination des espèces de staphylocoques supérieure à celle de l'ADNr 16S, en raison notamment d'une homologie plus faible entre les espèces. Par exemple, le séquençage de 85% du gène *sodA* ne révèle que 81.5% d'homologie entre les espèces, tandis que l'ADNr 16S atteint 98% d'homologie. Cette méthode offre donc une identification fiable pour de nombreuses souches non-identifiées ou mal identifiées par les méthodes basées sur les caractères biochimiques en galerie <sup>42</sup>. Le séquençage partiel du gène *rpoB*, qui révèle des homologies de l'ordre de 86%, s'avère également plus discriminant que celui de l'ADNr 16S. L'arbre phylogénétique obtenu fait apparaître 9 *clusters* ayant plus de 85% d'homologie entre eux, mais seulement 5 groupes avec des valeurs de *bootstrap* supérieures à 70% <sup>43</sup>. Le gène *tuf* permet également d'obtenir de très bons résultats, avec seulement 2% d'erreurs ou d'échecs d'identification <sup>41,44</sup>. Cette méthode est d'ailleurs beaucoup plus performante que la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) évoquée plus loin, qui génère parfois plus de 20% d'erreurs. Le séquençage du gène *tuf* assure donc une meilleure discrimination entre les différentes espèces de SCN, permettant par exemple la séparation des espèces *capitis* et *caprae*, impossible avec l'ADNr 16S. De même, les espèces *warneri* et *pasteuri*, sont discriminées par le séquençage des gènes *tuf* ou *rpoB*, et non par l'ADNr 16S. Parmi les autres gènes d'intérêt pour l'identification des staphylocoques, le gène *gap* est l'un des moins conservés avec des homologies de séquences entre les différentes espèces variant de 24% à 96%. Par conséquent, son séquençage est un des plus discriminants pour l'identification des SCN. La séparation des espèces *capitis* et *caprae* est alors très supérieure à celles que permettent l'ADNr 16S ou le gène *rpoB* <sup>44,46</sup>.

Les staphylocoques hébergent deux gènes de protéines de choc thermique, conservés mais porteurs de séquences hypervariables présentant un intérêt pour l'identification moléculaire. Le gène *hsp60*, dont l'homologie entre espèces est de l'ordre de 82%, révèle une phylogénie proche de celle de l'ADNr 16S mais beaucoup plus discriminante, avec 6 groupes d'espèces phylogénétiquement proches, séparé en 2 *clusters*, celui de l'espèce *sciuri*, et celui des espèces *aureus*, *epidermidis*, *haemolyticus*, *saprophyticus* et *intermedius* <sup>45</sup>. Un autre gène codant pour une protéine de choc thermique, *dnaJ*, est l'un des plus discriminants pour l'identification des staphylocoques,

avec en moyenne 78% d'homologies entre les différentes espèces. Son pouvoir discriminant est donc non seulement supérieur à celui de l'ADNr 16S, mais également à celui de *rpoB*, de *hsp60* ou encore de *sodA*, tant pour la différenciation entre espèces qu'au niveau des sous-espèces. En effet, son séquençage engendre 8 groupes (*S. sciuri*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus-intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. aureus* et *S. lugdunensis*), et son intérêt réside principalement dans des variations de séquences intra-espèces très faibles, inférieures à 1% pour des espèces majeures telles qu'*aureus* et *epidermidis* <sup>40</sup>.

### 2.4.3. Spectrométrie de masse

Cette méthode, appelée MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight mass spectrometry*), consiste en la fragmentation des bactéries en un panel protéique ionisé, sous l'impulsion d'un laser. L'identification est possible *via* l'obtention d'un profil unique pour chaque espèce, issu de l'analyse des rapports « masse sur charge » (m/z) des ions produits. Ces rapports sont eux-mêmes déduits du temps mis par les ions (temps de vol) pour parcourir une distance définie. Le MALDI-TOF s'est beaucoup développé ces dernières années et a supplanté les techniques d'identification par galeries biochimiques. En termes d'identification des staphylocoques, ses performances les plus récemment décrites vont de 97,2% à 100% selon les études et avec des panels incluant les espèces les plus couramment retrouvées en clinique <sup>47,48,49,50</sup>. Bien que certains travaux rapportent de moins bons résultats et plus de 20% d'erreurs pour des espèces relativement rares <sup>44,51</sup>, les espèces les plus isolées en clinique (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*) sont identifiées à 99.6% <sup>47,50</sup>. La comparaison du MALDI-TOF avec le séquençage du gène *tuf*, le plus discriminant pour l'identification des SCN, montre des résultats équivalents pour les espèces les plus fréquemment isolées, mais avec une vitesse supérieure et un coût de réalisation nettement moindre <sup>48,49</sup>. Lorsque le panel d'espèces s'élargit, le séquençage *tuf* est supérieur, du fait de la perte de performance du MALDI-TOF sur certains SCN <sup>44</sup>. En revanche, la comparaison avec d'autres techniques d'identification montre la grande supériorité du MALDI-TOF sur les méthodes phénotypiques (Vitek® et galeries biochimiques), et même sur l'ADNr 16S <sup>49</sup>. Comme pour les autres techniques d'identification, la base de données est importante. Mais en spectrométrie de masse, le *cut-off* (ou seuil d'identification) est aussi un élément majeur. Les fournisseurs recommandent d'utiliser un *cut-off* à 2 pour considérer l'identification comme acceptable au rang d'espèce, et un *cut-off* compris entre 1,7 et 2 pour affirmer une

identification au rang de genre. Cependant, il a été montré que ce *cut-off* peut être ramené à 1,7 pour identifier de façon fiable les staphylocoques au rang d'espèce<sup>47,52</sup>. Outre les performances remarquables de cette technique, d'autres arguments majeurs ont favorisé son développement, notamment son coût (quelques centimes pour chaque souche), sa rapidité (quelques minutes pour une série de plusieurs souches) et sa facilité d'exécution, accessible à un technicien de laboratoire non spécialisé<sup>47,48,53</sup>.

## 2.5. Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques des SCN

Les principales résistances décrites chez les staphylocoques concernent les  $\beta$ -lactamines avec deux grands mécanismes. La résistance à la pénicilline par acquisition d'une  $\beta$ -lactamase, décrite pour la première fois en 1944, portée par le gène *blaZ* et médiée par un plasmide entre les différents staphylocoques. Cette enzyme hydrolyse le cycle  $\beta$ -lactame de toutes les pénicillines<sup>1</sup>. Comme l'illustre la figure suivante, son émergence chez l'espèce *aureus* a été consécutive à la pression de sélection exercée par la pénicilline découverte au début des années 1940<sup>54</sup>. Désormais, moins de 10% des souches de *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, SCN les plus isolés en clinique, sont sensibles à la pénicilline G. Selon les séries, ce taux de résistance peut atteindre 98%<sup>1</sup>.

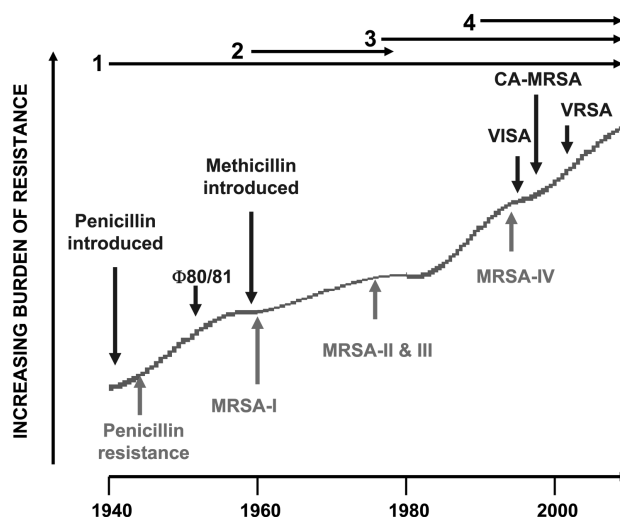


Figure 9 : Courbe d'évolution de la résistance aux bêta-lactamines chez *S. aureus* et représentant les introductions sur le marché de différents antibiotiques majeurs ainsi que les grands mécanismes de résistance. Les quatre flèches représentent les vagues de résistance successives apparues au fil des années. MRSA = SAMR, VISA = *S. aureus* intermédiaire à la vancomycine, VRSA = *S. aureus* résistant à la vancomycine, CA-MRSA = SARM acquis en communauté. D'après Chambers et al. 2009<sup>54</sup>.

La résistance à la méticilline est le second mécanisme de résistance d'importance majeure chez les staphylocoques. Ce mécanisme a été largement décrit chez *S. aureus* et a

entraîné une surveillance de ces souches dites « SARM » par les instances d'hygiène hospitalière et de veille sanitaire afin de réduire la prévalence de cette « BMR » (Bactérie Multi-Résistante)<sup>2</sup>. Ce mécanisme caractéristique entraîne une résistance à toutes les bêta-lactamines, comprenant donc les pénicillines, les céphalosporines (à l'exception du ceftobiprole et de la ceftaroline) et les carbapénèmes<sup>1</sup>. Le mécanisme moléculaire est l'acquisition d'une Protéine Liant la Pénicilline (PLP) supplémentaire, désignée sous le nom de PLP2a, et codée par un gène (*mecA*) appartenant à un opéron localisé sur un grand fragment d'ADN, une cassette appelée SCC*mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). Cette cassette est un élément génétique mobile comprenant des recombinaisons, appelées Ccr, insérant et excisant ce motif dans le génome. Il existe actuellement 4 « *mec* complex » et 6 « *ccr* complex » formant la classification des SCC*mec* qui s'étend à ce jour du type I au type XI représentés ci-dessous<sup>1,55</sup>.

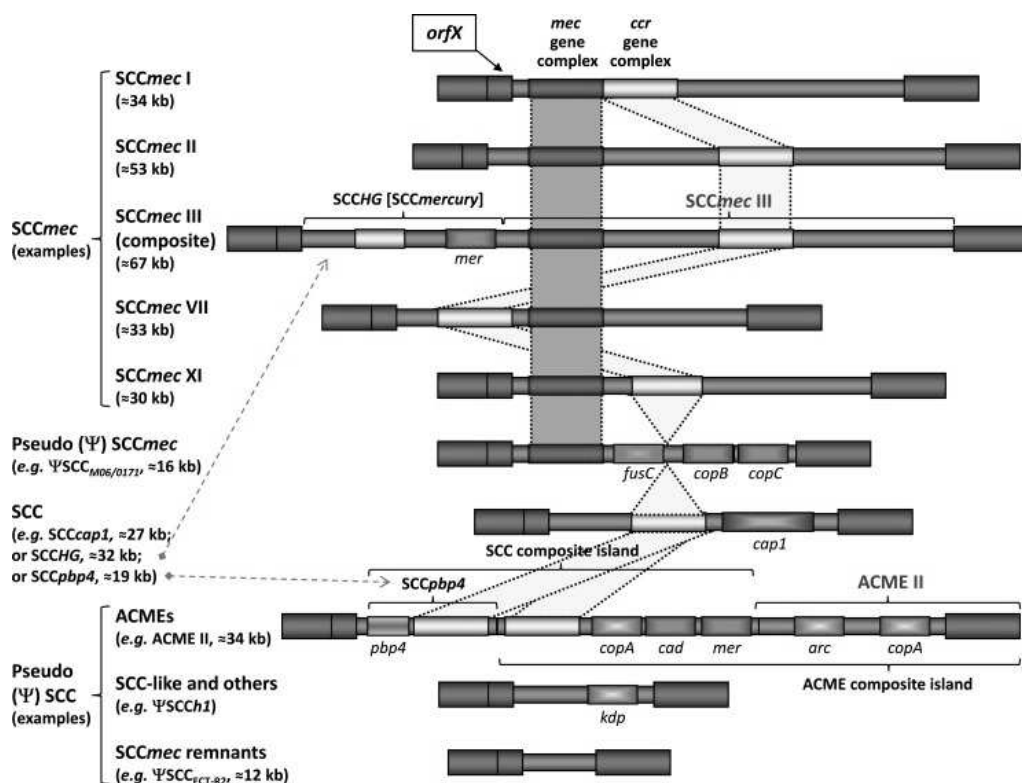


Figure 9 : Organisation des SCC*mec* conférant la résistance à la métiline chez les staphylocoques. D'après Becker et al. 2014<sup>1</sup>.

La prévalence des infections à SARM a largement chuté au cours de ces dernières années du fait des politiques d'hygiène et de bonne prescription des antibiotiques. Ainsi, en France, la densité d'incidence des infections à SARM est de l'ordre de 0,3 pour 1000 journées d'hospitalisation soit deux fois moins qu'il y a 10 ans, et les SARM représentent

moins de 20% des souches de *S. aureus* <sup>2</sup>. Les mécanismes de résistance aux bêta-lactamines chez les SCN sont les mêmes que ceux de *S. aureus*, mais leur prévalence est très supérieure, avec notamment 73,2 à 90,9% de résistance à la méticilline <sup>1</sup>.

## 2.6. *Staphylococcus saccharolyticus*, une espèce encore méconnue

A ce jour, seules quelques anciennes études révèlent des données sur *S. saccharolyticus* et datent, pour la plupart, des années 1970 ou du début des années 1980.

### 2.6.1. Ecologie de *S. saccharolyticus*

La flore cutanée est composée de nombreux germes dont une majorité de staphylocoques à coagulase négative, notamment *Staphylococcus epidermidis* qui représente jusqu'à 90% de la flore aérobie de la peau <sup>56</sup>. Concernant la flore anaérobie, *S. saccharolyticus* pourrait être présent chez 20 à 24% de la population suivant le site de prélèvement cutané <sup>57</sup>. Chez l'homme, *S. saccharolyticus* coloniserait préférentiellement le front et les bras <sup>1</sup>. L'espèce n'est pas strictement humaine et observée par exemple dans la flore cutanée des gorilles <sup>1</sup>.

### 2.6.2. Aspects microscopiques et macroscopiques

*S. saccharolyticus* est un cocci immobile d'environ 0,8 µm, ne formant pas de spores et se disposant en paires, en tétrades, en grappes ou de façon isolée. Les colonies obtenues sur milieu gélosé sont circulaires, de 0,5 à 1 mm, blanches à grises, opaques et convexes <sup>1,57,58,59</sup>.

### 2.6.3. Profil biochimique

Lors de sa découverte par Foubert et Douglas en 1948, *S. saccharolyticus* a été décrit comme une bactérie anaérobie stricte <sup>58</sup>. Des études plus contemporaines démontrent en effet que sa croissance se fait préférentiellement en anaérobiose à une température optimale comprise entre 30 et 37°C. Cependant, en fonction de la composition du milieu, il est possible d'observer un développement à la fois en anaérobiose et en aérobie <sup>59</sup>. Sur gélose au sang le taux de croissance atteint 100% dans des conditions d'anaérobiose stricte en 48h contre 0% en condition aérobie durant ce même temps d'incubation, et jusqu'à 40% seulement en aérobie après 7 jours d'incubation <sup>57</sup>. L'ajout d'hème dans le milieu gélosé favoriserait la croissance dans des conditions d'aérobie sans l'inhiber en anaérobiose pour autant <sup>59</sup>. En milieu TSY (*Trypticase Soy, Yeast extract, Tween 80*), sur

178 souches de *S. saccharolyticus* incubées pendant 4 à 7 jours à 37°C, 5% poussent seulement en anaérobiose, 76% poussent mieux en anaérobiose qu'en aérobiose, 12% ont une croissance équivalente dans les deux conditions et 7% ont une croissance sensiblement meilleure en aérobiose <sup>57</sup>.

Les caractères biochimiques de *S. saccharolyticus*, issus de trois études, sont recensés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Profil du métabolisme biochimique de *S. saccharolyticus* selon les travaux de Foubert et Douglas, Westblom et al. et Evans et al <sup>58,60,57</sup>.

Tests / Caractères biochimiques	Etudes		
	Foubert et Douglas, 1948	Westblom et al., 1990	Evans et al., 1977
Indole	-	-	NR
Uréase	NR	-	NR
Glucose	+	+	+
Mannitol	-	-	NR
Lactose	-	-	NR
Saccharose	+	-	NR
Galactose	-	NR	NR
Maltose	-	-	-
Salicine	-	-	NR
Xylose	NR	-	NR
Arabinose	-	-	NR
Esculine	NR	-	NR
Glycérol	+	+	+
Cellobiose	NR	-	NR
Mannose	+	+	NR
Fructose	+	NR	+
Raffinose	-	-	NR
Sorbitol	NR	-	NR
Rhamnose	NR	-	NR
Tréhalose	NR	+	NR
Catalase	NR	+	+
Coagulase	NR	-	-

Les concordances relevées par ces trois études concernent le glucose, le glycérol, le mannose et le fructose <sup>57,58,60</sup>. Il existe une discordance entre les études sur la fermentation du saccharose <sup>58,60</sup> et une incertitude sur le métabolisme du tréhalose <sup>60</sup>. La présence d'une

catalase et l'absence de coagulase, caractère majeur des SCN, est confirmée <sup>57,60</sup>. Le glucose, principal sucre fermenté, est métabolisé sous la forme de CO<sub>2</sub>, d'éthanol, d'acide acétique et d'acide formique <sup>58,60</sup>. Il ressort de ces travaux des résultats contradictoires sur la présence <sup>58</sup> ou l'absence <sup>57</sup> de traces d'acide lactique dans les métabolites de fermentation du glucose. D'autres caractères biochimiques ont été détaillés lors de la description initiale de ce germe : il n'entraîne pas de protéolyse de l'albumine d'œuf, de la gélatine, du sérum de bœuf ou de la caséine, il n'est pas producteur d'H<sub>2</sub>S mais peut réduire les nitrates en nitrites par la présence d'une nitrate réductase <sup>58</sup>.

