HAL
open science

Évaluation du bénéfice des antiplaquettaires dans un modèle in vitro d'interactions plaquettes-bactéries

Emma Ogé-Ganaye

To cite this version:

Emma Ogé-Ganaye. Évaluation du bénéfice des antiplaquettaires dans un modèle in vitro d'interactions plaquettes-bactéries. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02310237

HAL Id: dumas-02310237

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02310237v1

Submitted on 10 Oct 2019

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

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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 20 Septembre 2019

Par Mme OGÉ-GANAYE Emma
Née le 04 octobre 1992 à Pertuis (84)

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

ÉVALUATION DU BÉNÉFICE DES ANTIPLAQUETTAIRES DANS UN MODÈLE *IN VITRO* D'INTERACTIONS PLAQUETTES-BACTÉRIES

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur Laurence CAMOIN

Membres : M. le Professeur Pierre-Emmanuel MORANGE

Mme le Dr Charlotte GROSDIDIER

Mme le Dr Frédérique GOURIET

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angelique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORE
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché
Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien–Praticien hospitalier
M. Joel VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

REMERCIEMENTS

Parce que cette thèse est un petit bout de vous tous

Aux membres du jury :

Mme le Pr Laurence CAMOIN,
Pour m'avoir accompagnée et poussée depuis ces cinq dernières années, mais également pour m'avoir donné goût à l'Hématologie dès mes premières années de fac grâce à vos enseignements. Je vous remercie pour tout le temps que vous m'avez accordé pour cette thèse, et pour la patience et la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard. Vous êtes une personne que j'admire et respecte énormément.

Mr le Pr Pierre-Emmanuel MORANGE,
Pour me faire l'honneur de faire partie de ce jury. Je suis touchée de la confiance que vous m'accordez depuis quelques semestres maintenant, et particulièrement pour les deux années à venir.

Mme le Dr Charlotte GROSDIDIER,
Car j'ai le plaisir de te compter parmi les membres de ce jury, ce qui sera une première pour toi. Je suis heureuse de pouvoir travailler prochainement avec toi, toi qui m'as appris à reconnaître mes premières cellules au microscope il y a maintenant plus de 3 ans… J'espère pouvoir apprendre encore beaucoup à tes côtés.

Mme le Dr Fréderique GOURIET,
D'avoir accepté de faire partie de ce jury, probablement peu traditionnel pour toi. Je te remercie pour le temps passé ensemble dans le monde de la bactériologie et tout ce que tu as pu m'apprendre pendant mon tout premier semestre en tant qu'interne.

A mes confrères, à mes collègues :

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie de la Timone,

Pierre, Manal, Nathalie,
Merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises pendant ces 2 semestres en hémostase.
Manal, je te souhaite plein de bonheur dans cette nouvelle vie de maman (et de conductrice !!).
Merci pour ta gentillesse et ton soutien ces derniers mois, merci d'être toi.
Pierre, pour bientôt peut-être aussi…? Merci pour ton sarcasme à toute épreuve et ta disponibilité.
Nathalie, merci pour votre savoir et votre dynamisme. J'espère avoir encore l'occasion de vous poser des « petites questions » !

Vanessa, Marie, Caroline, Isabelle,
Je vous remercie pour ce semestre en cytologie à vos côtés, pour la confiance que vous m'avez accordée et les connaissances que vous m'avez apportées. Merci pour votre rigueur et vos conseils.
Suzy,
A nos discussions du mercredi et à tes conseils pour l'avenir.

A mes co-internes,
Pour m'avoir supportée pendant ce semestre qui n'était pas de tout repos, pendant mes crises d'angoisse et crises de nerfs diverses … Vous êtes désormais tranquilles ! Merci pour nos pauses café et nos conversations parfois improbables. Laurie, tu tiens le bon bout, courage pour ces 2 dernières semaines. On se rattrapera sur les coups à boire très bientôt !

A l'ensemble des techs du labo,
Et tout particulièrement Brigitte, Céline, Solène et Elena,
Merci pour tout le soutien et les encouragements que vous m'avez apportés pendant ces derniers mois qui m'ont paru interminables… Mais merci aussi pour vos caractères bien trempés, pour toutes nos discussions, nos potins, et pour nos apéros, qui adoucissent nos fins de journée et nos gardes. Brigitte, je suis bientôt de retour à Keep Cool !

A l'équipe de l'IPC,

Flo, Anne-Cath, Véro, Anne et Carine,
Je vous remercie pour ce semestre passé à vos côtés l'an passé. Je garderai un souvenir mémorable de cet été ensemble, de nos papotages, et de la leçon que j'aurai apprise de bien réfléchir avant de me lancer dans des travaux (!). Merci pour nos pauses café au soleil après le repas, merci pour nos goûters de décompensation, merci pour nos rigolades. Merci pour tous ces bons moments. Et bien sûr merci pour tout ce que vous m'avez appris en cyto, parce que oui, malgré tout ça nous avons aussi beaucoup travaillé ! Et grâce à vous je suis devenue un bébé chat… Je vous souhaite beaucoup de bonheur dans vos vies respectives, et du courage pour l'énorme boulot que vous fournissez au quotidien. J'aimerais arriver ne serait-ce qu'à vos chevilles de super cytologistes un jour…

A ma famille :

A mes parents et à ma soeur,
Qui m'ont apporté un soutien sans faille à chacune des épreuves de ces 9 longues années. Je sais que je n'ai pas été facile tous les jours et je suis consciente de la chance que j'ai de vous avoir auprès de moi. Je ne vous remercierai jamais assez de tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour tout.
Maman, je m'excuse de t'avoir fait particulièrement subir toutes mes contrariétés ces derniers mois… Papa, parce que t'es le plus beau et le plus fort des papas ! Marie, un merci particulier pour ton expertise de Word qui m'aura évité bien des prises de tête !!
Je ne vous le dis pas assez souvent mais je vous aime.

A Mandarine,
Mon bébé chat qui m'aura aussi accompagnée pendant la quasi-totalité de ces études. Merci pour nos heures infinies de révision passées ensemble et ce soutien que tu m'as apporté par ta simple présence. Tu n'auras pas été là pour cette dernière étape, du moins physiquement, mais tu seras toujours dans mon cœur. Tu me manques.

A mes grands-mères,
Toujours présentes dans les moments clés.
Et à mes grands-pères,
Qui nous ont quittés bien trop tôt.

A mes amis :

Aux BG-BGettes,

Pour cette amitié qui dure depuis maintenant plus de 10 ans malgré nos séparations aux quatre coins de la France, et bientôt du monde… A nos séjours parisiens, à nos nouvel-an et à toutes nos soirées d'été chez Claire et Mathilde qui laisseront des souvenirs gravés à jamais. Les guêpes m'en remercient encore. Merci de faire partie de ma vie.

Manon, Léa, pour cette P1 vécue ensemble. Je n'aurais pas pu rêver meilleures acolytes pour survivre à cette année. A tous nos voyages, à Miami, Los Angeles, Berlin et Stockholm faits depuis, aux autres à venir, et à notre non voyage aux Cinq Terres de cet été….. Promis l'année prochaine on part en vacances, et peut-être même qu'on fera du paddle ! Merci d'être toujours là, merci pour ces moments.

Manon, la prochaine c'est toi !

Katia, à toutes nos balades du dimanche dans le Talagard et nos conversations infinies. J'espère vraiment que tu réaliseras tes rêves, même s'ils t'emmèneront bien trop loin de nous.