#### **2.6.4. Relations taxonomiques et études génomiques**

Lors de sa découverte en 1948, le germe a été classé dans la famille des *Micrococcaceae*, le genre *Micrococcus* et l'espèce *grigoroffi*. Cependant, sa fermentation particulière de certains sucres, dont le glucose, l'ont fait rapidement individualiser dans une espèce à part, *Micrococcus saccharolyticus* <sup>58</sup>. Puis son caractère anaérobie strict a fait évoluer sa taxonomie du genre *Micrococcus* vers le genre *Peptococcus*, ce dernier distinguant au sein de la famille depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle des cocci à Gram positif anaérobies immobiles et non sporulés. Par la suite néanmoins, la taxonomie de *P. saccharolyticus* restera floue et controversée car ses propriétés se distinguent sensiblement de celles d'autres bactéries du genre *Peptococcus*, lequel rejoindra finalement une nouvelle famille de cocci anaérobies, les *Peptococcace*. Les travaux de Schleifer en 1973 sur la composition de la paroi bactérienne apportèrent un nouvel éclairage taxonomique. L'analyse de cette composition, présentée dans le tableau suivant, confirma d'une part des différences majeures avec les autres *Peptococcus* et d'autre part une grande similitude, qualitative et quantitative, avec la paroi de *Staphylococcus epidermidis*, estimée à 80% d'homologie en séquence d'acides aminés. Il apparaît dès lors que *P. saccharolyticus* serait un staphylocoque ayant perdu ses facultés à croître en atmosphère aérobie <sup>61</sup>.



Tableau 2 : Composition de la membrane et du peptidoglycane, type de cytochrome et composition en GC de l'ADN de certains staphylocoques et peptocoques dont *P. saccharolyticus*. D'après Kilpper et al. 1981 <sup>59</sup>.

Strain	Type of peptidoglycan	Cell wall teichoic acid	Cytochrome pattern	GC-content of DNA
<i>P. saccharolyticus</i> ATCC 14953	(Ala) <sup>a</sup> L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucosamine	a-605 b-552 b-556 b-559	34.0
<i>P. saccharolyticus</i> Evans 75-159	(Ala)L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucosamine	a-607 b-552 b-555 b-559 b-567	33.8
<i>P. saccharolyticus</i> Evans 75-160	(Ala)L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucosamine	n. d.	33.3
<i>P. saccharolyticus</i> Evans 75-166	(Ala)L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucosamine	n. d.	33.0
<i>P. saccharolyticus</i> Evans 75-142	(Ala)L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucosamine	n. d.	33.5
<i>P. saccharolyticus</i> Evans 75-145	(Ala)L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucosamine	n. d.	34.0
<i>S. haemolyticus</i> DSM 20263	(Ala)L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucosamine	a-605 b-552 b-555 b-560 b-566	35.3 <sup>b</sup>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	(Ala)L-Lys-Gly <sub>1</sub> , Ser <sub>1</sub>	Glycerol, glucose	a-606 b-552 b-555 b-559 b-566	34.8
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	(Ala)L-Lys-Gly <sub>5-6</sub>	Ribitol, glucosamine	a-605 b-552 b-555 b-559 b-567	34.5
<i>P. prevotii</i> ATCC 9321	(Gly) <sup>a</sup> L-Lys-D-Glu	n. d.	-	35.7-36.7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> (Ala), (Gly): Amino acid in position 1 of the peptide subunit.

<sup>b</sup> According to *Schleifer and Kloos, 1975*.

<sup>c</sup> According to *Rogosa, 1974*.

n. d.: not determined

Ce n'est qu'au début des années 1980 avec l'avènement des études génomiques que le genre a été revu officiellement de *Peptococcus* à *Staphylococcus*, désignant ainsi le germe sous le nom de *Staphylococcus saccharolyticus*. Le tableau ci-dessous démontre en effet que l'hybridation ADN-ADN entre *P. saccharolyticus* et certaines espèces de SCN révèle une forte homologie de séquence avec le genre *Staphylococcus*. A l'inverse, les homologies de séquences ADN avec le genre *Peptococcus* demeurent très faibles, toujours inférieures à 10% <sup>61</sup>.

Tableau 3 : pourcentage d'homologie entre différentes espèces de staphylocoques et de streptocoques dont *P. saccharolyticus*, basé sur une technique d'hybridation de l'ADN. D'après Kilpper et al. 1980 <sup>61</sup>.

Filter-bound DNA [ <sup>3</sup> H]DNA	<i>P. saccharolyticus</i> ATCC 14953	<i>P. saccharolyticus</i> Evans 75-166	<i>P. prevotii</i> ATCC 9321	<i>L. acidophilus</i> Gasser AM 63
<i>S. haemolyticus</i> DSM 20263	32	30	6	5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	29	27	2	2
<i>S. capitis</i> ATCC 27840	39	32	1	2
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	31	29	3	4
<i>S. warneri</i> ATCC 27836	34	31	2	2
<i>S. simulans</i> ATCC 27848	24	21	7	4
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	24	22	3	2
<i>S. xylosus</i> DSM 20266	20	16	3	3
<i>S. saprophyticus</i> CCM 883	20	19	2	1
<i>S. cohnii</i> DSM 20260	21	18	4	4
<i>S. intermedius</i> Hajek K2	12	10	6	7
<i>S. hyicus</i> NCTC 1462	16	14	5	4
<i>S. sciuri</i> DSM 20263	15	15	5	7

L'avènement de la biologie moléculaire et le séquençage de différents gènes ont contribué de façons diverses à confirmer l'appartenance de *S. saccharolyticus* au genre *Staphylococcus* et à préciser sa place au sein du genre, sans pour autant qu'aucun d'entre eux ne puisse établir à lui seul une certitude diagnostique. Le premier gène ayant contribué à la classification phylogénétique des staphylocoques est celui codant pour l'ARN ribosomique 16S. Son séquençage a permis d'obtenir des *clusters* très proches de ceux générés par les études antérieures d'hybridation ADN-ADN et d'établir un premier dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques entre l'espèce *saccharolyticus* et les principales espèces de staphylocoques isolées chez l'homme <sup>62</sup>. Cependant, au sein de ce *cluster*, *S. saccharolyticus* se distingue de *S. epidermidis* mais pas des espèces *capitis* ni *caprae* <sup>39</sup>.

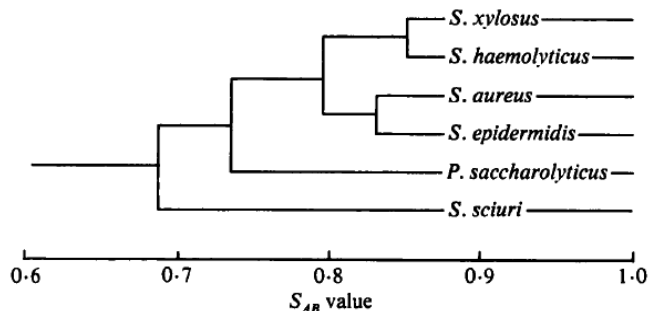


Figure 10 : dendrogramme de la relation taxonomique entre *P. saccharolyticus* et d'autres espèces de staphylocoques basé sur l'étude de l'ADNr 16S. D'après Ludwig et al. 1981 <sup>62</sup>.

Le séquençage 16S permet en outre de distinguer *S. saccharolyticus* des espèces *lugdunensis*, *haemolyticus*, *hominis*, *pasteuri* et *warneri*, ce qui n'était pas possible avec l'hybridation ADN-ADN.

Les dendrogrammes générés par le séquençage d'autres gènes d'intérêt sont présentés en annexe du document. Parmi eux, le séquençage du gène *sodA* ne distingue que faiblement l'espèce *saccharolyticus* des autres SCN, les valeurs de *bootstraps* des nœuds le séparant de *S. epidermidis* n'étant que de 83%, et plus faible encore vis à vis des espèces *capitis* et *caprae* <sup>42</sup>. Dans le cas du gène *rpoB*, un *cluster* semble se dessiner autour de *S. saccharolyticus* mais inclurait aussi *S. epidermidis* et *S. lugdunensis*, ces 3 espèces apparaissant peu différenciables. En revanche, l'analyse de *rpoB* permet, contrairement au séquençage 16S, une bonne séparation de *S. saccharolyticus* vis-à-vis des espèces *caprae* et *capitis* du fait d'une homologie de séquence de seulement 84,5% à 89% <sup>43</sup>. Parmi les autres gènes d'intérêt, le gène *dnaJ* permet une relativement bonne identification de *S. saccharolyticus* inclus dans le groupe *S. epidermidis*, avec les espèces *capitis*, *caprae*, *epidermidis*, *pasteuri*, *warneri*. Le dendrogramme établi à partir du gène *hsp60* montre également une très bonne séparation des espèces *saccharolyticus* et *epidermidis* (*bootstrap* à 95%) et de *S. muscae* (*bootstrap* à 100%), mais ne sépare pas *S. saccharolyticus* du groupe *capitis/caprae* <sup>45</sup>. Pour le gène *gap*, bien que *S. saccharolyticus* apparaisse proche des espèces *epidermidis*, *capitis* et *caprae*, les valeurs de *bootstrap* séparant les différentes espèces sont supérieures à 95% et permettent donc théoriquement une très bonne identification de l'espèce *saccharolyticus* <sup>44</sup>. Enfin, bien qu'étant l'un des gènes les plus discriminants pour l'identification des SCN, le gène *tuf* se révèle un peu moins discriminant pour *S. saccharolyticus*, tout en restant meilleur que le séquençage 16S <sup>44</sup>.

### 2.6.5. Cas cliniques

Il n'existe actuellement que cinq cas cliniques publiés évoquant une infection imputable à *S. saccharolyticus*. Ces infections concernent divers sites anatomiques puisque sont rapportées les pathologies suivantes : une pneumopathie, une spondylodiscite, deux endocardites et une infection de la moelle osseuse.

Le cas de pneumopathie à *S. saccharolyticus* a été décrit chez un jeune chinois de 21 ans présentant une toux associée à une hémoptysie. L'imagerie pulmonaire mit en évidence de multiples lésions et foyers dont la biopsie se positiva en culture à *S. saccharolyticus*. Le patient succomba à cette infection du fait d'une antibiothérapie inadaptée à l'antibiogramme. Devant une résistance à la pénicilline G associée à une résistance à l'imipénème, une souche résistante à la méticilline peut être suspectée <sup>63</sup>.

Le cas de spondylodiscite a été décrit chez un homme de 48 ans souffrant de douleurs dorsales depuis 2 mois avec une altération de l'état général. La biopsie de disque intervertébral s'est révélée positive à *S. saccharolyticus* après 5 jours de culture en anaérobiose. L'identification a été effectuée par galerie d'identification biochimique et séquençage 16S. Après traitement antibiotique adapté, l'infection a régressé et le patient a recouvré son état de santé antérieur <sup>64</sup>.

Une femme de 57 ans ayant subi une implantation de valve mitrale prothétique quelques années auparavant a développé une endocardite révélée à l'échocardiographie trans-oesophagienne. Les prélèvements d'hémocultures aérobies et de valve ont donné des résultats positifs à *S. saccharolyticus* après identification par galerie d'identification biochimique. L'antibiogramme mit en évidence une résistance à la méticilline et la patiente décéda quelques semaines plus tard d'une défaillance cardiaque post-greffe valvulaire <sup>65</sup>.

Un autre cas d'endocardite a été décrit en 1990 chez un homme de 61 ans présentant une altération de l'état général. L'échographie cardiaque montra une végétation au niveau de sa valve native. Les hémocultures anaérobies mirent toutes en évidence un *S. saccharolyticus* dont l'identification fut obtenue par galerie d'identification biochimique. Après une antibiothérapie de 6 semaines le suivi du patient était favorable <sup>60</sup>.

Plus récemment, une jeune femme chinoise de 26 ans s'est présentée à l'hôpital avec un tableau de fièvre, adénopathie et convulsions suivies de coma, associés à une pancytopénie. Le myélogramme ne révéla pas d'anomalie hématologique cancéreuse mais la culture anaérobie (ainsi que les hémocultures anaérobies) était positive. La galerie d'identification biochimique et le séquençage du gène *gap* identifièrent *S. saccharolyticus*. Malgré une antibiothérapie adaptée la gravité de l'infection entraîna le décès de la patiente<sup>66</sup>.

Le tableau suivant précise les données recueillies pour ces différents cas cliniques.

Tableau 4 : Description de l'ensemble des *cases reports* impliquant *S. saccharolyticus*.

Auteurs	Godreuil et al. <sup>64</sup>	Krishnan et al. <sup>65</sup>	Liu et al. <sup>66</sup>	Westblom et al. <sup>60</sup>	Wu et al. <sup>63</sup>
Pays, année	France, 2002	USA, 1996	Chine, 2015	USA, 1990	Chine, 2009
Pathologie	Spondylodiscite	Endocardite sur valve prothétique	Infection de moelle osseuse	Endocardite sur valve native	Pneumonie
Informations patient	Homme, 58 ans	Femme, 57 ans Implantation valve mitrale prothétique il y a quelques années	Femme, 26 ans, sans antécédents médicaux	Homme, 61 ans, fièvre récurrente depuis 6 mois	Homme, 21 ans, sans antécédents médicaux
Explorations cliniques	- Douleurs dorsales depuis 2 mois (Corticoides), fièvre, perte de poids, examens neurologique, cardiaque et pulmonaire normaux, hygiène dentaire déplorable - IRM moelle épinière révèle spondylodiscite	- Fièvre, souffle systolique, hépatomégalie. - ETO révèle une masse avec végétations au niveau de la prothèse valvulaire.	- Fièvre, adénopathies cervicales, puis convulsions et perte de conscience, puis choc septique avec CIVD et coma - Echographie abdominale : ascite (négative en culture) - Imageries cérébrales et cervicales normales, mais imagerie pulmonaire anormale.	- Fièvre, perte de poids, souffle cardiaque - Echographie cardiaque révèle végétations sur la valve mitrale - Pas d'intervention ni infection dentaire récente - Lésions cutanées (probable point d'entrée)	- Toux avec hémoptysie depuis 34 jours, dyspnée depuis 8 jours, apyrétique. - Scanner et radiographie révèlent multiples lésions et foyers pulmonaires s'aggravant avec le temps - VIH négatif - Auscultation cardiaque normale
Explorations biologiques	- CRP et VS élevées, hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, urines, hémocultures, VIH, VHC et Brucella négatives	Anémie, hyperleucocytose	- Pancytopenie, CRP et VS élevées, VIH négatif, Ac antinucléaire, anti double brin et cardiolipide négatifs. - Recherche de BK négative - Myélogramme normal	- Anémie, thrombocytose, VS élevée	- Hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, anémie légère - Absence de BK

Prélèvements	Biopsie disque intervertébral	Hémocultures + Valve mitrale prothétique	Moelle osseuse + hémocultures	Hémocultures après arrêt ciprofloxacine	Biopsie pulmonaire sur foyer de nécrose
Cultures	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Examen direct du prélèvement négatif</li> <li>- Culture pure à <i>S. saccharolyticus</i> après 5 jours d'incubation en anaérobie.</li> <li>- Culture aérobie négative après 7 jours d'incubation.</li> <li>- Culture BK négative.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hémocultures à <i>S. saccharolyticus</i> en 24h dans tous les flacons anaérobies. Aérobie négatives.</li> <li>- Valve mitrale thrombosée (anneau inflammé et nécrosé) donnant <i>S. saccharolyticus</i> (culture anaérobie).</li> <li>- Hémocultures post-intervention chirurgicale négatives</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultures anaérobies du sang et de la moelle osseuse : cocci Gram positif (colonies blanches non hémolytiques sur gélose sang en anaérobiose) : <i>S. saccharolyticus</i></li> <li>- Cultures aérobie négatives</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hémocultures anaérobies positives après 10 jours : <i>S. saccharolyticus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biopsie positive à <i>S. saccharolyticus</i> (résultat rendu après le décès du patient)</li> <li>Atmosphère d'incubation non renseignée.</li> </ul>
Méthodes identifications	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biochimie : Api® 20 A</li> <li>- Biologie moléculaire : séquençage 16S (identification au genre <i>Staphylococcus</i>, 99% homologie) et <i>rpoB</i> (98,3% homologie avec <i>S. saccharolyticus</i> CIP 103275T, 88,9 % avec <i>S. caprae</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biochimie : Rapid® ANA II et An-Ident®</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biochimie : Api® 20 A (code : 20005046)</li> <li>- Biologie moléculaire : séquençage <i>gap</i> (99% d'homologie avec <i>S. saccharolyticus</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biochimie : galerie d'identification non spécifiée (vérifié par 2 laboratoires indépendants)</li> </ul>	Non renseigné

Antibiogramme	<p>Diffusion milieu gélosé :</p> <p>S : vancomycine, teicoplanine, érythromycine, pristinamycine, rifampicine, tetracycline</p> <p>CMI (E-test en mg/L) :</p> <p>S : ofloxacine (&lt;0.19), clindamycine (&lt;0,064)</p> <p>R : métronidazole (&gt;256)</p> <p>Recherche de bêta-lactamase négative, PCR <i>mecA</i> négative</p>	<p>Diffusion en milieu gélosé et CMI (mg/L) par microdilution en milieu liquide.</p> <p>S : vancomycine (2), clindamycine (&lt;0.5), chloramphénicol (8)</p> <p>R : oxacilline (&gt;32) et donc toutes les Bêta-lactamines, métronidazole (&gt;16), tétracycline (&gt;16)</p>	<p>Méthode non renseignée</p> <p>CMI (mg/L) :</p> <p>S : vancomycine (1.5), levofloxacin (0.094), pénicilline (0.002), clindamycine (0.023)</p> <p>R : métronidazole (256)</p>	<p>CMI (mg/L) par dilution en milieu liquide :</p> <p>S : pénicilline (0.015), ampicilline (0.015), oxacilline (0.015), céfalotine (0.015), vancomycine (0.015), Imipénème (0.015), gentamicine (0.48), ciprofloxacine (0.12), clindamycine (0.012)</p> <p>R : métronidazole (250)</p>	<p>Méthode non renseignée</p> <p>S : lévofloxacin, moxifloxacin</p> <p>R : métronidazole, pénicilline, imipénème</p>
Traitements	<p>Céfotaxime IV 2g, 4fois/j + Fosfomycine IV 4g, 3 fois/j pendant 2 jours.</p> <p>Relais : Ofloxacin PO 200mg, 3 fois/j + Clindamycine 600 mg, 4 fois/j pendant 12 semaines</p>	<p>Changement de valve au bloc opératoire</p>	<p>Pénicilline IV 6.4 millions U/4h + Vancomycine 0.8g, 2 fois/j</p> <p>Puis Imipénème 1g/12h + Vancomycine 500 mg/6h</p>	<p>Traitement empirique par ciprofloxacine avant investigations.</p> <p>Puis nafcilline 2g/4h + gentamicine 90 mg/8h pendant 6 semaines</p>	<p>- Azithromycine 0.5 g pendant 6 jours en probabiliste avant imagerie</p> <p>- Tinidazole IV 0.4g, 2 fois/j + pénicilline 4 millions U/6h</p> <p>- Aggravation clinique donc : Imipénème IV 0.25g/6h + tinidazole 0.4g, 2 fois/j</p>
Guérison / Décès	<p>A 3 mois post-traitement : disparition images anormales à l'IRM et CRP indétectable. Suivi à 1 an favorable.</p>	<p>Décès par défaillance cardiaque à J32 de l'hospitalisation.</p>	<p>Décès par choc septique après quelques jours d'hospitalisation.</p>	<p>Suivi à 6 mois post-traitement favorable</p>	<p>Décès à J20 d'hospitalisation</p>



En outre, il a été rapporté un épisode très particulier de possibles bactériémies à *S. saccharolyticus* dans un centre hospitalier allemand affectant une vingtaine de patients. La première patiente était hospitalisée pour hyperthermie dans un contexte de chimiothérapie sur cancer métastatique. Ses hémocultures se sont positivées à *S. saccharolyticus*. Aucune antibiothérapie n'a été instaurée et le syndrome inflammatoire et fébrile s'est normalisé après quelques jours. Dans les 6 mois suivants, 16 prélèvements d'hémocultures sont sortis positifs au même germe pour différents patients (une origine clonale a été mise en évidence par étude génétique pour 15 souches sur 16). Tous les patients souffraient d'un syndrome inflammatoire biologique et d'une hyperthermie au moment du prélèvement. Ces patients, sans aucun lien entre eux et hospitalisés pour des raisons diverses, ont été perdus de vue du fait de transferts dans d'autres hôpitaux. Aucune cause n'a été retrouvée à cet épisode, qui, un an après, n'était toujours pas résolu car de nouvelles hémocultures se positivaient avec ce germe chez des patients nouvellement hospitalisés. Les causes autres que cliniques et nosocomiales explorées mais écartées après investigation sont la contamination intra-laboratoire et la contamination des fioles par le fournisseur.