Marie, Pierre, vraiment, je ne veux pas vous mettre la pression mais, c'est quand le MARIAGE ??? On veut le premier mariage BG-BGettes !

Mathilde, à toi qui sembles adorer les études…, j'espère que cette année sera la bonne pour toi.

Guigui, à nos retrouvailles une fois par an, mais nos retrouvailles tout de même.

Tom, Natan, à votre duo de choc. Tom, que tu réussisses à apprécier ta nouvelle vie parisienne loin de nous, on te garde une place bien au chaud dans le Sud. Natan, qui n'a pas pu attendre pour partir… Kiffe ta vie à Tahiti, tu vas nous manquer petit con.

Claire, pour ces week-ends au top passés ensemble à Paris, les soirées à Centrale et les aprèms piscine chez toi. J'espère te retrouver près de nous très bientôt.

Rendez-vous à Courchevel pour de nouvelles aventures !

A mes fratés,

Mae, Flo, Claire,

A ce groupe de TP qui nous a permis de nous rencontrer, et à toutes les épreuves qu'on aura dû traverser ensemble au cours de ces années et qui auront soudé notre amitié pour toujours.

Aux cagoles, à Flo et Thomas,

Merci pour nos week-ends aux quatre coins de la France et de l'Europe.

Marine, à toi qui n'a pas pu t'empêcher de te libérer 24h avant moi, à nos discussions, nos rigolades et nos engueulades :p Merci d'être toujours là malgré tout. Départ dans moins de 72h pour le soleiiiiiil ! ☼

Cé, à ta bonne humeur et ta motivation permanentes. Merci pour la personne que tu es ! Avec ou sans bonnet, ma porte en tant que 2ème maison Marseillaise te (vous !!) sera toujours ouverte !
Cha, à ce premier WEI pharma passé ensemble, et à tous les moments vécus depuis.
Flo, en tant que voisin du 12ème et fournisseur officiel de champagne, merci pour tous les services que tu m'as rendus, tu as ta place en tant que premier homme de main à Côté Colline !
Thomas, à tes histoires improbables, et à cette tarte aux pommes que j'attends depuis déjà 2 ans…
Les copains, on se rattrape sur le week-end à Bandol l'année prochaine, j'ai une revanche pétanque à prendre .. ! Et on a toujours un week-end ski à organiser, je dis ça je dis rien…

A Estelle et Romain,
Merci pour ce mariage merveilleux que vous nous avez offert, à votre image. Merci pour votre gentillesse, merci d'être toujours là, vous êtes des amis en or. J'ai hâte d'être tatie !!

A Laura,
Merci pour ces années pharma passées ensemble et tout ce qui les a accompagnées. A ton retour dans le sud et à nos futures soirées pour rattraper ces 4 ans !

A ma Juju,
A tes crises d'angoisse pour tout et n'importe quoi, à tes talents de danseuse et chorégraphe, à toi. A notre voyage à New-York sous la pluie, au prochain au soleil, à nos soirées, à nos commérages et à ta tendance à ne pas aimer les gens, sauf ceux qu'il ne faut pas :p Il n'y en a pas 2 comme toi. Merci de me supporter au quotidien.

A Céline,
Pour ce M2 vécu ensemble. A nos galères de manip et nos angoisses de WIP. C'est finiiii ! Il nous aura tout de même permis de passer plus de temps ensemble !

A Sophie,
Pour avoir été ma première super co-interne. A tout ce que tu m'as appris en bactério et à ton courage pour toujours réussir à toujours être sur tous les fronts.

Et à tout ceux que je n'ai pas cité mais qui font partie de ma vie, merci d'être là.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS **1**

TABLE DES MATIÈRES **6**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **9**

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES **11**

INTRODUCTION **13**

PARTIE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES ENDOCARDITES INFECTIEUSES ET MÉCANISMES D'INTERACTION PLAQUETTES-BACTÉRIES **14**

I- GÉNÉRALITÉS SUR LES ENDOCARDITES INFECTIEUSES **15**

1. DEFINITION 15
2. EPIDEMIOLOGIE 15
3. PATHOGENES RESPONSABLES 17
4. PHYSIOPATHOLOGIE 19
   1- Portes d'entrée et sujets à risque *19*
   2- Formation de la végétation *20*
5. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET COMPLICATIONS 23
   1- Le syndrome infectieux *23*
   2- Les signes cardiaques *23*
   3- Les manifestations extracardiaques *24*
6. COMPLICATIONS 24
   1- Complications cardiaques *24*
   2- Complications emboliques *25*
   3- Complications neurologiques *26*
   4- Complications rénales *27*
   5- Mortalité *27*
7. DIAGNOSTIC 27
8. TRAITEMENT 29
9. CONCLUSION 30

II- INTERACTIONS PLAQUETTES-BACTERIES **31**

1. GENERALITES 31
2. INTERACTIONS PLAQUETTES - *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 32
   1- Rôle de l'intégrine αIIbβ3 ..... *33*

a) ClfA et FnBP 35
b) ClfB 37
c) Liaison directe à l'intégrine αIIbβ3 38
2- Rôle de la GpIbα *39*
3- Rôle du complément *39*
4- Rôle du FcγRIIa *40*
5- Toxines *42*
6- Autres protéines de *S. aureus* *43*
7- Protéines régulatrices *46*
8- Impact des contraintes de cisaillement *47*
9- Inhibition des plaquettes *48*
3. INTERACTIONS PLAQUETTES - *S. SANGUINIS* 49
1- Rôle de la GpIbα *49*
2- Rôle du complément *51*
3- Rôle du FcγRIIa *51*
4- Rôle des MAP kinases *52*
5- Rôle de la PAAP *52*
6- Libération de médiateurs solubles et autres facteurs de virulence *53*
a) Médiateurs solubles 53
b) Facteurs de virulence 53
4. ROLE DES PLAQUETTES 54
1- Généralités sur les plaquettes *54*
2- Toll Like Receptors *55*
3- Phagocytose *55*
4- Plaquettes et PNN *56*
5- Libération de molécules microbicides *56*
5. CONCLUSION 58

PARTIE II : ÉVALUATION DU BENEFICE DES ANTIPLAQUETTAIRES SUR LES INTERACTIONS PLAQUETTES-BACTERIES 60

III- REVUE DE LA LITTERATURE 61

1. DONNEES *IN VITRO* 61
1- Aspirine et acide salicylique *61*
2- Thiénopyridines *64*
2. MODELES ANIMAUX 65
3. ÉTUDES CLINIQUES 68
4. CONCLUSION 71

IV- TRAVAIL PERSONNEL 73

1. INTRODUCTION 73
2. MATERIEL ET METHODES 73
1- Préparation des plaquettes *73*
2- Préparation des souches bactériennes *74*
3- Traitement *in vitro* de PRP de sujets sains par des antiplaquettaires pour les tests d'agrégation *75*
4- Agrégation plaquettaire induite par les espèces bactériennes *75*
5- Analyse de l'activation plaquettaire par Cytométrie de flux après traitement par les suspensions bactériennes *76*
6- Analyse statistique *76*
3. RESULTATS 77
1- Agrégation plaquettaire induite par les bactéries *77*
a) Staphylococcus aureus *77*
b) Streptococcus sanguinis *78*
2- Mesure de l'expression de la P-selectine : témoin de l'état d'activation plaquettaire 79
a) *Staphylococcus aureus* 79
b) *Streptococcus sanguinis* 80
3- Effet des antiplaquettaires 81
a) *Staphylococcus aureus* 81
b) *Streptococcus sanguinis* 84