Le profil d'antibiogramme du *S. saccharolyticus* retrouvé dans ce centre hospitalier donnait une sensibilité aux molécules suivantes : pénicilline (donc a priori « méti-S »), érythromycine, nétilmicine, clindamycine, lévofloxacine, vancomycine<sup>67</sup>.

### 2.6.6. Objectifs de ce travail

L'isolement d'un *S. saccharolyticus* dans les différents prélèvements d'un défibrillateur en menace d'extériorisation chez un patient de notre CHU nous a conduit à différentes interrogations sur cette bactérie méconnue. Quelles sont ses caractéristiques ? Appartient-elle aux SCN considérés comme pathogènes, surtout dans le cas de patients porteurs de matériel implanté ? Quels facteurs de virulence serait-elle capable de produire ? Est-elle correctement identifiée par les différentes techniques utilisées dans les laboratoires de microbiologie ? Peut-elle être résistante aux bêta-lactamines ? L'objectif de ce travail a été d'étudier cet isolat, et quelques autres du laboratoire, afin de tenter de répondre à ces questions. Les travaux ont concerné différentes souches de patients hospitalisés au CHU de Rouen et une souche de référence de l'institut Pasteur, toutes identifiées en première intention comme *S. saccharolyticus*. Le premier objectif était de comparer les différentes méthodes d'identification bactérienne. Dans un second temps, notre travail s'est concentré sur la recherche de facteurs de virulence et notamment sur l'éventuelle capacité de *S. saccharolyticus* à produire du biofilm. Enfin, une étude des profils de sensibilité aux antibiotiques a été réalisée afin d'évaluer la présence de mécanismes de résistance chez *S. saccharolyticus*.

### **3. Matériels et méthodes**

#### 3.1. Recrutement des patients/prélèvements

##### **3.1.1. Cas index : Monsieur M.L.**

Monsieur M.L. présente comme antécédent une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, diagnostiquée à l'âge de 13 ans et observée chez plusieurs membres de sa famille (forme récessive liée à l'X). Cette pathologie se caractérise par une triade de signes cliniques : une atrophie musculaire de progression lente associée à une rétractation tendineuse et une cardiopathie. Cette dernière se manifeste souvent après l'âge de 20 ans par des troubles de la conduction, des troubles rythmiques ainsi qu'une cardiomyopathie dilatée. A l'âge de 24 ans, Monsieur M.L. est hospitalisé en urgence pour une perte de connaissance d'allure syncopale avec morsure de langue évoquant un épisode épileptique. Au cours de l'hospitalisation, l'exploration du faisceau de His révèle une dysfonction sinusale sévère avec bloc nodal de 1<sup>er</sup> degré motivant l'implantation d'un pacemaker. Le boîtier de pacemaker est changé par la suite à deux reprises, en 2003 et 2007.

En mai 2013, devant la dysfonction de la sonde ventriculaire droite et en raison des risques de troubles du rythme dans le cadre de cette myopathie, le pacemaker est retiré puis remplacé par un défibrillateur automatique implantable pré-pectoral droit avec sonde de défibrillation ventriculaire droite. Les anciennes sondes non fonctionnelles sont laissées en place après avoir été capuchonnées.

En septembre 2014, Monsieur M.L. consulte en urgence son cardiologue car depuis une quinzaine de jours il décrit une gêne au niveau de la loge de son défibrillateur. Il décrit en outre un épisode de frisson sans avoir constaté de réel syndrome fébrile. Le bilan biologique est normal et il est notamment noté l'absence de syndrome infectieux (procalcitonine négative et absence d'hyperleucocytose). L'examen clinique révèle une menace avérée d'extériorisation du boîtier de défibrillateur nécessitant l'ablation totale du matériel implanté afin d'éviter toute aggravation septique. La loge du défibrillateur n'était pas cliniquement purulente lors de l'intervention. Après ablation du matériel, une antibiothérapie probabiliste par vancomycine 2 g IV en continu et gentamicine 320 mg IV toutes les 24 h est instaurée.



Figure 11 : photographies thoraciques de face (à gauche) et de profil (à droite) de Monsieur M.L. lors de l'épisode de menace d'extériorisation du boîtier de défibrillateur.

Tous les prélèvements de matériels réalisés durant l'opération sont envoyés au laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen, qui objective les résultats suivants :

- Défibrillateur : *S. saccharolyticus* + 2 autres SCN
- Capuchon de sonde : *S. saccharolyticus*
- Tissu de loge : *S. saccharolyticus*
- Sonde de défibrillateur de l'oreillette droite : *S. saccharolyticus*
- Sonde du ventricule droit : *S. saccharolyticus*

L'antibiogramme montre que l'isolat de *S. saccharolyticus* est sensible à la méticilline et un relai par Orbénine® (Cloxacilline) IV 3 g, 4 fois par jour est mis en place. Afin de permettre la dé-perfusion et le retour à domicile, un relai est rapidement envisagé par teicoplanine, (dose de charge de 400 mg x 2 pendant 3 jours, puis 400 mg par jour en dose d'entretien), après vérification des CMI de cet antibiotique, et pour une durée totale d'antibiothérapie de 6 semaines.

L'ETO réalisée à une semaine de l'ablation ne montre pas d'argument en faveur d'une endocardite infectieuse. Devant l'absence de signes généraux (patient apyrétique au cours de l'hospitalisation et prélèvements d'hémocultures négatifs), la réunion de

Concertation Pluridisciplinaire (RCP) sur les endocardites conclut à une probable infection locale à *S. saccharolyticus* sans endocardite avérée. Cependant, le patient a été traité comme tel en raison de la présence du même germe dans deux sites anatomiques distincts et non communicants (sonde / loge). Une ré-implantation controlatérale d'un nouveau dispositif (sonde et boîtier) est réalisée 2 semaines plus tard. Le suivi à 3 mois montre une évolution favorable au niveau local sans syndrome inflammatoire biologique.

### 3.1.2. Autres patients

Quatre autres isolats de *S. saccharolyticus* ont été inclus à notre étude et provenaient des cultures anaérobies de liquides pleuraux. Les patients porteurs de ces souches ne présentaient pas de contexte infectieux, ils provenaient de services différents, avec des antécédents et pathologies diverses. L'un d'eux a dû être exclu du fait d'une erreur d'identification initiale du germe révélée lors de l'étude. Il s'agissait d'un germe appartenant au genre *Corynebacterium* et non d'un *S. saccharolyticus* (isolé d'un cathéter sous clavier).

1) Monsieur J-F.L. (n°2988) est un homme de 65 ans hospitalisé en chirurgie thoracique pour un carcinome épidermoïde du lobe pulmonaire inférieur gauche au stade IV multi-métastatique associé à une pleurésie purulente à *Streptococcus pneumoniae*.

2) Monsieur S.L. (n°4582) est un homme âgé de 67 ans hospitalisé en pneumologie pour un carcinome bronchique à petites cellules multi-métastatique associé à une pleurésie carcinomateuse, non purulente et sans polynucléaires neutrophiles. Le patient est apyrétique, sans signes infectieux généraux.

3) Madame V.M. (n°0138) est une patiente de 44 ans, consultant aux urgences chirurgicales pour cancer du sein gauche inflammatoire T4 avec épanchement pleural gauche. Elle est apyrétique à son entrée et il n'y a pas d'argument pour une pleurésie infectieuse.

4) Madame L.B (n°0680) est une femme hospitalisée en gastro-entérologie. L'identification erronée du germe en première intention (*Corynebacterium spp*) a fait exclure la souche de l'étude.

5) Une souche de référence de *S. saccharolyticus* provenant de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) : *S. saccharolyticus* CIP 103275T, a été ajoutée comme témoin à nos isolats cliniques. Il existe une autre souche de référence de l'American Type Culture Collection, *S. saccharolyticus* ATCC® 14953™, non utilisée ici.

## 3.2. Identification

### 3.2.1. Caractères cultureux, macroscopiques et microscopiques

Afin de mettre en évidence les caractères cultureux ainsi que les morphologies macroscopiques et microscopiques du germe étudié, toutes les souches ont été ensemencées sur des géloses dites « anaérobies » composées de TSAB (Tryptone Soja au sang de mouton) ou sur des géloses au sang incubées en anaérobiose et en aérobie, à 37°C. Les géloses ont été examinées toutes les 24h durant 5 jours.

### 3.2.2. Galeries d'identification biochimique et autres caractères biochimiques

Les galeries utilisées ont été la galerie Api® 20A et la galerie Api® Staph (Biomérieux®), recommandées respectivement pour les germes anaérobies et pour les staphylocoques. Après incubation pendant 48h sur gélose au sang en anaérobiose pour chaque échantillon, quelques colonies isolées ont été prélevées et émulsifiées dans une ampoule d'Api® Medium, afin d'obtenir respectivement 3 McF ou 0,5 McF. La galerie a été inoculée avec cette solution préparée extemporanément. Il convient d'éviter la formation de bulles qui introduiraient de l'oxygène dans les cupules. Les galeries ont été incubées en enceinte anaérobie pendant 24 à 48h à 37°C.

La détection de la présence d'une catalase chez *S. saccharolyticus* a été faite par le test standard de dégradation du peroxyde d'hydrogène après introduction d'une colonie isolée dans une goutte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le test a été réalisé pour toutes les souches.

### 3.2.3. Spectrométrie de masse

La technique d'identification par spectrométrie de masse utilisée est le MALDI-TOF de Bruker®. Un dépôt d'1 µL de contrôle interne ou BTS (*Bacterial Test Standard*) a été effectué sur la cible, recouvert après séchage et dans les 10 minutes par 1 µL de matrice. Les dépôts des échantillons bactériens ont été effectués à partir d'une colonie pure, et recouverts par 1 µL de matrice dans les 30 minutes. La plaque a été analysée par l'automate dans les 4 heures suivant le dépôt de la matrice.

### 3.2.4. Biologie moléculaire

#### 3.2.4.1. Choix des gènes et des amorces

Quelques gènes candidats ont été sélectionnés afin d'identifier les souches de *S. saccharolyticus*. L'analyse de l'ADNr 16S, technique historique et largement répandue dans les laboratoires, notamment dans le notre, a été réalisée en premier lieu sur toutes les souches. D'autres gènes utilisés en routine dans certains laboratoires pour l'identification des SCN et plus discriminants que le 16S ont été partiellement séquencés : *tuf* (deux couples différents d'amorces sont testés pour ce gène), *rpoB*, *sodA* et *gap*.

Les séquences des couples d'amorces utilisées pour chaque gène sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : séquences d'amorces et références utilisées pour les gènes *tuf*, *rpoB*, *sodA*, *gap* et pour l'ADNr 16S.

Cibles	Séquences des amorces	Références
16S	16 S1 : GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 16 S5 : GTGGACTACCAGGGTATCTAATCC	Amorçier laboratoire (CHU Rouen)
<i>tuf</i>	tuf1-F : GCCAGTTGAGGACGTATTCT tuf1-R : CCATTCAGTACCTTCTGGTAA	Hwang et al. JCM 2011 <sup>41</sup>
<i>tuf</i>	tuf2-F : TTATCACGTAACGTTGGTG tuf2-R : CATTTCWGTACCTTCTGG	Bergeron et al. EJCMID 2011 <sup>44</sup>
<i>rpoB</i>	rpoB-F : CAATTCATGGACCAAGC rpoB-R : GCIACITGITCCATACCTGT	Mellmann et al. EID 2006 <sup>68</sup>
<i>sodA</i>	sodA-F : CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC sodA-R : ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC	Poyart et al. JCM 2001 <sup>42</sup>
<i>gap</i>	gap-F : ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA gap-R : GACATTCGTTATCATACCAAGCTG	Yugueros et al. JCM 2001 <sup>69</sup>

#### 3.2.4.2. Extraction et amplification par PCR

Quelques colonies isolées obtenues après culture de 48h à 37°C en anaérobiose ont été mises en suspension dans 200 µL d'InstaGene™ Matrix (Bio-Rad®), puis incubées successivement à 56°C pendant 30 min et 100°C pendant 10 min. Les extraits, issus du surnageant des tubes après centrifugation, ont été conservés à 4°C avant amplification par PCR. Le pré-mix utilisé contenait pour chaque tube : 2.2 µL d'eau distillée, 7.5 µL de

GoTaq® green Master mix (Promega®) et les amorces *reverse* et *forward* à 7,5 nM (volume final de 10 µL). Afin d'obtenir le mix final de 15 µL, 5 µL d'extrait de souche dilués au 1/10 ont été ajoutés au pré-mix. Un témoin négatif a été réalisé en ajoutant 5 µL d'eau distillée au lieu des 5 µL d'extrait de souche. Le schéma utilisé pour la réaction d'amplification a été le même pour toutes les PCRs. L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur Veriti (Applied Biosystems®) selon le schéma suivant :

- 5 minutes à 95°C
- 10 cycles en *touch down* avec perte d'un degré par cycle de 65 à 55°C :
  - o 30 secondes à 95°C
  - o 1 minute à 65°C
  - o 1 minute 30 secondes à 72°C
- 20 cycles identiques :
  - o 30 secondes à 95°C
  - o 1 minute à 55°C
  - o 1 minute 30 secondes à 72°C
- 5 minutes à 72°C
- Arrêt de l'amplification et conservation à 4°C

Une migration électrophorétique des produits de PCR a été réalisée sur gel d'agarose à 2% durant 45 minutes à 130 V après dépôt de 10 µL d'amplicon. Une lecture du gel par lampe UV après 45 minutes de migration a permis la révélation des bandes d'ADN amplifié, visibles grâce à un agent intercalant de l'ADN fluorescent (GelRed™ Biotium®). La même manipulation a été réalisée en faisant migrer seulement 1µL de chaque amplicon dans le gel de migration afin de garder 14 µL d'amplicon pour le séquençage.

#### 3.2.4.3. Réaction de séquence et séquençage

Une purification des amplicons a été effectuée par ajustement du volume précédent à 50 µL avec de l'eau, puis ajout de 100 µL de tampon *Buffer NT*. Ce mélange a été lavé par centrifugation sur colonne avant deux autres lavages par 700µL chacun de tampon *Buffer NT3*. Les amplicons purifiés ont été récupérés après élution par 30 µL de tampon *Buffer NE* et conservés à 4°C avant séquençage. Le mix de séquençage contenait pour chaque réaction : 4 µL de *DTCS Quick*, 10.7 µL d'eau, 2 µL d'amplicons, 3 µL d'eau et les amorces *forward* ou *reverse* à 7,5 nM pour un volume final de 20 µL. Le programme



utilisé sur le thermocycleur Applied Biosystems Veriti™ (Thermo-Fisher®) était le suivant :

- 2 minutes à 95°C
- 60 cycles identiques :
  - o 10 secondes à 96°C
  - o 10 secondes à 50°C
  - o 4 minutes à 60°C
- Arrêt de l'amplification et conservation à 4°C

L'analyse en séquenceur automatique des produits de réactions de séquence a requis une étape préalable de purification, enchainant trois lavages successifs, avec 60 µL d'éthanol à 95% (centrifugation à 4°C pendant 10 minutes et à 3500 RCF), puis deux fois avec 200 µL d'éthanol à 70% (centrifugation à 4°C pendant 3 minutes et à 3500 RCF). Après séchage, 40 µL de SLS (*Sample Loading Solution*) ont été ajoutés dans chaque puits, ainsi qu'une goutte d'huile 15 à 30 minutes après le SLS. Le séquençage a utilisé un programme "500.550 pb 15 secondes" sur le séquenceur GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter®). Après extraction informatique des données de séquences, une comparaison aux bases de données a été effectuée. La base de données BIBI a été utilisée pour l'ADNr 16S, *tuf* et *rpoB*. Le gène *gap* n'étant pas recensé dans cette base de données, la plateforme BLAST du NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a été utilisée pour ce dernier.

### 3.3.Synthèse de biofilm

#### 3.3.1. Tests de croissance en milieux liquides

Afin d'optimiser la production *in vitro* d'un éventuel biofilm par *S. saccharolyticus* dans un milieu liquide, il a été nécessaire de tester sa croissance dans différents milieux liquides. La synthèse de biofilm par d'autres SCN tels que *S. lugdunensis* a été précédemment étudiée<sup>70</sup>. Nous avons utilisé comme témoin dans notre expérience une souche de *S. lugdunensis* productrice de biofilm<sup>70</sup>. La croissance de cette souche témoin requiert un milieu liquide de type Trypticase-Soja (TS) enrichi en glucose à 1%. Ce milieu a donc été testé ainsi que deux autres : le bouillon *Brain-Heart infusion* (BHI ou bouillon Cœur-Cerveau) et le bouillon Schaedler® (Bio-Rad®). Tous les isolats cliniques et la souche témoin CIP ont été testés. Les durées d'incubation à 37°C en atmosphère anaérobie

de chaque échantillon ont été variables en fonction du milieu utilisé et ont été interrompues lorsque la croissance était jugée bien visible à l'œil nu. Puis, le protocole dédié à la formation de biofilm en aérobiose par *S. lugdunensis* a été appliqué à la souche témoin de *S. lugdunensis* et à deux souches de *S. saccharolyticus* (la souche CIP et l'isolat du patient index).

### **3.3.2. Synthèse de biofilm en bouillon TS glucosé à 1%**

Le protocole de formation *in vitro* et en anaérobiose de biofilm chez *S. saccharolyticus* en plaque de polystyrène à 6 puits stériles à fond plat (Falcon®) était le suivant :

J-2 : Préparation d'une solution auto-clavée de glucose à 50%, repiquage des souches, puis préparation d'un bouillon TS glucosé à 1%.

J0 : Inoculation de plusieurs colonies (2 ou 3) bien isolées dans 5 mL de bouillon TS glucosé à 1%.

J6 : Ajustement de la turbidité à 1 McF dans une ampoule contenant 2 mL de solution TS glucosé à 1%. Dilution au 1/50 dans un nouveau bouillon TS glucosé à 1% (14,7 mL de TS glucosé à 1% + 300 µL de bouillon ajusté à 1 McF). Distribution de 3 mL dans 3 des 6 puits et réalisation d'un témoin négatif avec 3 mL de bouillon TS glucosé à 1% dans l'un des 3 puits restants. Incubation pendant 4 jours en atmosphère anaérobie à 37°C.

J10 : Elimination du liquide de chaque puits par aspiration. Double rinçage à l'eau distillée. Séchage à l'air libre. Distribution de 2 mL par puits de safranine 0,1% et maintien à température ambiante pendant 1 minute. Elimination de l'excédent de colorant puis rinçage à l'eau distillée deux fois successivement. Séchage à l'air libre. Solubilisation de la safranine par ajout de 2 mL par puits d'acide acétique glacial à 30%. Mesure de l'absorbance en cuve par spectrophotométrie à 495 nm.

### **3.3.3. Synthèse de biofilm en bouillon Schaedler®**

Le protocole était identique au précédent mais avec du bouillon Schaedler® à la place du bouillon TS glucosé à 1%. Du fait de la croissance plus rapide du *S. saccharolyticus* dans le bouillon Schaedler®, les durées d'incubation en anaérobiose à chaque étape ont été réduites à 48h :

J-2 : repiquage des souches

J0 : inoculation en bouillon Schaedler®

J2 : mise en plaque 6 puits

J4 : révélation du biofilm et mesure de l'absorbance

### 3.4. Antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé. A partir d'une culture pure de *S. saccharolyticus* à 48h, une suspension de 1 McF a été préparée en milieu NaCl 0,85% et ensemencée par écouvillonnage sur des géloses BBA (*Brucella Blood Agar*) incubées, après dépôt des disques d'antibiotiques, pendant 48h à 37°C en anaérobiose. Les antibiotiques testés étaient ceux de l'antibiogramme des staphylocoques selon les recommandations de la société européenne de microbiologie (CASFM-EUCAST) version 2013. Un disque de métronidazole a cependant été ajouté en raison du caractère anaérobie de *S. saccharolyticus*. Enfin, la recherche d'une pénicillinase a été effectuée par un test dit de « céfinase » consistant à déposer une colonie bactérienne sur un disque imprégné de nitrocéfine.

## 4. Résultats

### 4.1. Identification

#### 4.1.1. Caractères culturels, macroscopiques et microscopiques

Les souches de *S. saccharolyticus* ont été cultivées en 48h en anaérobiose à 37°C sur gélose TSAB ou gélose au sang. Aucune croissance n'a été observée en aérobiose à 37°C. Les colonies obtenues étaient fines, cultivant en tapis, circulaires, transparentes puis blanches en 48h et devenant blanches-grises en 5 jours. La photographie ci-dessous a été prise à 72h.

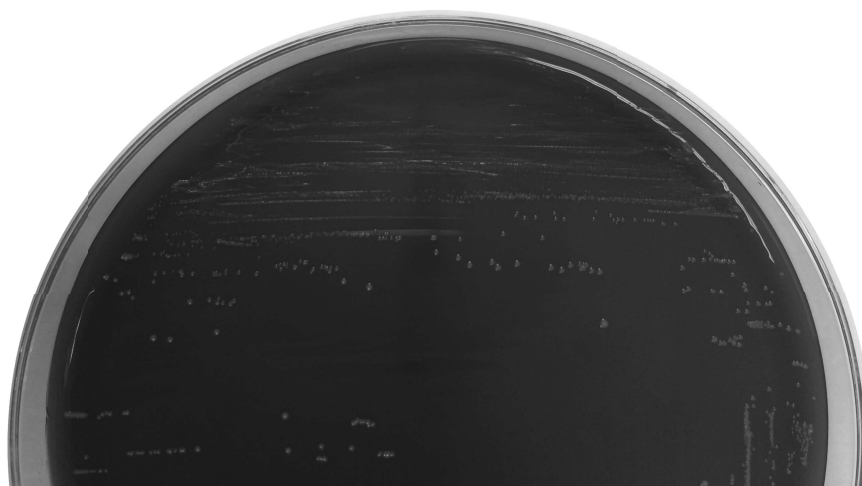


Figure 12 : aspect macroscopique des colonies de la souche de *S. saccharolyticus* du patient index sur gélose TSAB après 72h en anaérobiose à 37°C.

En microscopie, *S. saccharolyticus* est un cocci à Gram positif se disposant en amas, par paires, isolément ou en tétrades comme le montre la photographie suivante, prise au grossissement x1000 pour la souche de notre patient index.

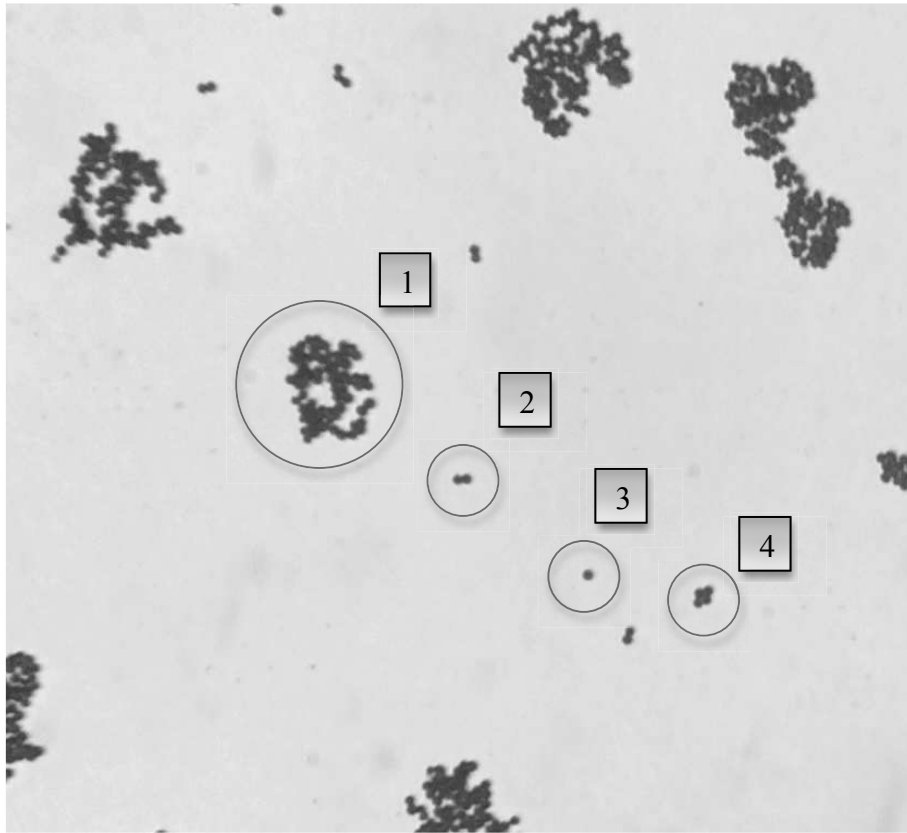


Figure 13 : aspect microscopique de la souche de *S. saccharolyticus* du patient index au grossissement x1000. Disposition des cocci à Gram positif, 1 : en amas, 2 : par paires, 3 : isolé, 4 : en tétrades.

#### 4.1.2. Galeries d'identification biochimique et autres caractères biochimiques

Le tableau suivant présente les résultats obtenus avec les galeries biochimiques API® 20A pour l'ensemble des souches après incubation en anaérobiose pendant 48h :

Tableau 6 : résultats de l'identification des souches patients et CIP de *S. saccharolyticus* par galerie API® 20A. Le pourcentage d'identification estime la proximité relative du profil observé aux différents taxons de la base de données. La typicité exprime le caractère typique de la souche à l'intérieur d'un taxon. Sa valeur qui varie de 0 à 1 reflète le nombre de caractère biochimique à l'encontre.

N° souche	Code Api® 20A	Qualité identification	Nom du germe	% identification	Typicité
2988	40005046	Très bonne	<i>S. saccharolyticus</i>	99,8	1,00
4582	00005046	Excellente	<i>S. saccharolyticus</i>	99,9	0,87
3579	00005046	Excellente	<i>S. saccharolyticus</i>	99,9	0,87
0138	00005046	Excellente	<i>S. saccharolyticus</i>	99,9	0,87
CIP	40005046	Très bonne	<i>S. saccharolyticus</i>	99,8	1,00

Toutes les souches ont été parfaitement identifiées comme appartenant à l'espèce *S. saccharolyticus*. Le pourcentage d'identification était de 99,8 à 99,9% avec une typicité comprise entre 0,87 et 1,00. Deux profils biochimiques se dégagent de ces tests et diffèrent par le métabolisme du glucose (métabolisé pour les souches 2988 et CIP et non pour les trois autres souches).

Pour une identification à 99,8% et une typicité maximale à 1,00 le profil type d'un *S. saccharolyticus* obtenu sur une galerie API® 20 A est détaillé ci-dessous :

Tableau 7 : profil nécessaire pour l'identification la plus fiable d'un *S. saccharolyticus* par galerie API® 20A.

Tests / Caractères	Résultats	Tests / Caractères	Résultats
Indole	-	Glycérol	+
Urée	-	Cellobiose	-
Glucose	+	Mannose	+
Mannitol	-	Mélezitose	-
Lactose	-	Raffinose	-
Saccharose	-	Sorbitol	-
Maltose	-	Rhamnose	-
Salicine	-	Tréhalose	-
Xylose	-	Catalase	+
Arabinose	-	Spores	-
Gélatine	-	Gram	+
Esculine	-	Cocci	+

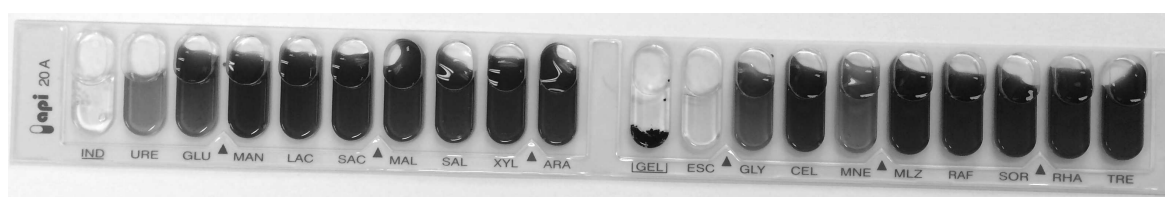


Figure 14 : photographie de la galerie API® 20A obtenue pour la souche CIP de *S. saccharolyticus*.

Les caractères biochimiques de *S. saccharolyticus* selon la base de données de Biomérieux® sont donc : le métabolisme du glucose, du glycérol et du mannose ainsi que la faculté de métaboliser le peroxyde d'hydrogène par une catalase.

Les résultats de la galerie API® Staph incubée en atmosphère anaérobie pendant 24 à 48h sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : résultats de l'identification des souches patients et CIP de *S. saccharolyticus* par galerie API® Staph.

N° souche	Code Api® Staph	Qualité identification	Nom du germe	% identification	Typicité
2988	6102101	Bonne	<i>S. capitis</i>	95,9	1,00
4582	6102140	Bonne au genre	<i>S. capitis</i> <i>S. schleiferi</i>	68 30,4	0,42 0,55
3579	6102100	Bonne	<i>S. capitis</i>	97,6	0,88
0138	6102140	Bonne au genre	<i>S. capitis</i> <i>S. schleiferi</i>	68 30,4	0,42 0,55
CIP	6102142	Code inexistant	-	-	-

La galerie Api® Staph ne contient pas l'espèce *saccharolyticus* dans sa base de données et n'a donc pu que rapprocher le profil des isolats testés de ceux d'espèces proches. Ainsi, les souches 2988 et 3579 (patient index) ont été « identifiées » comme appartenant à l'espèce *capitis*, avec un niveau de confiance qui peut être qualifié de satisfaisant pour ce système. Les deux autres isolats cliniques n'ont pu être identifiés qu'au rang de genre et non au rang d'espèce. Cependant leurs caractères étaient très proches de ceux des souches 2988 et 3579, suggérant qu'ils se rapprochent plutôt de l'espèce *capitis* (68% d'identification et typicité de 0,42) et un peu moins de l'espèce *schleiferi* (identification à seulement 30,4% et typicité à 0,55). La souche CIP possédait des caractères proches mais son profil ne permettait pas d'identification car il ne correspondait à aucun profil de la base de données.

A titre d'exemple, le profil biochimique obtenu pour la souche de notre patient index est donné ci-dessous:

Tableau 9 : profil des caractères biochimiques obtenus sur galerie API® Staph pour la souche de *S. saccharolyticus* du patient index.

Tests / Caractères	Résultats	Tests / Caractères	Résultats
Témoin négatif	-	Nitrate	+
Glucose	+	β-naphtyl phosphate	-
Fructose	+	Sodium pyruvate	+
Mannose	+	Raffinose	-
Maltose	-	Xylose	-
Lactose	-	Saccharose	-
Tréhalose	-	Méthyl-glucopyranoside	-
Mannitol	-	N-acétyl-glucosamine	-
Xylitol	-	Arginine	-
Mélibiose	-	Urée	-

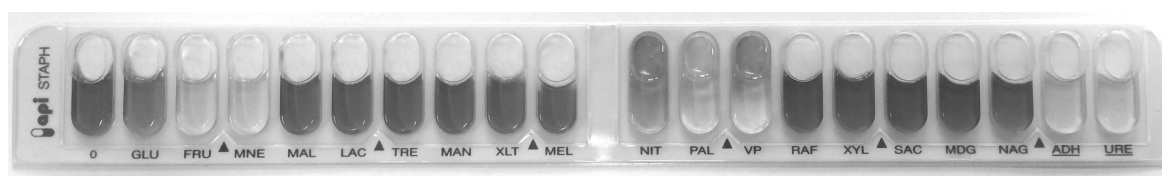


Figure 15 : photographie de la galerie API® Staph pour la souche de *S. saccharolyticus* du patient index.

Cette galerie a mis en évidence le métabolisme du fructose, du mannose, la réduction du nitrate en nitrite et la production d'acétyl-méthyl-carbinol (par le test au sodium pyruvate) par la souche du patient index. Le métabolisme du glucose est moins franc mais était bien présent pour cette souche.

La synthèse de l'ensemble des tests biochimiques réalisés confirme donc le métabolisme par nos 5 souches des composés suivants : le glucose, le fructose, le mannose et le glycérol. Parmi les autres caractères il convient de retenir la présence d'une catalase, d'une nitrate réductase et la production d'acétyl-méthyl-carbinol. D'autres caractères présents de façon inconstante selon les souches peuvent être retenus : l'acidification du N-acétyl-glucosamine ainsi que la présence d'une arginine dihydrolase et d'une uréase.



### 4.1.3. Spectrométrie de masse

Le tableau ci-dessous reprend les résultats obtenus par spectrométrie de masse :

Tableau 10 : résultats de l'identification des souches patients et CIP par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Un score supérieur à 2 avec une catégorisation en A correspond à une bonne identification de la souche au rang d'espèce.

N° souche	Nombre d'occurrence à <i>S. saccharolyticus</i>	Nom du germe	Score le plus élevé
2988	5/10	<i>S. saccharolyticus</i>	A 2,359
4582	3/10	<i>S. saccharolyticus</i>	A 2,185
3579	3/10	<i>S. saccharolyticus</i>	A 2,260
0138	3/10	<i>S. saccharolyticus</i>	A 2,407
CIP	5/10	<i>S. saccharolyticus</i>	A 2,407

Toutes les souches ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *S. saccharolyticus*. La qualité de ces identifications était optimale selon les recommandations du fournisseur, avec des scores supérieurs à 2 (de 2,185 à 2,407) et une catégorisation en A pour chaque germe. Le nombre d'occurrences à *S. saccharolyticus* donné par l'automate varie de 3 à 5 sur 10 selon les isolats, sachant que la base de données de Bruker® contient cinq souches différentes de *S. saccharolyticus*.

### 4.1.4. Biologie moléculaire

L'amplification de fragments des gènes *rpoB*, *tuf1* et *gap* a généré dans tous les cas un fragment d'ADN unique, et n'a révélé aucune contamination pour le témoin négatif. Les conditions de PCR choisies étaient donc optimales pour envisager le séquençage de ces 3 gènes. En revanche, les mêmes conditions n'ont permis aucune amplification des fragments des gènes *tuf2* et *sodA*, et l'étude de ces gènes n'a donc pas été poursuivie.