V- DISCUSSION 87

VI- CONCLUSION 92

VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 93

ANNEXES 102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Agr : Accessory gene regulator

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien

CbpA : Collagen-binding protein A

Clf : Clumping factor

Coa : Staphycoagulase

COX : Cyclo-oxygénase

CTAP3 : Connective Tissue Activating Peptide

Eap : Extracellular adherence protein

Emp : Extracellular matrix protein

FnBP : Fibronectin Binding Protein

FT : Facteur Tissulaire

IRM : Imagerie à Résonance Magnétique

LPS : Lipopolysaccharide

MSCRAMM : Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule

NAP2 : Neutrophil Activating Peptide 2

NETs : Neutrophil Extracellular Traps

Nt5e : Ecto-5'-nucleotidase

PAAP : Platelet Aggregation Associated Protein

PAF : Platelet Activating Factor

PAMP : Pathogen-associated Molecular Pattern

PAR : Protease-activated Receptor

PBP : Platelet Basic Proteins

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PDP : Plasma dépourvu en plaquettes

PF4 : Platelet Factor 4

PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin

PGI2 : Prostaglandine I2

PMP : Platelets microbicidal proteins

PNC : Platelets-Neutrophils Complex

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PRP : Plasma riche en plaquettes

Sar : Staphylococcal accessory regulator

SARM : *S. aureus* Résistant à la Méticilline

SASM : *S. aureus* Sensible à la Méticilline

SdrG : Serin-aspartate repeat-containing protein G

SNC : Système Nerveux Central

Srp : Serin-rich protein

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TGF : Transforming Growth Factor

TLR : Toll Like Receptor

TRAP : Thrombin Receptor-activating Peptide

VASP : Vasodilatator-stimulated Phosphoprotein

VWbp : Von Willebrand binding protein

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figures

Figure 1 : Incidence de l'endocardite infectieuse en fonction de l'âge et du sexe.....16
Figure 2 : Incidence de l'endocardite infectieuse dans la population masculine en fonction de l'âge et du mode d'acquisition.....17
Figure 3 : Epidémiologie globale des pathogènes responsables d'EI.....18
Figure 4 : Pathogénèse de l'EI 21
Figure 5 : Mécanismes de l'endocardite infectieuse à *S. aureus*.....22
Figure 6 : Critères de Duke 29
Figure 7 : Rôle de l'intégrine αIIbβ3 dans l'adhésion des bactéries aux plaquettes 38
Figure 8 : Mécanismes d'adhérence et d'activation plaquettaires médiés par *S. aureus*.....42
Figure 9 : Schéma général des interactions plaquettes-*S. aureus* 45
Figure 10 : Interactions bactériennes impliquant la GpIb plaquettaire 50
Figure 11 : Interactions des plaquettes avec *S. aureus*.....58
Figure 12 : Agrégation plaquettaire obtenue après traitement des PRP de sujets sains par différentes souches de *S. aureus* après 15 minutes (A) et 30 minutes (B) d'incubation. Analyse par agrégation plaquettaire sur une durée de 20 minutes (n= 10).....78
Figure 13 : Agrégation plaquettaire obtenue après traitement des PRP de sujets sains par différentes souches de *S. sanguinis* après 10 minutes d'incubation. Analyse par agrégation plaquettaire sur une durée de 20 minutes (n=10).....79
Figure 14 : Expression de la P-selectine par CMF obtenue après traitement des plaquettes lavées de sujets sains par différentes souches de *S. aureus* (n=12) 80
Figure 15 : Expression de la P-selectine par CMF obtenue après traitement des plaquettes lavées de sujets sains par une souche de *S. sanguinis* (n=10) 80
Figure 16 : Evaluation de l'effet du traitement *in vitro* des plaquettes par différents antiplaquettaires sur l'agrégation et l'activation plaquettaire induite par les différentes souches de *S. aureus* SA P6142 et P2188 (A) et P6141 (B) (n=10) 83
Figure 17 : Evaluation de l'effet du traitement *in vitro* des plaquettes par différents antiplaquettaires sur l'agrégation et l'activation plaquettaire induite par la souche *S. sanguinis* P8633 (A) (n=10), et sur l'agrégation plaquettaire induite par les souches P2754 (B) et P2760 (C).....86

Tableaux

Tableau 1 : Adhésines de *S. aureus* 35
Tableau 2 : Interactions ligands-récepteurs 59
Tableau 3 : Valeurs de MFI de la P-selectine pour les souches de *S. aureus* 79
Tableau 4 : Pourcentages d'agrégation induit par les souches de *S. aureus* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires. 81
Tableau 5 : Valeurs de MFI de la P-selectine pour les souches de *S. aureus* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires. 82
Tableau 6 : Pourcentages d'agrégation induit par les souches de *S. sanguinis* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires. 84
Tableau 7 : Valeurs de MFI de la P-selectine pour *S. sanguinis* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires. 85

Introduction

Les interactions qui peuvent se produire entre les plaquettes et les bactéries au cours des infections jouent un rôle particulièrement important dans la pathogenèse de l'endocardite infectieuse (EI), et notamment dans les complications emboliques qui y sont associées.

L'endocardite infectieuse (EI) est définie comme une infection des valves cardiaques ou de l'endocarde lésé ou sain, consécutive au passage dans la circulation sanguine de microorganismes. L'EI est une pathologie rare et dont l'incidence est relativement stable depuis ces dernières années, malgré des modifications de son épidémiologie. Il s'agit également d'une pathologie sévère malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique avec une mortalité hospitalière de l'ordre de 20%, une mortalité à 5 ans de 40% et une morbidité non négligeable, particulièrement imputables aux complications emboliques survenant au décours de la maladie. Ces dernières peuvent ainsi toucher tous les territoires, cerveau, rate et rein le plus souvent pour les EI gauches, poumons pour les EI du cœur droit.

En raison du rôle majeur des plaquettes dans la genèse de ces complications, l'administration d'antiplaquettaires au décours de ces pathologies présente un intérêt. Toutefois, il existe peu d'études *in vitro* qui se sont intéressées à l'effet des différentes classes d'antiplaquettaires en fonction des espèces et des souches bactériennes.

Nous faisons l'hypothèse que l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries varie en fonction des espèces et des souches testées, et que l'effet des traitements antiplaquettaires varie également en fonction des espèces et des souches bactériennes. Nous avons travaillé sur différentes souches de *S. aureus* et *S. sanguinis*, en utilisant en parallèle une approche fonctionnelle par agrégométrie pour déterminer les profils d'agrégation plaquettaire induite par les bactéries et une approche phénotypique par cytométrie de flux pour déterminer les profils d'activation plaquettaire induite par les bactéries.

Ce travail présentera les généralités sur l'épidémiologie et la physiopathologie des EI afin de restituer le rôle des plaquettes dans cette affection, puis nous nous intéresserons aux mécanismes d'interaction entre plaquettes et bactéries, particulièrement *S. aureus* et *S. sanguinis*, et enfin nous présenterons les résultats de notre étude sur l'utilisation des antiplaquettaires dans un modèle *in vitro* d'interactions plaquettes-bactéries.