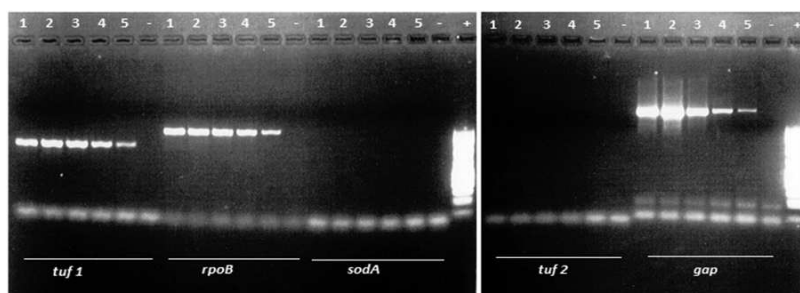


Figure 16 : photographies des gels de migration révélant les bandes de fragments d'ADN amplifiés pour chaque gène (*tuf1*, *rpoB*, *sodA*, *tuf2*, *gap*) et pour chaque souche. Puits n°1 : 4582 n°2 : 3579 n°3 : 0138 n°4 : 2988 n°5 : CIP 103275T (-) : témoin négatif (+) : marqueur de poids moléculaire.



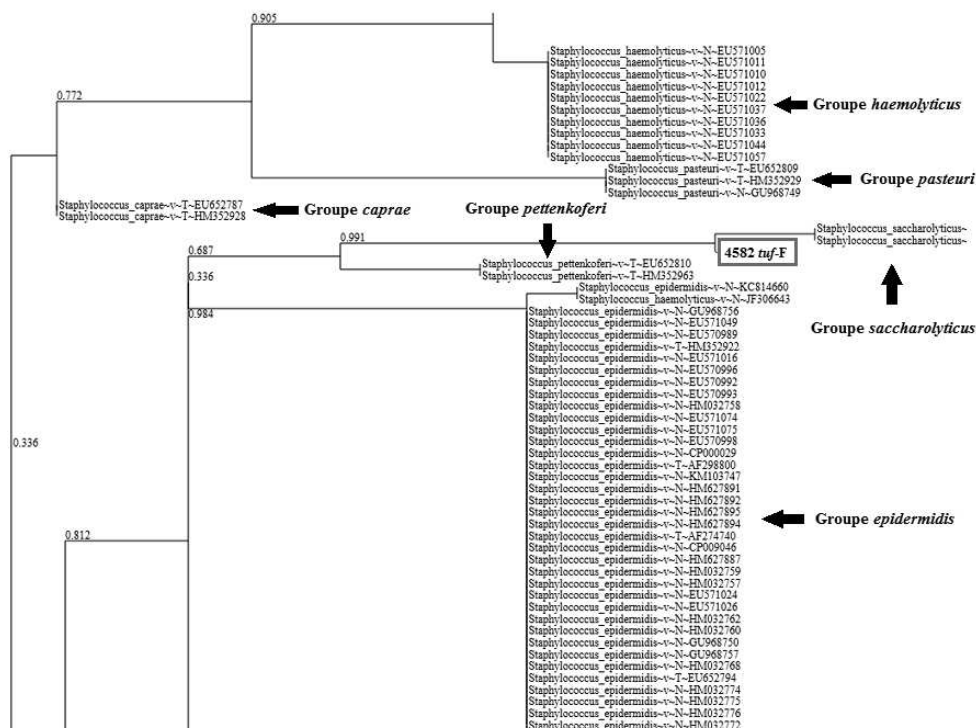


Figure 18 : dendrogramme issu du séquençage du gène *tuf* de la souche de *S. saccharolyticus* 4582.

## 4.2. Synthèse de biofilm

### 4.2.1. Tests de croissance en milieux liquides

Pour le milieu TS glucosé à 1%, l'incubation en atmosphère anaérobie a été interrompue au 6<sup>ème</sup> jour. Une croissance bactérienne était observée dans tous les tubes, cependant celle-ci était très faible contrairement à celle de la souche témoin de *S. lugdunensis*. La croissance en milieu BHI était satisfaisante au 4<sup>ème</sup> jour, mais seulement dans la moitié des tubes. Pour le milieu Schaedler®, 48 heures étaient suffisantes pour observer une croissance franche dans tous les tubes ensemencés.

#### 4.2.2. Synthèse de biofilm en bouillon TS glucosé à 1%

Après déduction de la valeur du blanc obtenue pour le témoin négatif, les résultats d'absorbance à 495 nm relevés pour les 3 souches testées étaient les suivants :

Tableau 12 : valeurs d'absorbance (DO) mesurées à 495 nm pour le test de synthèse de biofilm réalisé en triplicate sur les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon TS glucosé à 1%.

Nom du germe	DO mesurées à 495 nm (triplicate)		
<i>S. lugdunensis</i> (témoin positif)	3,820	4,100	2,760
<i>S. saccharolyticus</i> (CIP)	1,190	1,050	1,270
<i>S. saccharolyticus</i> (3579)	0,167	0,224	0,252

L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la quantité de biofilm produite et peut être schématisée par un histogramme :

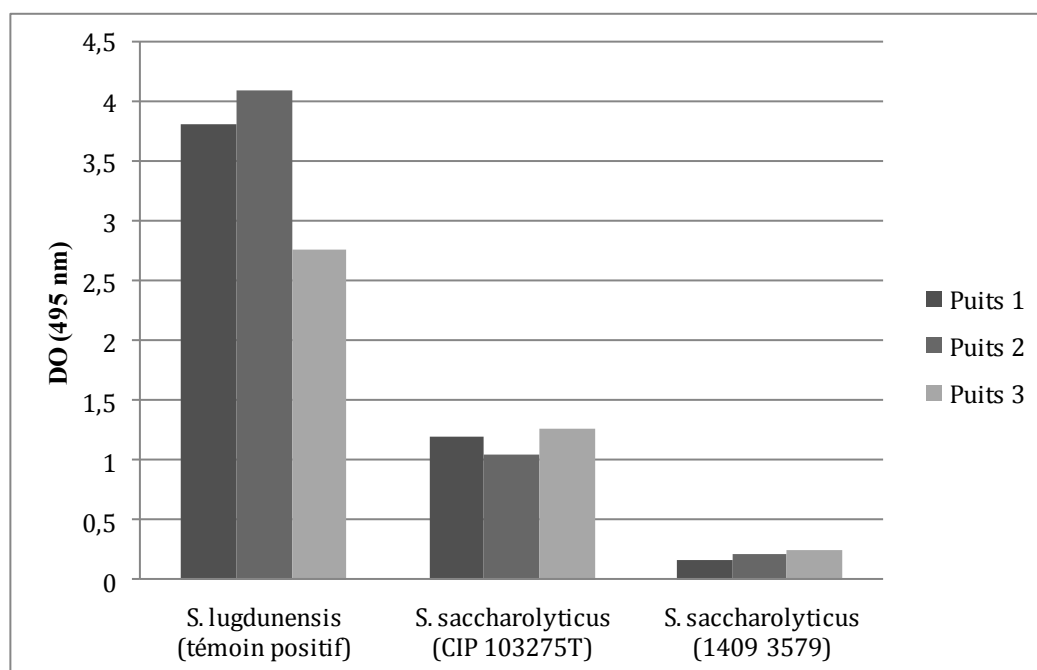


Figure 19 : histogrammes reflétant l'importance du biofilm produit par les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon TS glucosé à 1%.

Les deux souches de *S. saccharolyticus* testées étaient donc capables de produire un biofilm. Un biofilm d'importance notable était produit par la souche CIP tandis que celui fabriqué par la souche patient était 4 à 5 fois moins important. Les résultats des manipulations en triplicate étaient reproductibles avec des valeurs relativement stables.

### 4.2.3. Synthèse de biofilm en bouillon Schaedler®

Dans ce milieu les résultats des absorbances étaient les suivants :

Tableau 13 : valeurs d'absorbance (DO) mesurées à 495 nm pour le test de production de biofilm réalisé en triplicate sur les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon Schaedler®.

Nom du germe	DO mesurées à 495 nm (triplicate)		
<i>S. lugdunensis</i> (témoin positif)	7,070	6,740	6,730
<i>S. saccharolyticus</i> (CIP)	0,880	0,960	0,810
<i>S. saccharolyticus</i> (3579)	2,450	2,250	2,220

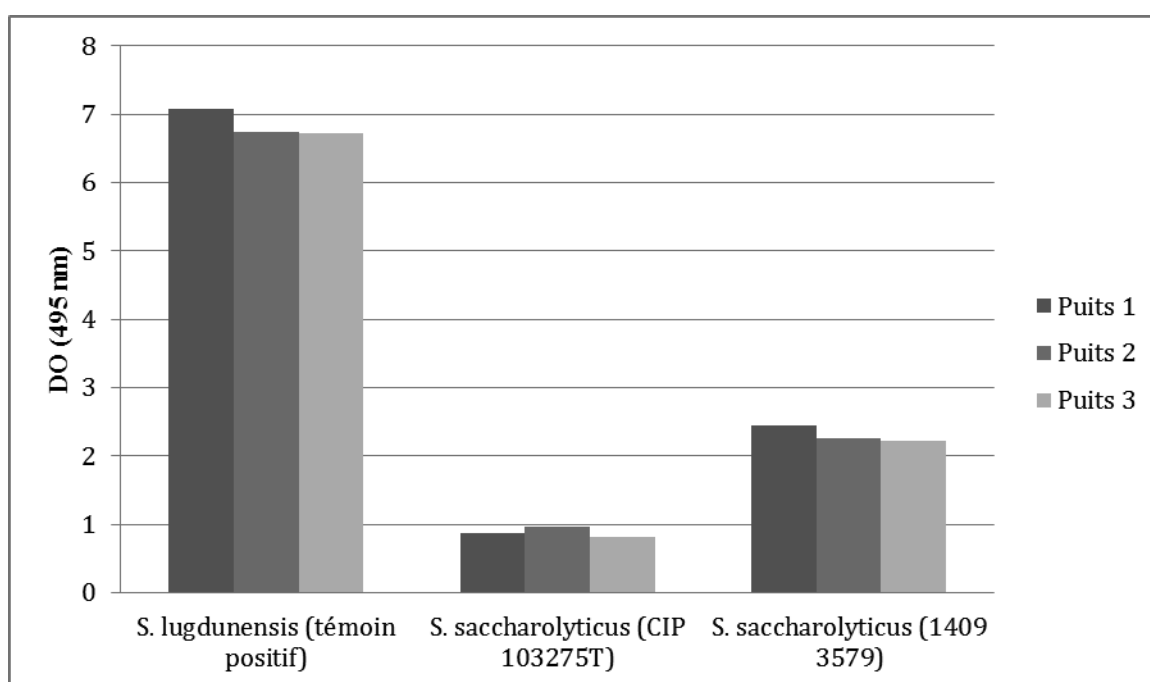


Figure 20 : histogrammes reflétant l'importance du biofilm produit par les souches CIP, patient index et témoin positif en bouillon Schaedler®.

Comme en milieu TS glucosé à 1%, la souche CIP et la souche clinique testées en milieu Schaedler® étaient capables de produire du biofilm, en quantité importante notamment pour la souche clinique dont la production était deux fois plus importante que celle de la souche CIP.

#### 4.2.4. Synthèse des résultats

La synthèse des résultats précédents sur un graphique commun permet de mieux apprécier les variations du biofilm selon les souches et les milieux.

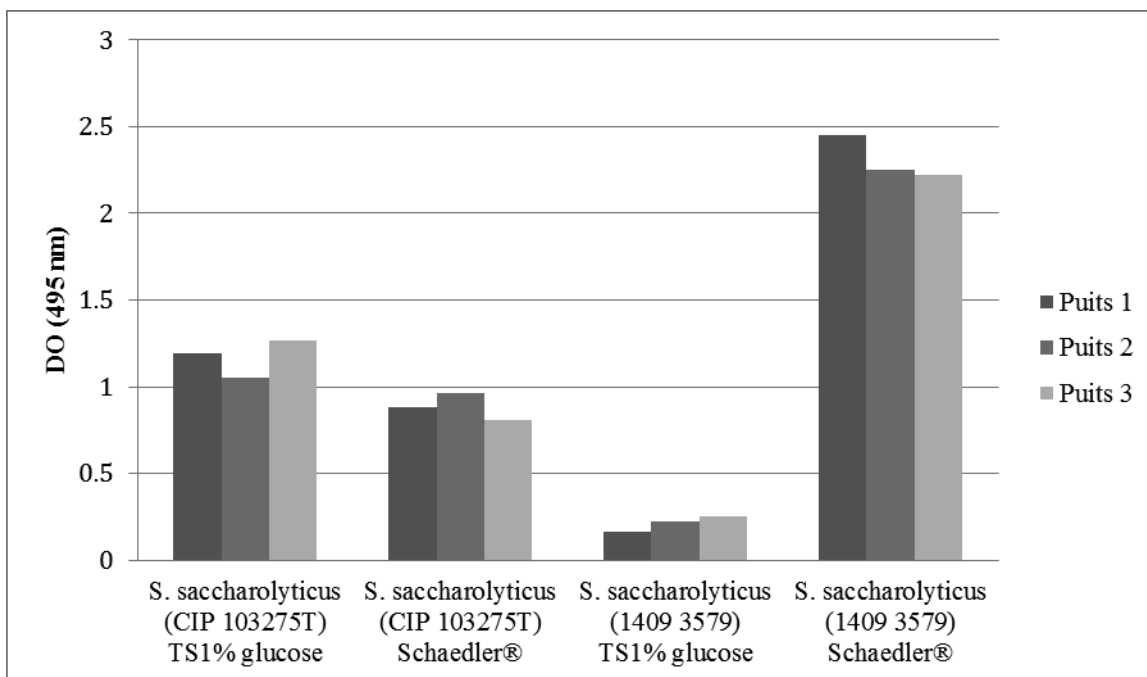


Figure 21 : histogrammes reflétant la production de biofilm selon les souches et les bouillons utilisés.

Tandis que pour la souche CIP la production de biofilm était équivalente dans les deux milieux, elle différait significativement pour la souche de notre patient index, avec une majoration d'un facteur 10 en milieu Schaedler®.

### 4.3. Antibigrammes

Le tableau ci-dessous détaille la sensibilité aux différentes molécules antibiotiques testées habituellement au laboratoire pour les staphylocoques. Ce panel intègre en outre le métronidazole, habituellement testé pour les germes anaérobies.

Tableau 14 : profils de sensibilité aux antibiotiques pour l'ensemble des souches de *S. saccharolyticus* de l'étude.

Molécules	3579	4582	0138	2988	CIP
Pénicilline G	S	S	S	S	S
Pénicillinase (par test de céfinase)	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
Méticilline	S	S	S	S	S
Tobramycine	S	S	S	S	S
Amikacine	S	S	S	S	S
Gentamicine	S	S	S	S	S
Erythromycine	S	S	S	S	S
Lincomycine	S	S	S	S	S
Pristinamycine	S	S	S	S	S
Cotrimoxazole	R	R	R	R	R
Furanes	S	S	S	S	S
Rifampicine	S	S	S	S	S
Acide fusidique	S	S	S	S	S
Métronidazole	R	R	R	R	R
Ofloxacine	S	S	S	S	S
Fosfomycine	S	S	S	S	S
Doxycycline	S	S	S	S	S
Minocycline	S	S	S	S	S
Linézolide	S	S	S	S	S
Vancomycine	S	S	S	S	S
Teicoplanine	S (0,25 mg/L)	NR	NR	NR	NR

Pour les molécules testées, les souches présentaient toutes le même profil de sensibilité. Il n'y avait pas de résistance à la pénicilline (absence de pénicillinase) ni aux autres bêta-lactamines (pas de résistance à la méticilline). Les autres familles antibiotiques actives étaient : les aminosides, les macrolides, les nitrofurantoïnes, la rifampicine, l'acide fusidique, les fluoroquinolones, la fosfomycine, les tétracyclines, les oxazolidinones et les glycopeptides. Seules deux résistances ont été observées, au métronidazole (Flagyl®) et au cotrimoxazole (Bactrim®).

## 5. Discussion

Les infections à staphylocoques à coagulase négative sont une préoccupation quotidienne en milieu hospitalier et constituent un défi diagnostique permanent pour les laboratoires de bactériologie. Certaines espèces sont plus rarement isolées, et donc assez méconnues, du fait de leur exigence de croissance. C'est le cas de l'espèce *S. saccharolyticus*, à laquelle nous nous sommes intéressés dans ce travail, et qui cultive principalement en atmosphère anaérobie. Cette espèce peu connue et très atypique par son caractère anaérobie a rarement été rapportée comme pathogène dans la littérature. Elle peut vraisemblablement appartenir à la flore bactérienne cutanée, et tandis que certaines espèces de SCN colonisent préférentiellement le cuir chevelu (*S. capitis*), la moitié supérieure (*S. epidermidis*) ou inférieure (*S. lugdunensis* et *S. saprophyticus*) du corps <sup>1</sup>, elle semble plutôt siéger au niveau thoracique. En effet, nous l'avons isolée ici dans une infection locale de défibrillateur cardiaque, et comme contaminant de plusieurs ponctions pleurales, alors que nous ne l'avons jamais isolée de cultures anaérobies d'origine céphalique, uro-digestive ou génitale.

Les cinq cas cliniques publiés à ce jour ont été rapportés chez des patients aux profils variés (âge, sexe, antécédents médicaux), fébriles dans 3/5 des cas et présentant tous un syndrome inflammatoire biologique évocateur d'une infection invasive. Le tropisme était également varié, affectant poumon, disque intervertébral, valves cardiaques (native et prothétique), ou responsable de bactériémie d'étiologie inconnue, et d'évolution fatale dans trois cas sur cinq. Le cas clinique que nous rapportons ici, une extériorisation d'un défibrillateur cardiaque, est moins aigu que les cas publiés. En effet, en dehors d'un épisode de frisson noté à l'anamnèse, il n'a pas été observé de fièvre ni de syndrome inflammatoire biologique chez notre patient, l'extraction du défibrillateur n'a pas ramené de pus et l'échographie trans-oesophagienne était négative. Aucun des critères d'endocardites, mis à jour en 2015 <sup>23</sup>, n'était présent chez notre patient. Le diagnostic retenu était donc celui d'une infection locale de la loge du défibrillateur, cliniquement avérée et confirmée au laboratoire par de multiples cultures positives émanant des différentes sondes du dispositif. Les cinq isolements que nous avons obtenus en cultivant des prélèvements distincts constituent un argument majeur d'infection locale. Les SCN sont des contaminants fréquents des prélèvements bactériologiques, et une étude de 1990 sur les infections de prothèses articulaires a démontré que le nombre minimal de



prélèvements à réaliser au bloc opératoire pour diagnostiquer une infection et éliminer une contamination était de cinq, dont au moins trois devaient être positifs avec la même souche<sup>71</sup>. L'application de ces critères à notre cas clinique renforce donc la certitude d'une infection locale et exclut une contamination ou une extériorisation strictement mécanique du bio-matériel. Malgré l'absence de tout critère d'endocardite, le traitement de principe de l'infection locale d'un dispositif cardiaque implantable après retrait de ce dernier peut être celui d'une endocardite, avec minimum 4 à 6 semaines de traitement en raison du risque majeur encouru<sup>23</sup>. En complément de l'isolat de notre patient et afin de pouvoir travailler sur plusieurs isolats cliniques de *S. saccharolyticus*, nous avons collecté quelques souches supplémentaires issues des cultures anaérobies de ponctions pleurales, *a priori* considérées comme des contaminants cutanés car obtenues en dehors de tout contexte infectieux.

Les isolats de *S. saccharolyticus* que nous avons collectés provenaient tous de cultures de prélèvements cliniques en atmosphère anaérobie, et ce caractère très atypique pour un staphylocoque peut faire suspecter d'emblée cette espèce inhabituelle. Les souches ont ultérieurement été sub-cultivées sur des géloses au sang ou des géloses pour germes anaérobies, pendant cinq jours à 37°C dans des conditions d'atmosphère aérobie ou anaérobie. Les résultats obtenus, 100% de cultures positives en anaérobiose et 0% en aérobie, confirment bien le caractère anaérobie strict de cette espèce, déjà rapporté dans les précédents cas cliniques publiés<sup>63,64,65,66</sup>. Dans tous ces cas comme dans les nôtres, l'espèce cultivait exclusivement en anaérobiose, alors qu'Evans, dans une étude de 1977, rapportait que 19% de 178 souches étaient aéro-tolérantes, voire aérobies strictes<sup>57</sup>. Les souches de cette étude ancienne n'étaient identifiées à l'époque que par leurs caractères biochimiques, et il serait très intéressant aujourd'hui de confirmer ou non leur appartenance à l'espèce *saccharolyticus* par les techniques spectrométriques et moléculaires, afin de déterminer si certains représentants de cette espèce peuvent réellement être aérobies. En tout état de cause, le fait que *S. saccharolyticus* soit la seule espèce de son genre à être anaérobie explique sa faible prévalence d'isolement en comparaison des autres SCN. En effet, les prélèvements ne sont pas tous ensemencés en atmosphère anaérobie, et ceux qui le sont ne séjournent généralement pas plus de cinq jours à l'étuve, ce qui peut être insuffisant à la croissance de *S. saccharolyticus*. Les cathéters en sont un parfait exemple car majoritairement positifs à SCN mais non ensemencés en anaérobiose et donc jamais positifs à *S. saccharolyticus*. A l'inverse, la prévalence de liquides pleuraux parmi nos prélèvements positifs à *S. saccharolyticus* est

probablement liée au fait que ces liquides sont ensemencés à la fois en aérobiose et en anaérobiose. Des études recherchant la présence de bactéries anaérobies dans des dispositifs à risque, tels que les cathéters ou canules d'assistance circulatoire, permettraient de mieux connaître leur prévalence de colonisation par *S. saccharolyticus*. Cependant, il est probable que la prévalence de cette espèce dans la colonisation de matériel endovasculaire soit faible, puisque nous ne l'avons jamais isolée lors de bactériémies ou d'endocardites.

Tandis que la catalase et la coagulase, deux caractères majeurs utilisés conventionnellement pour identifier les staphylocoques, présentent des résultats constants pour nos souches comme pour celles de la littérature <sup>58,60</sup>, les données du métabolisme glucidique sont plus aléatoires. La fermentation du glycérol et du mannose est constante pour nos souches et celles de la littérature <sup>57,58,60</sup>, mais celle du glucose n'a été observée que pour trois de nos cinq isolats à l'aide de la galerie Api® 20A. Cependant, il est possible que la durée d'incubation préconisée de 48 heures de cette galerie soit insuffisante et que certains isolats n'aient pas le temps de croître suffisamment pour faire virer l'indicateur coloré du glucose. Cet écueil n'a cependant pas réduit l'efficacité de cette galerie, dédiée aux bactéries anaérobies, et qui a parfaitement identifié nos isolats. Dans la galerie Api® Staph incubée en anaérobiose, tous nos isolats ont fermenté le glucose. Mais cette galerie destinée à l'identification des staphylocoques s'est avérée au final beaucoup moins performante que la galerie Api® 20A. *S. saccharolyticus* tient son nom de la fermentation du saccharose, rapportée par la description historique de Foubert et Douglas en 1948. Cependant, ce caractère ne s'est confirmé ni dans les études ultérieures <sup>60</sup>, ni dans la notre, et était donc peu adapté pour nommer l'espèce.

Comme pour toute méthode d'identification, les performances des tests biochimiques reposent en partie sur l'exhaustivité de leur base de données. Lorsqu'une espèce est absente de la base d'un test celui-ci ne peut évidemment l'identifier et il lui attribue alors *a priori* le nom de l'espèce la plus proche. Par exemple, avant leur mise à jour, des systèmes tels que les cartes Vitek GPI (Biomérieux®) ou le Staf-System 18-R (Liofilchem®) ne permettaient pas l'identification de *S. lugdunensis*, et rendaient pour ce germe près de 80% d'identifications erronées et de 21% à 100% d'identifications impossibles <sup>30,31</sup>. De même, la base de la galerie Api® Staph ne contient pas l'espèce *saccharolyticus*, il est donc normal de ne pas l'identifier avec cette technique. Néanmoins,

pour deux de nos souches, la galerie a répondu *S. capitis* avec un bon niveau de confiance, montrant qu'une lecture non critique peut conduire à un faux diagnostic d'espèce. Contrairement à la galerie Api® Staph, la galerie Api® 20A nous a répondu 100% de bonnes identifications, une performance comparable à celle des galeries spécifiques des staphylocoques pour les espèces de haute prévalence clinique, telle que *S. epidermidis*<sup>30,32,33,34</sup>. La galerie Api® 20A et d'autres galeries de type anaérobie ont donc un intérêt particulier pour l'identification de ce staphylocoque atypique. Les données restent cependant limitées dans ce domaine, puisque les évaluations des systèmes n'ont jamais intégré en grand nombre d'isolats de *S. saccharolyticus* aux populations testées.

Les résultats obtenus par séquençage de l'ADNr 16S pour l'ensemble de nos souches s'accordent aux données de la littérature<sup>39</sup>, et confirment l'inaptitude de ce gène à identifier l'espèce *saccharolyticus*, du fait de la proximité des autres espèces du *cluster*, *S. capitis* et *S. caprae*. Des travaux récents décrivant des infections de prothèses à *S. caprae* et *S. capitis* sont fondés sur un séquençage 16S : à la lueur de nos résultats, il semble licite en l'occurrence de s'interroger sur une éventuelle sous-estimation de l'espèce *S. saccharolyticus* dans une telle étude<sup>72</sup>. De même, pour le diagnostic des infections bactériennes décapitées par un traitement, et donc en l'absence de toute culture, notre laboratoire utilise essentiellement le séquençage 16S. Nos résultats suggèrent donc qu'en cas d'identification d'une espèce de ce *cluster* il serait prudent de compléter le diagnostic en séquençant en complément un gène plus discriminant. Contrairement à ce que nous pouvions craindre pour les gènes *rpoB*<sup>43</sup> et *tuf*<sup>44</sup>, qui semblaient mal dissocier l'espèce *saccharolyticus* de certains autres SCN, de très bonnes identifications ont été obtenues. Comme dans les travaux de Bergeron et al.<sup>44</sup>, l'identification par le gène *gap* s'est également avérée excellente. Ces techniques moléculaires, à condition que les gènes d'intérêt soient judicieusement choisis, peuvent donc être considérées comme des méthodes de référence. Cependant, leur intégration à la routine d'un laboratoire de bactériologie est généralement peu envisageable, les protocoles nécessaires à la réalisation des PCRs et séquençages restant artisanaux, complexes à mettre en œuvre, et d'un coût supérieur à celui des autres techniques.

L'identification par MALDI-TOF des souches de ce travail a donné 100% d'identifications valides au rang d'espèce, aussi bien avec un score supérieur à 1,7 préconisé par Han<sup>52</sup> que supérieur à 2 selon les recommandations du fournisseur. Les

performances de cette technique semblent donc optimales et correspondent à celles décrites dans la littérature pour les principaux SCN<sup>47,48,49,50</sup>. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucun travail ayant évalué cette méthode et incluant *S. saccharolyticus*. L'étude d'un plus grand nombre de souches permettrait de confirmer l'excellente performance du MALDI-TOF pour l'identification de cette espèce et d'enrichir la base de données. En effet, bien que l'identification soit possible pour une espèce dont la base recense moins de cinq représentants<sup>47</sup>, la probabilité de bonne identification d'une espèce augmente avec son nombre de représentants (10 souches au maximum). Par exemple, la base de données Bruker® contient 10 souches de *S. epidermidis*, la meilleure identification étant alors d'obtenir les 10 occurrences possibles à *S. epidermidis*. Le nombre d'occurrences à *S. saccharolyticus* donné par l'automate dans notre travail variait de 3 à 5 selon les isolats. Sachant que la base de données de Bruker® ne contient que cinq souches différentes de *S. saccharolyticus* (communication personnelle du fournisseur), cela constitue le nombre maximal d'occurrences possibles pour cette espèce. Les souches 2988 et CIP ont ainsi été les mieux identifiées, générant des profils similaires aux 5 souches de la base de données. Il est important de noter que les souches de référence ATCC® et CIP ne figurent pas parmi les 5 souches de la base Bruker®, constituée de souches issues de collections allemandes. Aucune information n'est disponible quant aux techniques utilisées pour identifier ces *S. saccharolyticus* avant de les inclure dans ces collections. En conclusion, la spectrométrie de masse est donc la meilleure technique d'identification de *S. saccharolyticus*, du fait de ses bonnes performances, de sa rapidité, de son faible coût et de son accessibilité à un technicien non spécialisé, contrairement à la biologie moléculaire<sup>47,48</sup>. En l'absence de spectrométrie de masse, la combinaison de techniques complémentaires basées sur des principes distincts est probablement la meilleure alternative.

Les travaux publiés à ce jour sur l'espèce *S. saccharolyticus* se sont focalisés sur son identification et sur les cas cliniques observés. Notre étude est la première à mettre en évidence la capacité de cette espèce à produire un biofilm bactérien. Le milieu BHI, peu adapté à la croissance de *S. saccharolyticus*, a été logiquement écarté du protocole. En effet, la présence d'oxygène dans ce milieu fabriqué au laboratoire et non régénéré (non bouilli) crée une atmosphère aérobie inadaptée à *S. saccharolyticus*. En revanche, la croissance et la production de biofilm en milieu TS et en milieu Schaedler® nous ont permis de comparer les comportements de la souche CIP et de l'isolat de notre patient index. La souche de *S. lugdunensis* productrice de biofilm a été utilisée comme témoin

positif et les protocoles précédemment publiés pour cette souche par notre laboratoire <sup>70</sup> nous ont permis d'optimiser et de valider notre expérience. La croissance de l'espèce *S. lugdunensis* étant beaucoup plus rapide que celle de *S. saccharolyticus*, y compris en bouillon Schaedler® théoriquement dédié aux anaérobies, il n'est pas surprenant que sa production de biofilm mesurée à 48h soit au moins trois fois supérieure. Par ailleurs, il semble que la nature du milieu ait une incidence sur la production de biofilm de certains isolats, puisqu'en effet la production de biofilm par l'isolat de notre patient index était dix fois supérieure en milieu Schaedler® qu'en milieu TS. Cet « effet milieu » semble « souche dépendant » et n'était pas observé pour la souche CIP dans les mêmes conditions. Dans ce travail, nous n'avons pas exploré chez nos isolats l'existence de gènes de virulence candidats, tels que le locus *ica* impliqué dans la synthèse du biofilm chez d'autres SCN. Une telle recherche nécessite d'utiliser des amorces d'amplification dont la séquence se fonde à la fois sur les gènes connus et publiés pour des espèces voisines et sur le génome de l'espèce étudiée. A ce jour le séquençage complet du génome de *S. saccharolyticus* n'est pas disponible, et la recherche de gènes de virulence serait un travail d'envergure.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de nos isolats de *S. saccharolyticus* a révélé une complète similitude dans leur phénotype, très sensibles, comme dans la plupart des cas cliniques publiés <sup>60,64,66</sup>. Les bêta-lactamines, la pénicilline G et la méticilline sont apparues constamment actives. Selon la méta-analyse de Becker et al. de 2014, il est très rare que les SCN soient sensibles à la Pénicilline G. Le taux de résistance avoisinant en moyenne 90 à 95% toutes espèces confondues <sup>1</sup>, le fait de ne trouver de pénicillinase chez aucun de nos isolats est assez remarquable et peut être typique de l'espèce. *S. saccharolyticus* semble donc peu enclin à intégrer le plasmide de la pénicillinase et résisterait relativement à la pression de sélection des pénicillines, qui est déterminante dans l'acquisition de cette résistance <sup>54</sup>. Les cas cliniques de la littérature ne mettent *a priori* pas non plus en évidence de *S. saccharolyticus* porteurs de pénicillinase isolée, confortant cette hypothèse <sup>60,64,66</sup>. De même, aucune de nos souches n'était résistante à la méticilline. La résistance à la méticilline affectant habituellement plus de 70% des SCN, toutes espèces confondues <sup>1</sup>, l'hypothèse d'une faible susceptibilité à la pression de sélection peut également être évoquée. Cependant, cette résistance rare est possible et a été observée dans deux cas cliniques <sup>63,65</sup>. En plus de l'intérêt curatif que représente la sensibilité de l'espèce *S. saccharolyticus* aux bêta-lactamines, un intérêt supplémentaire est celui de sa sensibilité

croisée aux protocoles d'antibioprophylaxie chirurgicale habituellement prescrits en chirurgie thoracique et cardiaque. Cette sensibilité à la cefazoline prévient donc *a priori* la colonisation des dispositifs cardiaques implantables ou matériels d'assistance circulatoire par cette espèce possiblement productrice de biofilm. Enfin, nos souches étaient également sensibles aux autres familles d'antibiotiques (aminosides, fluoroquinolones, macrolides...), à l'exception toutefois du cotrimoxazole et du métronidazole. La résistance au cotrimoxazole est une résistance naturelle commune chez les bactéries anaérobies<sup>73</sup>, elle concorde donc bien avec le caractère anaérobie strict de *S. saccharolyticus*. Le métronidazole est un antibiotique anti-anaérobie habituellement non testé sur les staphylocoques : nous avons choisi de l'ajouter à nos antibiogrammes en raison du caractère anaérobie de *S. saccharolyticus*, mais avons trouvé une résistance constante à cette molécule, comme dans tous les cas cliniques publiés<sup>60,64,65,66,63</sup>. Le métronidazole est pourtant habituellement actif sur les cocci à Gram positif anaérobies (*Finegoldia*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Peptoniphilus* et *Anaerococcus*), à l'exception de rares (3%) *Finegoldia*<sup>74,75</sup>. *S. saccharolyticus* serait donc l'un des seuls représentants des cocci à Gram positif anaérobies stricts constamment résistants au métronidazole.

## 6. Conclusion

*Staphylococcus saccharolyticus* est une espèce très méconnue à ce jour, rarement isolée, et considérée alors comme contaminante ou peu pathogène. Son métabolisme anaérobie strict est unique au sein du genre *Staphylococcus*. Les cas cliniques avérés restent exceptionnels et nous rapportons ici une infection locale de défibrillateur cardiaque conduisant à une menace d'extériorisation. En outre, l'isolement de *S. saccharolyticus* comme contaminant de liquides pleuraux suggère une colonisation cutanée thoracique, et sa capacité à produire du biofilm expose au risque de colonisation et d'infection des dispositifs cardiaques implantables et des matériels d'assistance circulatoire. La sensibilité habituelle aux antibiotiques de *S. saccharolyticus* le rend accessible aux antibiothérapies prophylactiques ou curatives habituellement utilisées contre les Gram positifs.

La biologie moléculaire est l'outil de référence taxonomique confirmant l'identification de nos isolats. Le séquençage de l'ADNr 16S, le plus répandu dans les laboratoires, n'est pour autant pas le plus discriminant et son interprétation doit être critique et éventuellement complétée par celui d'autres gènes. Cependant, la biologie moléculaire est lourde et peu adaptée à la routine, tandis que les galeries biochimiques, notamment de type anaérobie, et la spectrométrie de masse, se sont avérées fiables, performantes et adaptées à la routine pour l'identification de *S. saccharolyticus*.

Contrairement à celle de nombreuses bactéries aérobies, telles que *S. lugdunensis* ou *P. aeruginosa*, la virulence des bactéries anaérobies et notamment leur production de biofilm est très méconnue. Il pourrait donc être judicieux de rechercher ce staphylocoque anaérobie à culture lente lors d'infections impliquant potentiellement un biofilm.