PARTIE I :
Généralités sur les Endocardites Infectieuses et Mécanismes d'interaction Plaquettes-Bactéries

I- Généralités sur les Endocardites infectieuses

1. Définition

L'endocardite se définit comme une inflammation de l'endocarde qui correspond à une inflammation de l'endothélium tapissant la surface interne du cœur, notamment au niveau des cavités et des valves cardiaques. Elle est le plus souvent d'origine infectieuse (majoritairement bactérienne, plus rarement fongique), et peut ainsi toucher les valves cardiaques ainsi que tout matériel implanté tel que les prothèses valvulaires, pacemakers, défibrillateurs, ou encore les cathéters veineux centraux. Elle peut plus rarement être d'origine inflammatoire (à la phase aiguë du rhumatisme articulaire aigu ou dans le cadre de maladies de système) ou d'origine néoplasique.
Il s'agit d'une pathologie rare mais grave, mettant en jeu le pronostic vital, avec des conséquences à long terme chez les patients qui y survivent.

Les manifestations cliniques sont représentées par une altération de l'état général du patient, de la fièvre et la détection de la présence d'un souffle cardiaque, qui traduit directement la présence d'une lésion valvulaire. Il existe toutefois une importante variabilité clinique de l'endocardite infectieuse et une complexité qui rendent nécessaire une prise en charge individuelle pour chaque patient.

Les complications de cette affection peuvent être multiples :

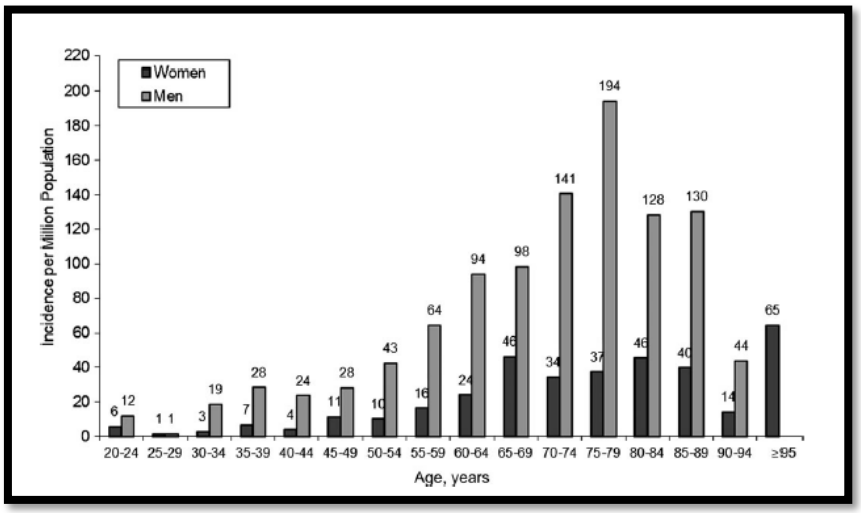
- Insuffisance cardiaque
- Abcès cardiaque (troubles de la conduction)
- Insuffisance rénale
- Anévrismes infectieux
- Hémorragies
- Embolies (cérébrales, spléniques…).

2. Epidémiologie

L'EI est une pathologie rare avec une incidence de 3 à 7 cas pour 100 000 personnes/an (1) dans la population contemporaine d'après les études les plus récentes. Ainsi, en France, l'incidence annuelle est de 33.8 cas par million d'habitants, soit environ 2000 personnes atteintes chaque année, avec une prédominance de la maladie chez les hommes (2). Cette

incidence est stable au cours des quarante dernières années avec une incidence qui stagne autour des 30 cas par million d'habitants. Aux Etats-Unis, l'incidence est un peu plus élevée et a été évaluée à 15 cas pour 100 000 habitants ce qui représente environ 17 000 personnes par an (3). Toutefois, son épidémiologie varie beaucoup selon les zones géographiques (4).

Il s'agit d'une pathologie de l'adulte, avec un âge moyen de 62,3 ans (2), l'incidence de la maladie augmentant à partir de 50 ans avec un pic de survenue chez les hommes de 70-79 ans. Elle touche davantage les hommes (60 à 70% des cas) que les femmes (2).

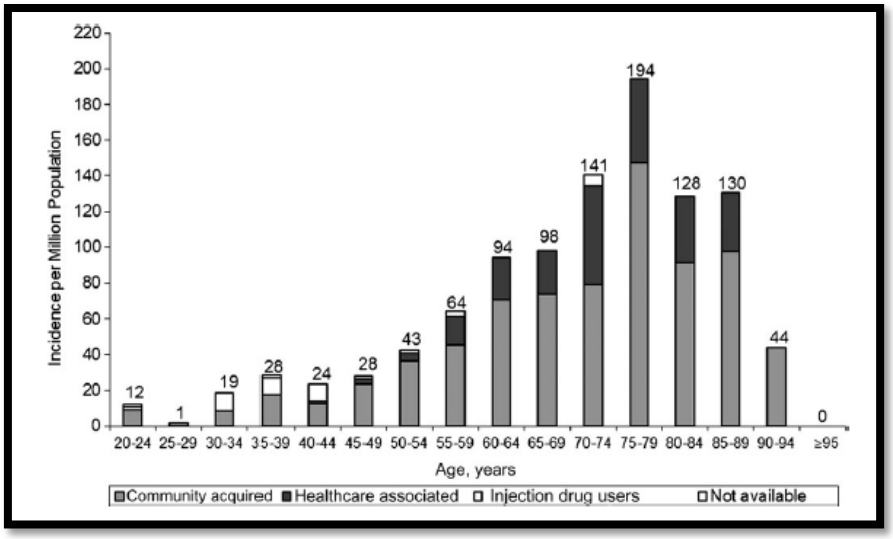


<u>Figure 1</u>: Incidence de l'endocardite infectieuse en fonction de l'âge et du sexe

D'après Selton-Suty et al. (2)

Malgré une incidence stable et les progrès médicaux et chirurgicaux, l'EI est caractérisée par une augmentation de la morbi-mortalité et représente désormais la troisième ou quatrième cause la plus fréquente d'infections mettant en jeu le pronostic vital, après le sepsis, la pneumonie et les abcès intra-abdominaux. Une modification des caractéristiques des patients atteints d'EI est néanmoins constatée avec une augmentation de la moyenne d'âge, une plus grande proportion de patients porteurs de valves prothétiques et autres dispositifs cardiaques, associées à une diminution des cardiopathies rhumatismales, ces dernières étant historiquement le facteur de risque prédominant d'EI (1). Il existe également récemment une augmentation des cas chez les patients sans cardiopathie antérieure connue (2).

La multiplication des gestes invasifs à risque de bactériémie a conduit à une augmentation des EI associées aux soins, représentant désormais presque 30% de l'ensemble des endocardites (5).



<u>Figure 2</u> : Incidence de l'endocardite infectieuse dans la population masculine en fonction de l'âge et du mode d'acquisition

D'après Selton-Suty et al. (2)

A noter qu'un tiers des patients décéderont dans l'année qui suit le diagnostic et que la mortalité sans traitement est de 25%.

Enfin, les endocardites chez les enfants sont des pathologies extrêmement rares.

3. Pathogènes responsables

Les pathogènes responsables d'EI sont des germes équipés de facteurs d'adhésion à l'endocarde, lésé ou non.