## 7. Bibliographie

1. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* oct 2014;27(4):870-926.
2. Réseau BMR-Raisin, Institut de veille sanitaire. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Résultats 2013. 2015;104.
3. Fairbrother RW. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *J Pathol Bacteriol.* 1 janv 1940;50(1):83-8.
4. Rupp ME, Soper DE, Archer GL. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol.* nov 1992;30(11):2975-9.
5. Latham RH, Running K, Stamm WE. Urinary tract infections in young adult women caused by *staphylococcus saprophyticus*. *JAMA.* 9 déc 1983;250(22):3063-6.
6. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* janv 1975;1(1):82-8.
7. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* avr 2011;9(4):244-53.
8. Filloux A, Vallet I. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *MS Médecine Sci.* 2003;19(1):77-83.
9. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 21 mai 1999;284(5418):1318-22.
10. Lebeaux D, Ghigo J-M. Infections associées aux biofilms: Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *médecine/sciences.* 2012;28(8-9):727-39.
11. von Eiff C, Jansen B, Kohlen W, Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs.* 2005;65(2):179-214.
12. Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:171.
13. Frank KL, Patel R. Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infect Immun.* oct 2007;75(10):4728-42.
14. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* mars 2004;186(6):1838-50.
15. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* oct 1999;67(10):5427-33.
16. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect*



Microbiol [Internet]. 28 janv 2015 [cité 5 avr 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4309206/>

17. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med*. 20 août 2009;361(8):787-94.
18. Sohail MR, Uslan DZ, Khan AH, Friedman PA, Hayes DL, Wilson WR, et al. Management and outcome of permanent pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator infections. *J Am Coll Cardiol*. 8 mai 2007;49(18):1851-9.
19. Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*. déc 1982;66(6):1339-41.
20. Réseau BN-RAISIN Institut de veille sanitaire. Surveillance des bactériémies nosocomiales en France. 2008;39.
21. Klug D, Balde M, Pavin D, Hidden-Lucet F, Clementy J, Sadoul N, et al. Risk factors related to infections of implanted pacemakers and cardioverter-defibrillators: results of a large prospective study. *Circulation*. 18 sept 2007;116(12):1349-55.
22. Duval X, Selton-Suty C, Alla F, Salvador-Mazenq M, Bernard Y, Weber M, et al. Endocarditis in patients with a permanent pacemaker: a 1-year epidemiological survey on infective endocarditis due to valvular and/or pacemaker infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 juill 2004;39(1):68-74.
23. Sandoe JAT, Barlow G, Chambers JB, Gammage M, Guleri A, Howard P, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of implantable cardiac electronic device infection. Report of a joint Working Party project on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, host organization), British Heart Rhythm Society (BHRS), British Cardiovascular Society (BCS), British Heart Valve Society (BHVS) and British Society for Echocardiography (BSE). *J Antimicrob Chemother*. févr 2015;70(2):325-59.
24. Kleemann T, Becker T, Strauss M, Dyck N, Weisse U, Saggau W, et al. Prevalence of bacterial colonization of generator pockets in implantable cardioverter defibrillator patients without signs of infection undergoing generator replacement or lead revision. *Eur Eur Pacing Arrhythm Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol*. janv 2010;12(1):58-63.
25. Bouzeman A. Une enveloppe antibactérienne pour les stimulateurs cardiaques et défibrillateurs implantables. *Cardiologie Pratique* [Internet]. 2015 [cité 5 avr 2016]; Disponible sur: <http://www.cardiologie-pratique.com/journal/article/0013485-une-enveloppe-antibacterienne-pour-les-stimulateurs-cardiaques-et>
26. Litzler P-Y, Benard L, Barbier-Frebourg N, Vilain S, Jouenne T, Beucher E, et al. Biofilm formation on pyrolytic carbon heart valves: influence of surface free energy, roughness, and bacterial species. *J Thorac Cardiovasc Surg*. oct 2007;134(4):1025-32.
27. Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Götz F, Peters G, Heilmann C. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat

shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol.* déc 2010;12(12):1746-64.

28. Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Fleer A, Verhoef J, van Dijk H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol.* oct 1993;7(3):281-7.
29. Götz F, Perconti S, Popella P, Werner R, Schlag M. Epidermin and gallidermin: Staphylococcal lantibiotics. *Int J Med Microbiol IJMM.* janv 2014;304(1):63-71.
30. Bannerman TL, Kleeman KT, Kloos WE. Evaluation of the Vitek Systems Gram-Positive Identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* mai 1993;31(5):1322-5.
31. Piccolomini R, Catamo G, Picciani C, D'Antonio D. Evaluation of Staf-Sistem 18-R for identification of staphylococcal clinical isolates to the species level. *J Clin Microbiol.* 1994;32(3):649-53.
32. Grant CE, Sewell DL, Pfaller M, Bumgardner RV, Williams JA. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative staphylococci to species level. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 janv 1994;18(1):1-5.
33. Perl TM, Rhomberg PR, Bale MJ, Fuchs PC, Jones RN, Koontz FP, et al. Comparison of identification systems for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mars 1994;18(3):151-5.
34. Renneberg J, Rieneck K, Gutschik E. Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* mai 1995;33(5):1150-3.
35. Ieven M, Verhoeven J, Pattyn SR, Goossens H. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* mai 1995;33(5):1060-3.
36. De Paulis AN, Predari SC, Chazarreta CD, Santoianni JE. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* mars 2003;41(3):1219-24.
37. Cunha M de LRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* déc 2004;99(8):855-60.
38. Summanen P, Jousimies-Somer H. Comparative evaluation of RapID ANA and API 20 A for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* déc 1988;7(6):771-5.
39. Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.* avr 1999;49 Pt 2:725-8.

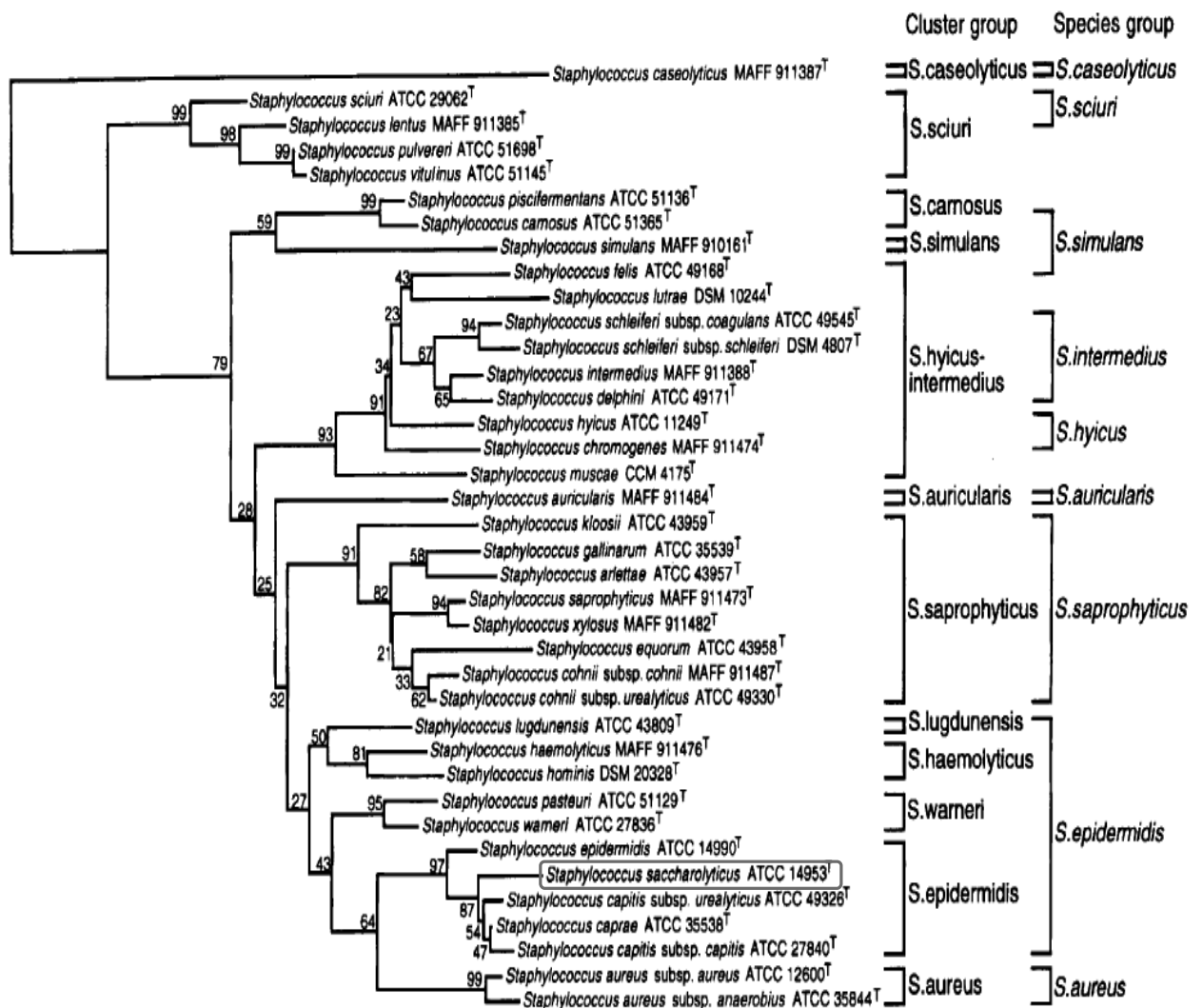
40. Shah MM, Iihara H, Noda M, Song SX, Nhung PH, Ohkusu K, et al. dnaJ gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* janv 2007;57(Pt 1):25-30.
41. Hwang SM, Kim MS, Park KU, Song J, Kim E-C. Tuf gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* déc 2011;49(12):4142-9.
42. Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the sodA gene as a target. *J Clin Microbiol.* déc 2001;39(12):4296-301.
43. Drancourt M, Raoult D. rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* avr 2002;40(4):1333-8.
44. Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere A-M, Bes M, Meugnier H, et al. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* mars 2011;30(3):343-54.
45. Kwok AYC, Chow AW. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* janv 2003;53(Pt 1):87-92.
46. Ghebremedhin B, Layer F, König W, König B. Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different Partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf Gene Sequences. *J Clin Microbiol.* mars 2008;46(3):1019-25.
47. Spanu T, De Carolis E, Fiori B, Sanguinetti M, D'Inzeo T, Fadda G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to rpoB gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* janv 2011;17(1):44-9.
48. Carpaij N, Willems RJL, Bonten MJM, Fluit AC. Comparison of the identification of coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and tuf sequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* oct 2011;30(10):1169-72.
49. Loonen AJM, Jansz AR, Bergland JNB, Valkenburg M, Wolffs PFG, van den Brule AJC. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* avr 2012;50(4):1437-9.
50. Moon H-W, Lee SH, Chung H-S, Lee M, Lee K. Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *J Med Microbiol.* sept 2013;62(Pt 9):1301-6.

51. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 août 2009;49(4):543-51.
52. Han HW, Chang HC, Hunag AH, Chang TC. Optimization of the score cutoff value for routine identification of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 déc 2015;83(4):349-54.
53. Carbonnelle E, Beretti J-L, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, et al. Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* juill 2007;45(7):2156-61.
54. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* sept 2009;7(9):629-41.
55. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2009;53(12):4961-7.
56. Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol.* mars 2008;158(3):442-55.
57. Evans CA, Mattern KL, Hallam SL. Isolation and identification of *Peptococcus saccharolyticus* from human skin. *J Clin Microbiol.* 1978;7(3):261-4.
58. Foubert EL, Douglas HC. Studies on the Anaerobic Micrococci: I. Taxonomic Considerations. *J Bacteriol.* juill 1948;56(1):25-34.
59. Kilpper-Bälz R, Schleifer K h. DNA-rRNA hybridization studies among staphylococci and some other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1 avr 1981;10(4):357-62.
60. Westblom TU, Gorse GJ, Milligan TW, Schindzielorz AH. Anaerobic endocarditis caused by *Staphylococcus saccharolyticus*. *J Clin Microbiol.* 1990;28(12):2818-9.
61. Kilpper R, Buhl U, Schleifer K-H. Nucleic acid homology studies between *Peptococcus saccharolyticus* and various anaerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. *FEMS Microbiol Lett.* 1 août 1980;8(4):205-10.
62. Ludwig W, Schleifer KH, Fox GE, Seewaldt E, Stackebrandt E. A phylogenetic analysis of staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* and *Micrococcus mucilaginosus*. *J Gen Microbiol.* août 1981;125(2):357-66.
63. Wu X, Yu C, Wang X. A case of *Staphylococcus saccharolyticus* pneumonia. *Int J Infect Dis.* mars 2009;13(2):e43-6.

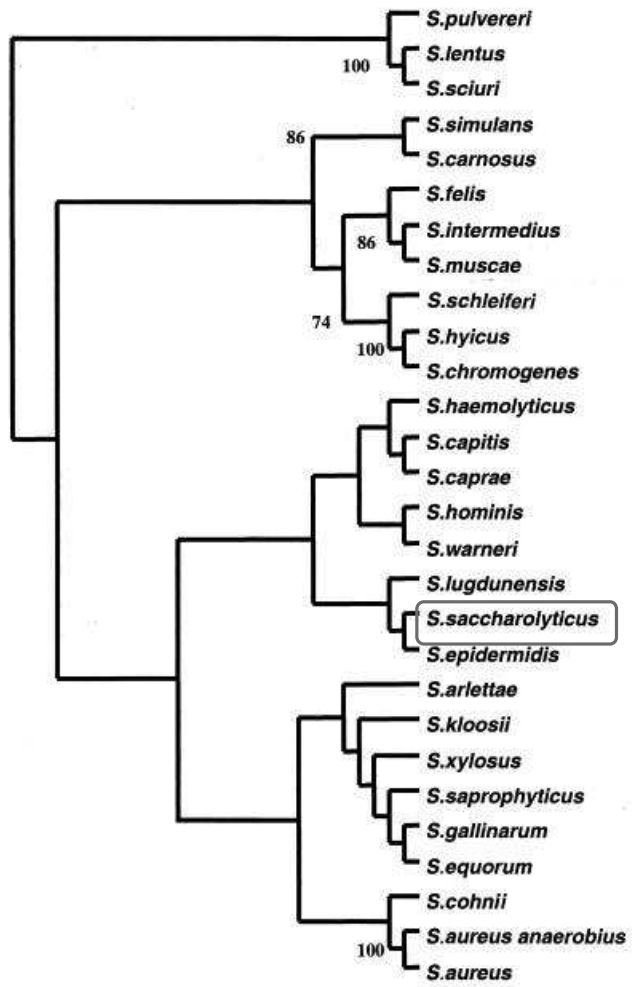
64. Godreuil S, Jean-Pierre H, Morel J, Darbas H, Jumas-Bilak E, Bañuls A-L, et al. Unusual case of spondylodiscitis due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *Joint Bone Spine*. janv 2005;72(1):91-3.
65. Krishnan S, Haglund L, Ashfaq A, Leist P, Roat T. Prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. avr 1996;22(4):722-3.
66. Liu C-J, Sun B, Guo J, He J-L, Feng B, Wang H-G, et al. A case of bone marrow infection by *Staphylococcus saccharolyticus*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. avr 2015;19(7):1161-3.
67. Steinbrueckner B, Singh S, Freney J, Kuhnert P, Pelz K, Aufenanger J. Facing a mysterious hospital outbreak of bacteraemia due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *J Hosp Infect*. déc 2001;49(4):305-7.
68. Mellmann A, Becker K, von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis*. févr 2006;12(2):333-6.
69. Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Luengo JM, Naharro G. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of gap Gene. *J Clin Microbiol*. oct 2001;39(10):3693-5.
70. Gibert L, Didi J, Marlinghaus L, Lesouhaitier O, Legris S, Szabados F, et al. The major autolysin of *Staphylococcus lugdunensis*, AtlL, is involved in cell separation, stress-induced autolysis and contributes to bacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*. mars 2014;352(1):78-86.
71. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DWM, Simpson H, Peto TEA, et al. Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. *J Clin Microbiol*. oct 1998;36(10):2932-9.
72. Peel TN, Cole NC, Dylla BL, Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry and diagnostic testing for prosthetic joint infection in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mars 2015;81(3):163-8.
73. Courvalin P, Leclercq R. *Antibiogramme*. 3<sup>e</sup> éd. Eska; 2012. 800 p.
74. Brazier J, Chmelar D, Dubreuil L, Feierl G, Hedberg M, Kalenic S, et al. European surveillance study on antimicrobial susceptibility of Gram-positive anaerobic cocci. *Int J Antimicrob Agents*. avr 2008;31(4):316-20.
75. Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, Goldstein EJC, Rodloff AC, Claros M, et al. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother*. juin 2004;53(6):1039-44.

## 8. Annexes

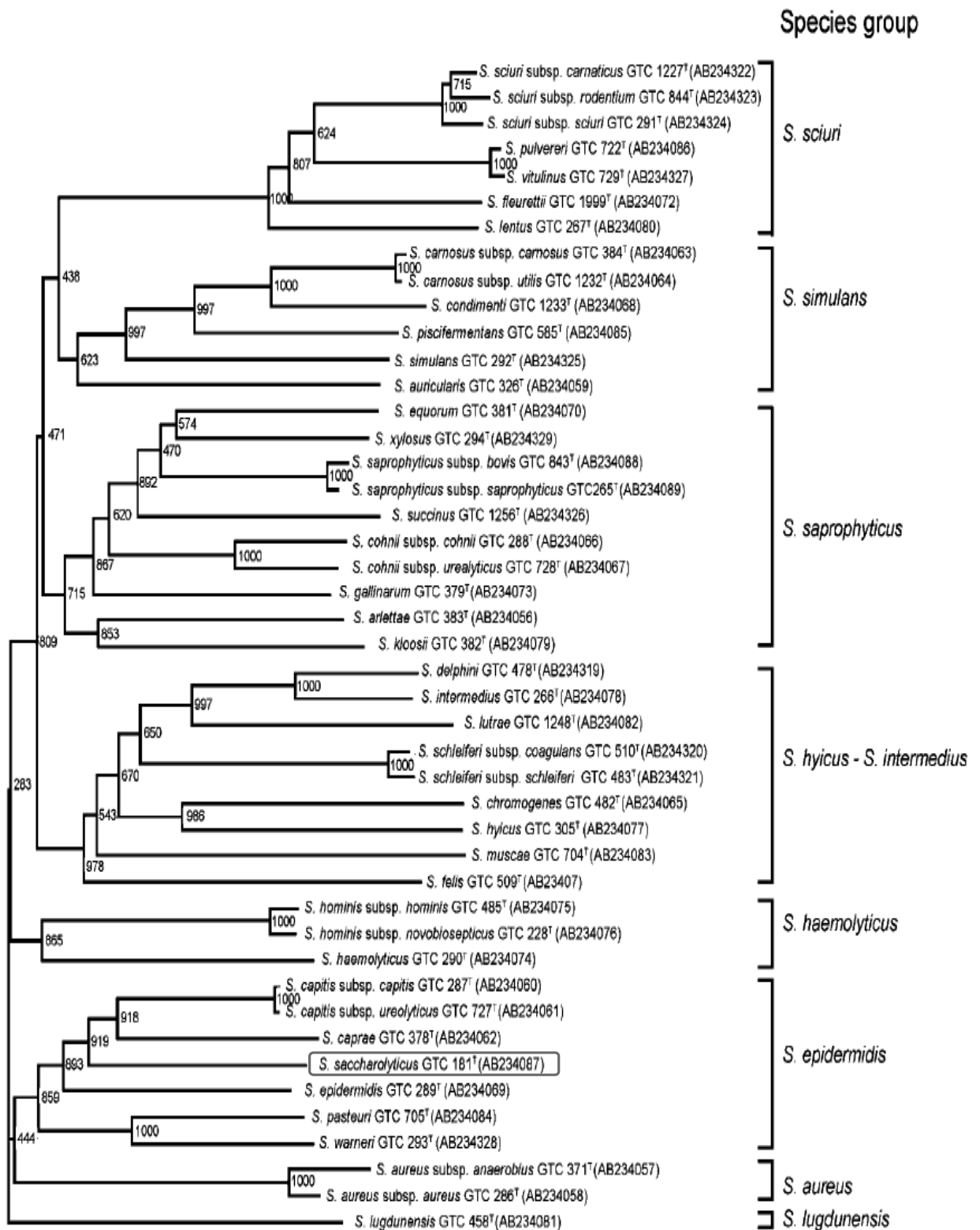
Dendrogrammes des gènes utilisés en biologie moléculaire au laboratoire pour l'identification des germes du genre *Staphylococcus*.