Historiquement, les streptocoques oraux étaient les premiers germes impliqués dans les EI, mais le profil microbiologique, comme le profil clinique a considérablement évolué et de nombreuses études récentes montrent que *Staphylococcus aureus* représente désormais la première cause d'EI dans les pays industrialisés, avec une incidence de 80 à 190 cas pour 100 000 habitants par an (6–9). Une diminution de la prévalence des EI à streptocoques oraux associée à une augmentation de celles à *S. aureus* et aux staphylocoques à coagulase négative ont ainsi été constatées. L'augmentation de l'EI à *S. aureus* peut être en grande partie attribuée à l'augmentation des procédures invasives et/ou des situations à risque, incluant la présence de dispositifs intravasculaires. En effet, les infections associées aux soins sont responsables d'un quart à la moitié des EI à *S. aureus* rapportées dans l'étude de Fowler et al (10).

Finalement, les staphylocoques et streptocoques sont actuellement responsables de 80% des EI mais ces proportions sont variables en fonction des régions, et les entérocoques sont les troisièmes germes incriminés dans les EI (11).

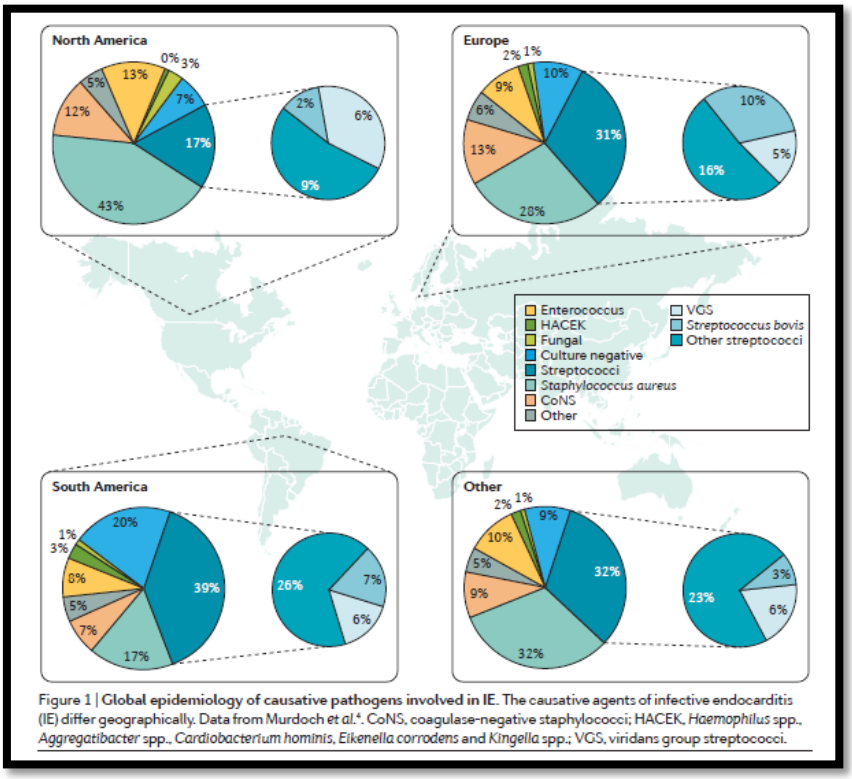


Figure 1 | Global epidemiology of causative pathogens involved in IE. The causative agents of infective endocarditis (IE) differ geographically. Data from Murdoch *et al.*[4]. CoNS, coagulase-negative staphylococci; HACEK, *Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* and *Kingella* spp.; VGS, viridans group streptococci.

<u>Figure 3</u> : Epidémiologie globale des pathogènes responsables d'EI

D'après Holland et al. (12)

Actuellement, un micro-organisme est identifié dans 90% des diagnostics d'EI. Il s'agit des principaux germes cités précédemment, soit les staphylocoques, streptocoques et entérocoques. Cependant, dans 10% des cas, l'hémoculture est négative et ceci peut être la conséquence de trois situations :

- La mise en place d'une antibiothérapie préalable ;
- Une EI due à un micro-organisme de croissance lente ou difficile : streptocoques déficients, *Brucella*, levures. Les bactéries du groupe HACEK (*Haemophilus parainfluenzae, H. aphrophilus, H. paraphrophilus, H. influenzae, Aggregibacter actinomycetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens, Kingella kingae*) sont fréquemment classées dans ce groupe. Il faut pourtant retenir que ce sont des bactéries poussant facilement sur les milieux de culture couramment utilisés ;
- Une EI due à un germe intracellulaire (*Coxiella burnetii, Bartonella, Chlamydia, Tropheryma whippleii*).

4. Physiopathologie

1- Portes d'entrée et sujets à risque

Les portes d'entrée du germe peuvent être multiples et ne sont formellement identifiées que dans 50% des cas. Les portes d'entrée dentaire, digestive, cutanée, ou encore urinaire sont les plus fréquemment retrouvées, mais les portes d'entrée iatrogènes sont également de plus en plus fréquentes : cathéters, pacemakers, chirurgie cardiaque.

L'EI survient majoritairement chez les sujets à risque, sur un endocarde le plus souvent antérieurement pathologique, les cardiopathies à risque étant représentées par :

- La présence de prothèses valvulaires,
- Des antécédents d'endocardite,
- L'existence d'une cardiopathie congénitale,
- Des valvulopathies dont bicuspidie aortique,
- La présence d'autres cardiopathies (dont cardiopathie rhumatismale),
- Les porteurs de pacemaker ou défibrillateur.

Toutefois, d'autres facteurs de risque ont également été identifiés : l'usage de drogues par voie intraveineuse, l'infection par le VIH, le diabète, l'hémodialyse, les soins dentaires, les dispositifs de soins invasifs et le contact avec le système de santé de manière plus générale. Enfin, les endocardites surviennent également plus souvent sur des terrains immunodéprimés (cancers, traitements immunosuppresseurs), d'autant que ces patients présentent fréquemment une porte d'entrée au travers des cathéters de perfusion à demeure.

L'EI n'est pas une seule et unique maladie mais peut en réalité présenter des aspects très différents en fonction du premier organe impliqué, de la pathologie cardiaque sous-jacente, du microorganisme responsable, de la présence ou l'absence de complication et des caractéristiques du patient.

Ainsi, il faut distinguer différents types d'endocardites, notamment selon le caractère « à risque » ou non des patients :

- **EI sur valves natives lésées** : valvulopathie congénitale, rhumatisme cardiaque chronique, lésions dégénératives des valves provoquant des sténoses aortiques ou des régurgitations, antécédents d'endocardite infectieuse, insuffisance valvulaire. Ces EI se traduisent généralement par une atteinte du cœur gauche. Elles concernent 50% des patients, généralement âgés de plus de 60 ans.

- **EI sur valves natives saines** (40% des cas) : le patient présente un cœur apparemment sain, mais l'EI peut en fait révéler une anomalie jusque-là non diagnostiquée.
- **EI sur prothèse valvulaire** : infections précoces après l'opération par introduction d'un inoculum bactérien, fréquentes et graves, dont l'incidence est en augmentation.
- **EI sur stimulateur cardiaque et défibrillateur automatique implantable (DAI)**. Ces EI surviennent le plus souvent dans l'année suivant l'implantation, secondaire à une contamination peropératoire.
- **EI chez les usagers de drogues par voie intraveineuse.** Ce profil concerne des sujets jeunes autour de 30-40 ans avec une atteinte plus fréquente du cœur droit et implication de la valve tricuspide dans 50% des cas. Il n'existe pas de lésions préexistantes chez une majorité de patients, ce sont des formes sévères d'EI.
- **EI nosocomiale**, dont l'incidence est en forte augmentation.

Parmi les endocardites sur valve native, l'incidence des valvulopathies est en nette régression, ne représentant plus que 6 à 20% des endocardites infectieuses. Deux cardiopathies sont cependant en augmentation : la bicuspidie aortique et le prolapsus valvulaire mitral. Les autres cardiopathies congénitales représentent une étiologie stable d'endocardite.

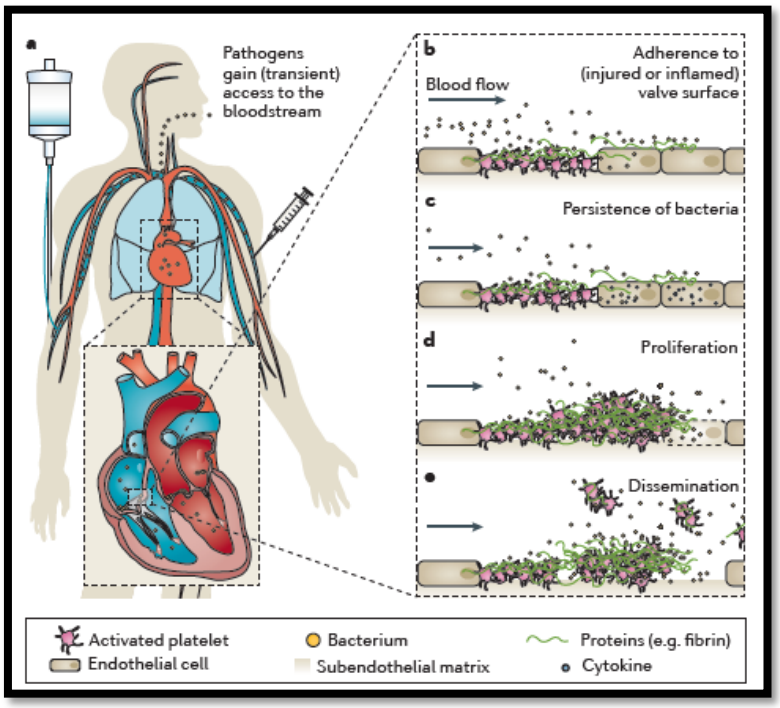
2- Formation de la végétation

En situation physiologique, l'endothélium vasculaire est résistant à la colonisation bactérienne du fait de sa structure et du flux sanguin constant. La survenue d'une EI nécessite donc plusieurs évènements indépendants simultanés.

Ainsi, la formation de la végétation fait classiquement suite à une lésion locale de l'endothélium. Cette lésion peut être mécanique, provoquée par les flux sanguins turbulents causés par une cardiopathie structurale sous-jacente ou par la présence d'un dispositif intracardiaque. Elle peut aussi se développer à partir des conditions systémiques qui provoquent une inflammation endothéliale, ce qui entraîne l'expression de récepteurs qui favorisent le dépôt local de fibronectine. Ce dernier phénomène a été particulièrement décrit chez les patients atteints de pathologies dégénératives valvulaires, de tumeur maligne, de troubles du tissu conjonctif, d'états d'hypercoagulabilité, de sepsis, de consommation de drogues par voie intraveineuse ou encore de brûlures.

Sur cet endocarde lésé, l'exposition du sous-endothélium pro-coagulant et pro-adhésif favorise l'adhésion de plaquettes au collagène et au facteur Von Willebrand qui se retrouvent exposés à la surface du sous-endothélium via leurs récepteurs : la GpVI, l'intégrine α2β1 et la GpIb-IX-V, ce qui favorise la formation du thrombus plaquettaire. A la suite de cette adhésion se produit l'activation plaquettaire, qui aboutit finalement à une agrégation des plaquettes entre elles grâce à un changement de conformation de l'intégrine αIIbβ3 par une signalisation « inside-out » qui permet son activation et par conséquent la liaison du fibrinogène (ou plus rarement du facteur Von Willebrand) à cette intégrine. Cette liaison va alors déclencher à son tour une signalisation « outside-in », qui représente une boucle d'amplification de ce phénomène (13).

Le thrombus ainsi formé, appelé végétation dans le cadre de l'EI, est constitué de plaquettes, fibrine, fibronectine, de protéines plasmatiques et plaquettaires et de cellules inflammatoires, et représente alors une matrice idéale à la fixation de germes (14).



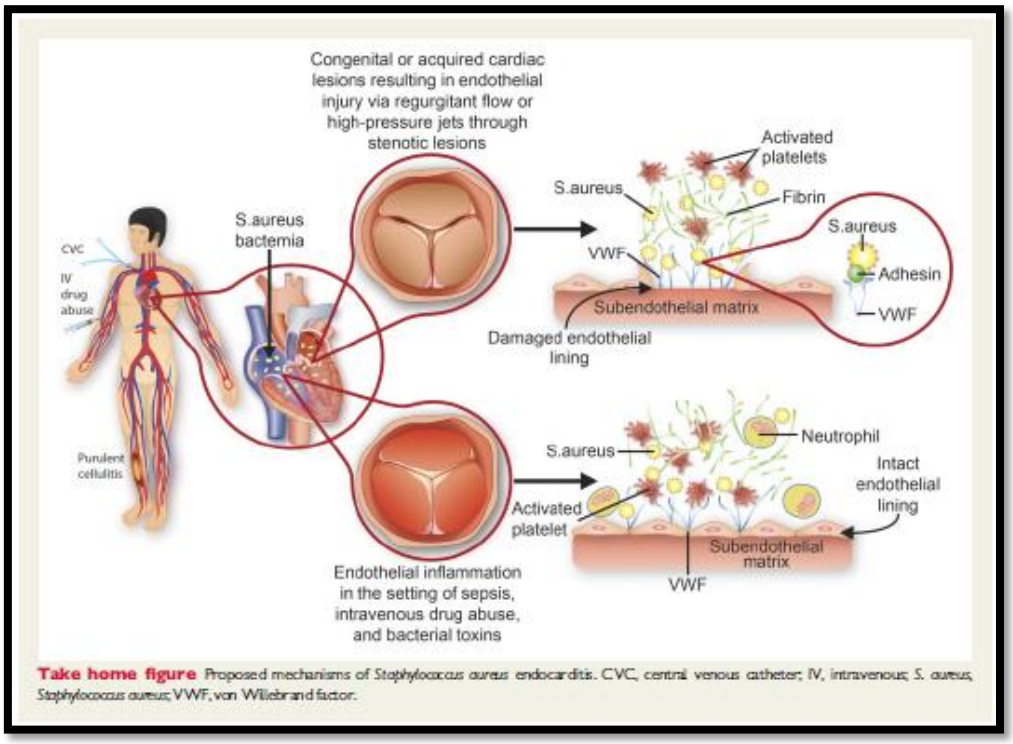
<u>Figure 4</u> : Pathogenèse de l'EI

D'après Holland et al. (12)

Lors d'une bactériémie transitoire, provoquée spontanément lors de la mastication, du brossage de dents mais aussi d'autres activités quotidiennes, ainsi que pendant des procédures microchirurgicales non stériles, les bactéries vont pouvoir adhérer à la végétation, qui était jusque-là stérile, et cette adhésion implique les tissus valvulaires et des récepteurs bactériens. Les bactéries vont ensuite pouvoir persister et croître dans les lésions cardiaques.

De plus, les bactéries adhérentes attirent et activent les monocytes sanguins pour produire plus de Facteur Tissulaire (FT) et de cytokines. Les cytokines et autres facteurs pro-coagulants contribuent ainsi à l'élargissement de la végétation, au délabrement et à la destruction des tissus valvulaires et à l'extension à l'espace péri-valvulaire. Il existe alors une possibilité de dissémination embolique aux autres organes distants, notamment le rein, la rate et le cerveau.