ADNr 16S (D'après Takahashi et al. 1999<sup>39</sup>)

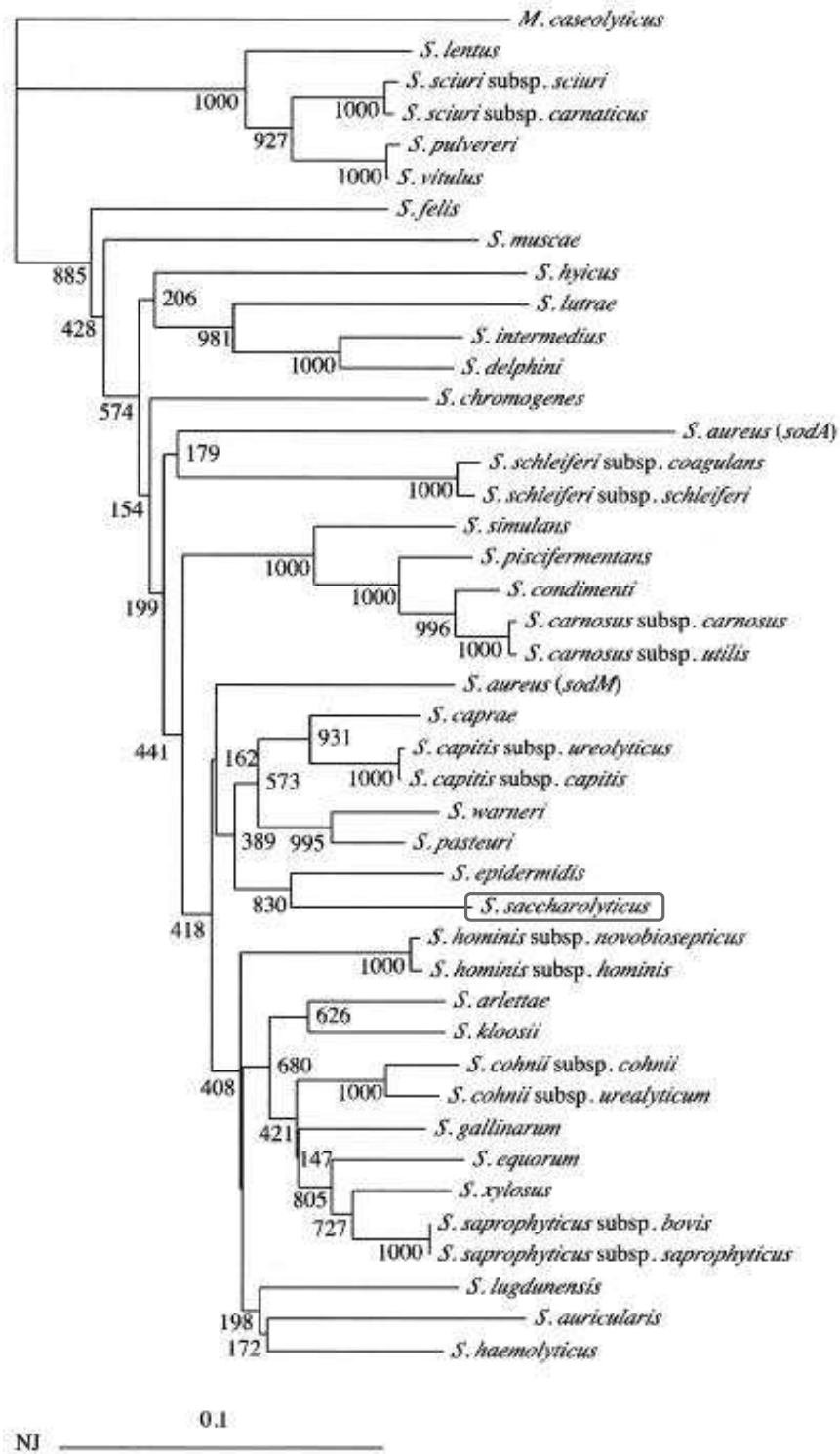


*rpoB* (D'après Drancourt et al. 2002 <sup>43</sup>)

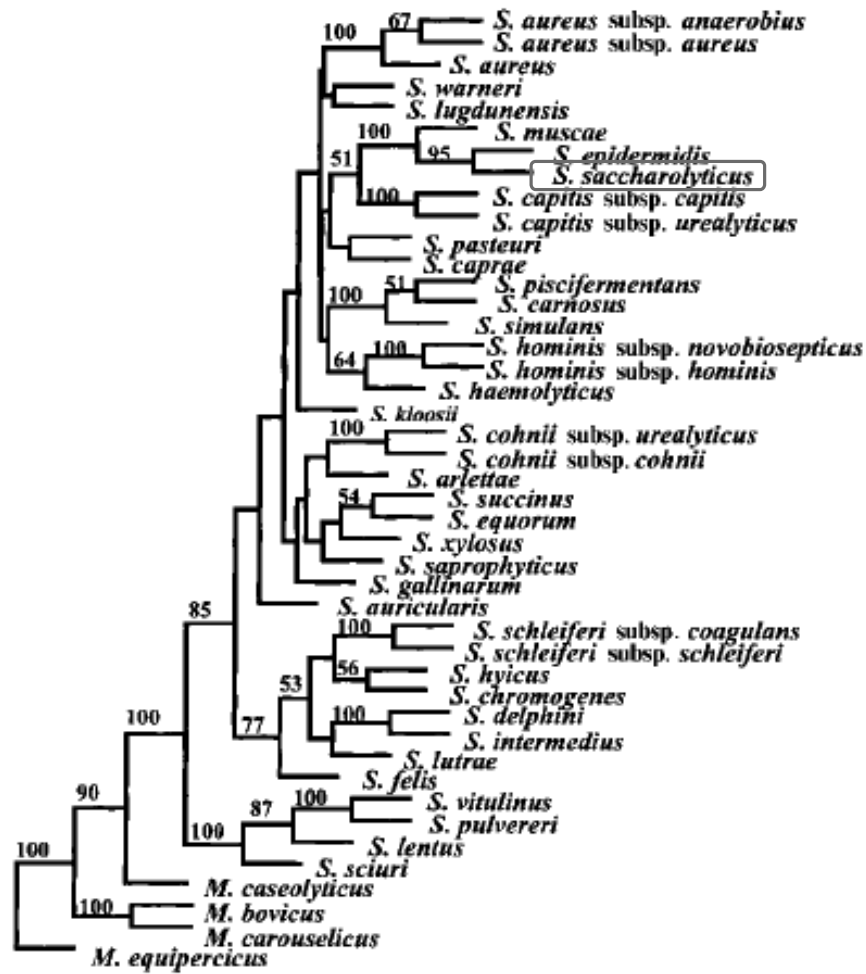


*dnaJ* (D'après Shah et al. 2007<sup>40</sup>)

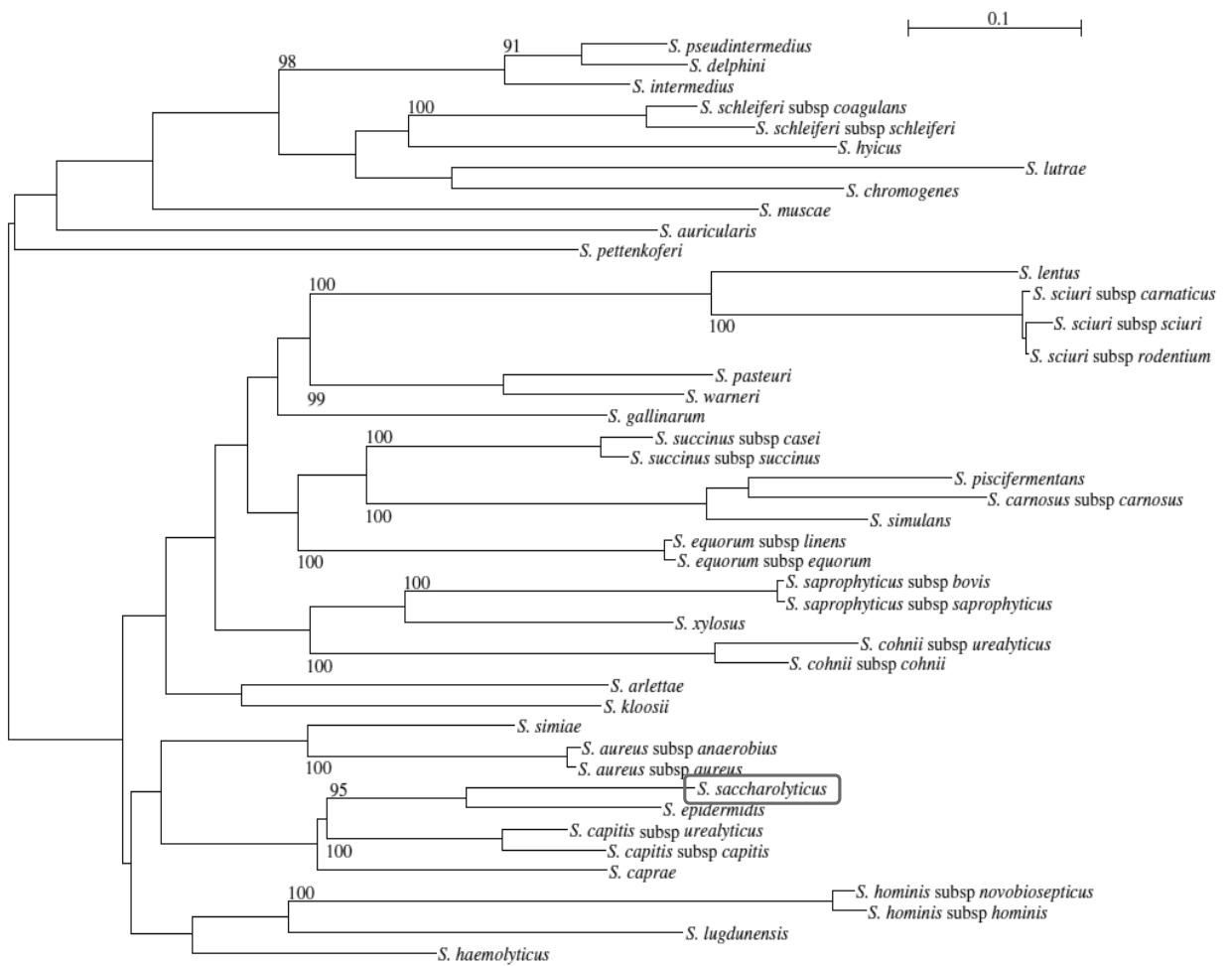




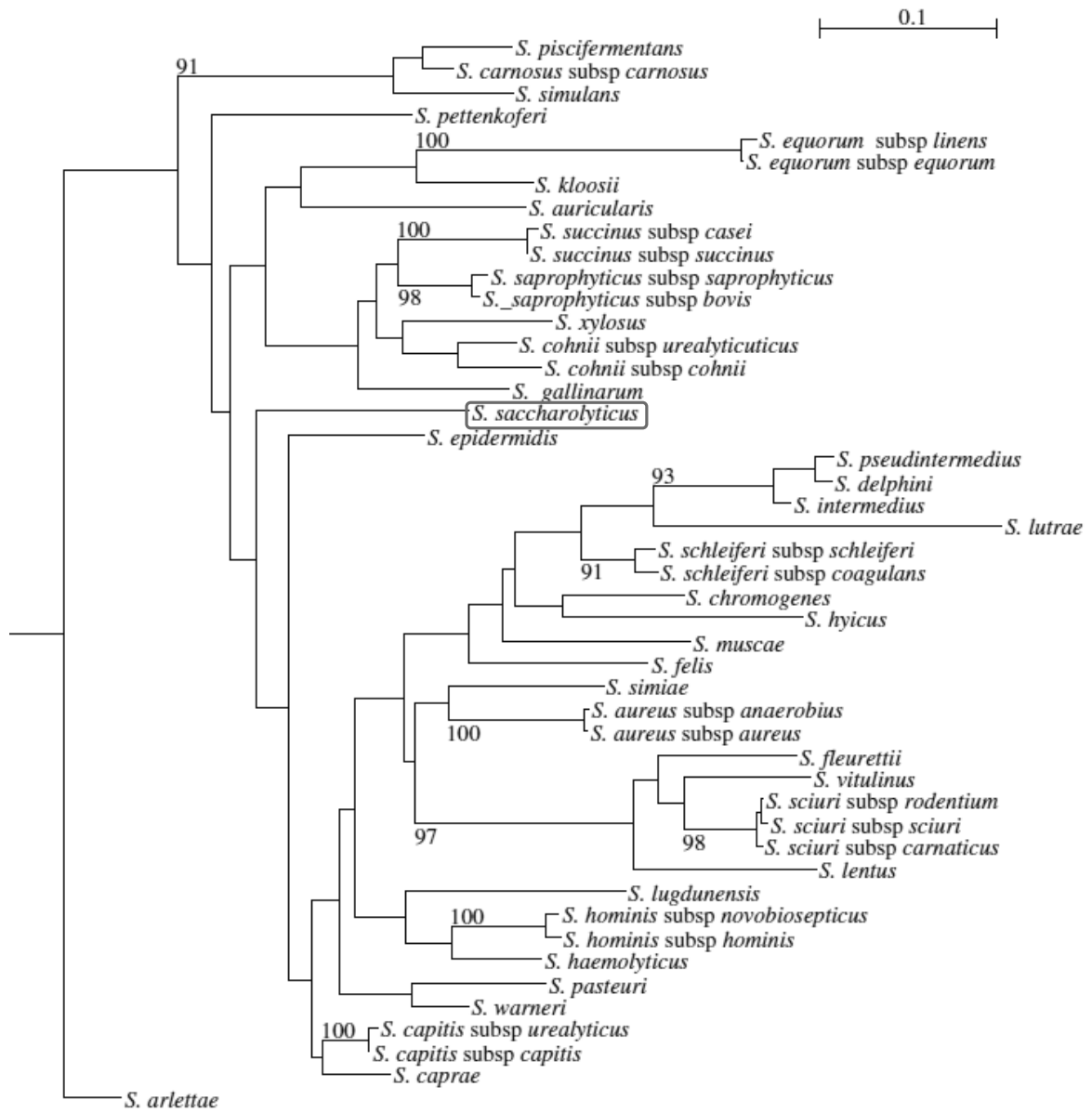
*sodA* (D'après Poyart et al. 2001<sup>42</sup>)



*hsp60* (D'après Kwok et al. 2003<sup>45</sup>)



gap (D'après Bergeron et al. 2011<sup>44</sup>)



*tuf* (D'après Bergeron et al. 2011<sup>44</sup>)

# Serment de Galien

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



## **LANNE Simon**

### ***Staphylococcus saccharolyticus* : à propos d'un cas d'infection de dispositif cardiaque implantable, enjeux de l'identification et pathogénicité d'un germe méconnu.**

Th. D. Pharm., Rouen, 2016, 93 p.

---

#### **RESUME**

Les staphylocoques, majoritairement à coagulase négative, regroupent actuellement 47 espèces ayant des implications cliniques variées. *Staphylococcus saccharolyticus*, seule espèce anaérobie stricte et encore méconnue, a été retrouvée sur différents prélèvements d'un défibrillateur en menace d'extériorisation chez un patient de notre établissement. Une étude des principales méthodes d'identification, des capacités à produire du biofilm et de la résistance aux antibiotiques a été réalisée pour cette souche et quatre autres isolats de *S. saccharolyticus*.

La biologie moléculaire est l'outil d'identification de référence, à condition de séquencer des gènes judicieusement choisis. Cependant le séquençage est peu adapté à la routine tandis que les galeries biochimiques anaérobies et la spectrométrie de masse sont fiables et performantes, peu coûteuses et rapides.

*S. saccharolyticus* est capable de produire du biofilm en anaérobiose, ce qui en fait l'un des rares germes anaérobies possédant ce facteur de virulence et à risque de coloniser et infecter le biomatériau.

Le profil de sensibilité aux antibiotiques démontre peu de résistance à la méticilline et à la pénicilline, ainsi qu'une résistance systématique au métronidazole, traduisant un profil assez exceptionnel pour un staphylocoque à coagulase négative ou un cocci anaérobie.

---

**MOTS CLES** : *Staphylococcus saccharolyticus* – Staphylocoque – Identification – Dispositif médical – Biofilm

---

#### **JURY**

Président : Mme PESTEL-CARON Martine, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Membres : Mme FREBOURG Noëlle, Maître de Conférences Universitaire - Praticien Hospitalier

M. LITZLER Pierre-Yves, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

M. SAVOURE Arnaud, Praticien Hospitalier

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 26 avril 2016