Dans le cas des lésions inflammatoires, le mécanisme diffère de ce qui se produit pour les lésions mécaniques. En effet, les cellules endothéliales répondent à une inflammation locale par l'expression de diverses molécules telles que les intégrines de la famille β1 qui lient la fibronectine à la surface de l'endothélium. Une surface adhésive est alors disponible pour les bactéries circulantes (15).



<u>Figure 5</u> : Mécanismes de l'endocardite infectieuse à *S. aureus*

D'après Esquer Garriguos et Sohail (16)

Toutefois, l'EI peut également survenir sur une valve « normale », et l'inflammation endothéliale est supposée être le facteur prédisposant menant à la formation de la végétation plutôt qu'une lésion mécanique. Liesenborghs et al. (17) ont très récemment étudié les mécanismes de formation de la végétation sur un modèle murin d'EI induite par une inflammation. Ils démontrent qu'une augmentation de la sécrétion du facteur Von Willebrand et de la P-selectine, ainsi qu'une diminution de l'expression de la VE-cadhérine sont les étapes

inaugurales de la formation de la végétation, ce qui n'est pas le cas dans le modèle d'EI lésionnelle. De plus, dans le modèle d'EI induite par l'inflammation, les agrégats thrombus-plaquettes adhèrent à l'endothélium intact et une adhésion bactérienne augmentée a été constatée, alors qu'aucune adhésion bactérienne n'a été constatée chez les souris avec bactériémies mais sans inflammation de l'endocarde.

L'adhésion bactérienne précoce est donc un facteur indispensable pour développer une EI, quel que soit le mécanisme, et la capacité des micro-organismes à former des végétations sur la surface de l'endocarde dépend ainsi d'une combinaison de facteurs de l'hôte et du pathogène.

5. Manifestations cliniques et complications

La présentation typique de l'EI associe un syndrome infectieux, des signes cardiaques et des signes extracardiaques.

1- Le syndrome infectieux

Un des symptômes majeurs de l'EI est représenté par la fièvre, retrouvée chez 80% des patients (6). Elle peut être isolée, ou associée à d'autres manifestations telles qu'une altération de l'état général, un amaigrissement ou une splénomégalie (11% des cas). Cette dernière est plus fréquemment observée dans les formes chroniques de l'EI, et peut être particulièrement douloureuse en cas d'embolie ou d'infarctus splénique.

A noter que toute fièvre chez un sujet porteur d'un souffle cardiaque doit faire évoquer le diagnostic d'endocardite et pratiquer des hémocultures. La fièvre est toutefois moins fréquemment retrouvée chez les patients âgés ou immunodéprimés.

2- Les signes cardiaques

L'apparition d'un souffle cardiaque ou sa modification est constatée chez 48% des patients et représente le deuxième signe majeur de l'endocardite. L'EI peut également être révélée par une complication cardiaque, qui sera la première cause de mortalité et la première indication chirurgicale à la phase aiguë de l'EI (9). Ainsi, la complication la plus fréquente est l'insuffisance cardiaque, le plus souvent gauche.

3- Les manifestations extracardiaques

Elles sont diverses et sont principalement représentées par :

- **Les signes cutanéo-muqueux :** inconstants, mais possédant une grande valeur diagnostique. Ils sont la conséquence de phénomènes vasculaires et immunologiques : le « faux panaris » d'Osler (nodosités rouges retrouvées principalement au niveau de la pulpe des doigts ou des orteils), les plaques de Janeway (placards érythémateux retrouvés au niveau de la plante des pieds ou de la paume des mains, ils sont très rares, présents chez seulement 5% des patients), l'hippocratisme digital qui est plus fréquemment présent, et enfin un purpura pétéchial peut être fréquemment observé mais il s'agit d'un signe très faiblement spécifique, retrouvé au niveau oculaire sous forme de purpura conjonctival ou de taches de Roth (hémorragies associées à des exsudats blanchâtres), chacun présent dans 5% des cas ;
- **Les signes articulaires :** fréquents, représentés par des arthralgies, lombalgies ou encore myalgies, les arthrites pouvant être de toute localisation avec *S. aureus*, mais également par une spondylodiscite à streptocoque ou autres agents pathogènes ;
- **Les signes neurologiques :** ils peuvent être révélateurs de l'EI et ont une valeur pronostique péjorative.

6. Complications

De nombreuses complications peuvent survenir au décours de l'EI et influencent fortement le pronostic de la maladie. Ainsi le type de germe responsable, le moment du diagnostic, l'existence d'une complication, d'une insuffisance cardiaque ou encore le terrain du patient chez lequel elle se produit vont avoir des conséquences sur l'évolution de l'EI et son pronostic.

1- Complications cardiaques

Ce sont logiquement les complications retrouvées le plus souvent et qui sont parmi les plus graves. L'insuffisance cardiaque peut ainsi compliquer l'EI. Elle survient à la suite des lésions valvulaires qui entraînent des fuites valvulaires pouvant être sévères. Sa survenue constitue un signe de gravité majeur et peut donner lieu fréquemment à une intervention chirurgicale, qui améliore son pronostic (18).

D'autres complications cardiaques peuvent être observées telles que l'apparition de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, dépistés sur l'électrocardiogramme, les abcès péri-valvulaires, témoignant d'une extension importante de l'infection, une atteinte péricardique ou encore myocardique, rare.

2- Complications emboliques

Elles représentent une complication majeure de l'EI, pouvant mettre en jeu le pronostic vital. Une embolisation systémique est retrouvée dans 22 à 50 % des EI (2,19). Les complications emboliques sont particulièrement associées aux EI sur valve prothétique (20), et sur valve mitrale (21), aux EI associées à l'utilisation de drogues par voie IV (22), à l'âge (23) et aux EI causées par certains micro-organismes tels que *S. aureus* (21), *S. bovis* (24), ou encore *Candida spp*.

Ces évènements emboliques sont provoqués par le détachement et la migration de morceaux de la végétation cardiaque. Elles peuvent survenir avant le diagnostic, mais aussi pendant le traitement de la maladie ou encore après que le traitement soit fini, bien que la plupart de ces évènements se produisent dans les 2 à 4 semaines qui suivent le diagnostic de la maladie (25,26). Ainsi, le risque de nouvel évènement embolique survenant après initiation de l'antibiothérapie n'est plus que de 6 à 21% en fonction des études (25–27). Les emboles se localisent dans des territoires artériels majeurs tels que le cerveau, les poumons, les artères coronaires, la rate, l'intestin, le rein et les extrémités (8). Les territoires les plus fréquemment atteints sont le cerveau et la rate, particulièrement dans les EI atteignant le côté gauche du cœur, tandis que l'embolie pulmonaire est plus fréquente dans les EI sur valve native du côté droit et les EI sur pacemaker.

Jusqu'à 65% des évènements emboliques peuvent impliquer le système nerveux central (SNC) et plus de 90% des embolies du SNC sont situées au niveau de la distribution de l'artère cérébrale moyenne (28). La survenue d'un accident vasculaire cérébral (AVC) augmente la morbidité et la mortalité de l'EI (29).

De manière surprenante, les évènements emboliques peuvent passer totalement inaperçus chez 20 à 50% des patients atteints d'EI, particulièrement lorsqu'ils se produisent dans la circulation cérébrale ou splénique, et peuvent être diagnostiqués par l'imagerie non-invasive (27,30). Une

chirurgie précoce est alors recommandée pour les patients dont le risque de survenue d'évènements emboliques est le plus élevé.

La réalisation d'échocardiographies transthoracique et transoesophagienne est importante pour la prédiction des évènements emboliques chez les patients atteints d'EI (27). En effet, les caractéristiques morphologiques de la végétation observée à l'échocardiographie fournissent des informations importantes sur le risque de survenue d'embolie, et par conséquent particulièrement utiles quant à la conduite à tenir avec le patient. Des études d'association entre risque embolique et taille et mobilité des végétations ont été menées depuis une vingtaine d'années. Thuny et al. ont ainsi montré que des végétations de taille supérieure à 10 mm, ainsi qu'une mobilité sévère de ces végétations étaient prédictifs de nouveaux évènements emboliques avec une mortalité à 1 an de 20.6% (31). De plus, des végétations de taille supérieure à 15 mm sont fortement prédictives de mortalité à 1 an indépendamment des autres facteurs de prédiction de mortalité et des comorbidités. Il existe donc un intérêt majeur à pratiquer une échocardiographie de manière précoce dans le diagnostic de l'EI.

Enfin, le traitement antibiotique devra faire diminuer la taille de ces végétations pour un meilleur pronostic. Les patients dont les végétations ne diminuent pas voire augmentent de taille pendant l'antibiothérapie présentent deux fois plus d'évènements emboliques que ceux dont la taille de la végétation diminue (32).

3- Complications neurologiques

Elles sont retrouvées chez 15 à 30% des patients avec une EI et sont provoquées majoritairement par une embolisation de la végétation provoquant une occlusion des artères cérébrales, et pouvant conduire à un AVC ischémique ou hémorragique, ou à un accident ischémique transitoire. L'hémorragie cérébrale est la complication neurologique la plus grave de l'EI mais elle est heureusement peu fréquente.

Néanmoins, la dissémination des fragments emboliques infectés peut également provoquer la survenue de méningites ou encore d'abcès cérébraux. Des encéphalopathies toxiques peuvent également être observées.

Finalement, les manifestations neurologiques correspondent aux premiers signes de l'EI chez presque 50% des patients (28), et elles sont significativement plus associées aux EI provoquées

par *S. aureus* (29% VS 10% pour les autres étiologies dans l'étude d'Heiro et al. (28)). Aucune différence n'est constatée selon que l'EI atteint les valves aortiques ou mitrales. Enfin, ces complications sont associées à une surmortalité ainsi qu'à la présence de séquelles chez les patients, particulièrement en cas d'AVC.

4- Complications rénales

Ces complications sont liées aux phénomènes immunologiques qui se produisent dans la physiopathologie de l'EI et correspondent à une protéinurie, une hématurie (25% des cas) voire une insuffisance rénale par atteinte glomérulaire.
Elles peuvent cependant être la conséquence d'une toxicité des traitements antibiotiques utilisés pour traiter l'EI.

5- Mortalité

La mortalité intra-hospitalière associée à l'EI varie de 15 à 30% (33,34). L'identification rapide des patients les plus à risque permet toutefois de changer le cours de la maladie et d'améliorer son pronostic. Les principaux facteurs prédictifs de mortalité à long terme sont l'âge avancé, la présence de comorbidités chez le patient, les récidives de l'EI et l'insuffisance cardiaque, particulièrement lorsqu'une chirurgie cardiaque ne peut être réalisée, ainsi que la survenue d'évènements emboliques. Les EI atteignant le côté gauche du cœur sont également de moins bon pronostic que celles atteignant le côté droit, de même que les EI associées aux soins par rapport aux EI communautaires, les EI sur valve prothétique par rapport aux EI sur valve native et enfin les EI non associées à l'utilisation de drogues par voie IV par rapport à celles qui le sont (7). De plus, *S. aureus* est le germe qui représente le facteur le plus important associé à la mortalité intra-hospitalière par rapport aux autres germes pouvant être responsables d'EI (2).

7. Diagnostic

Le diagnostic purement clinique de l'EI est difficile. En réalité, le diagnostic n'est simple que pour une minorité de patients qui ont une histoire cohérente et des manifestations

oslériennes classiques. Néanmoins, l'histoire n'est que peu cohérente et la clinique peu évocatrice chez la plupart des patients. Il faut donc y penser devant des signes d'appel très variés, des localisations secondaires qui peuvent apparaître au premier plan, ou encore des complications révélatrices. L'intensité des symptômes et leur évolution dans le temps sont également très variables, allant des formes aiguës septicémiques, d'évolution brutale sur quelques jours, à des formes très lentes, évoluant sur plusieurs semaines, mois voire années, évoquant une maladie de système.

Des cas avec des manifestations limitées de l'EI peuvent survenir de manière précoce au cours de la maladie, particulièrement chez les patients consommateurs de drogues par voie intraveineuse chez qui l'EI résulte souvent d'une infection aiguë des valves cardiaques droites.

Ainsi, la variabilité de la présentation clinique et la nécessité d'un diagnostic précoce mènent à une exigence de stratégies diagnostiques à la fois sensibles et spécifiques.

Le diagnostic de l'EI repose donc finalement sur la combinaison de résultats cliniques, biologiques et microbiologiques, et échocardiographiques. En effet, des hémocultures doivent être pratiquées dès les premiers symptômes afin de mettre en évidence une bactériémie. Cependant, elles sont stériles chez presque un tiers des patients, en raison de la mise en place d'une antibiothérapie préalable au prélèvement ou encore à une infection par des germes à croissance intracellulaire ou à croissance lente, comme nous avons pu l'évoquer précédemment.

D'autres examens biologiques de routine tels qu'une numération sanguine pouvant mettre en évidence une hyperleucocytose inconstante associée à une anémie normochrome normocytaire, le dosage de la protéine-C réactive ainsi que de la procalcitonine, ou encore la réalisation d'une électrophorèse des protéines plasmatiques soulignant la présence d'une hypergammaglobulinémie polyclonale, peuvent contribuer au diagnostic en révélant notamment l'existence d'un syndrome inflammatoire chez le patient mais sont non spécifiques de l'EI.

Le diagnostic est donc le plus souvent basé sur la détection d'une végétation sur les valves cardiaques, mise en évidence par échocardiographie transthoracique en première intention, le plus souvent associée à une échocardiographie transoesophagienne, cette dernière étant plus invasive et plus chère, mais plus efficace pour détecter des petites végétations (4). Trois caractéristiques morphologiques des végétations sont ainsi facilement identifiables : leur mobilité, leur ampleur et leur taille. Ces critères auront également une valeur pronostique

importante pour l'issue de la maladie (19). D'autres techniques d'imagerie peuvent également être utilisées telles que l'IRM (imagerie à résonance magnétique), le TEP-scanner au ^{18}FDG ou d'autres modalités d'imagerie fonctionnelle.

Grâce à l'ensemble de ces paramètres, les critères de diagnostic précis de l'EI ont été établis : il s'agit des critères de Duke.

Definite IE
Pathological criteria • Microorganisms demonstrated by culture or on histological examination of a vegetation, a vegetation that has embolized, or an intracardiac abscess specimen; or • Pathological lesions; vegetation or intracardiac abscess confirmed by histological examination showing active endocarditis **Clinical criteria** • 2 major criteria; or • 1 major criterion and 3 minor criteria; or • 5 minor criteria
Possible IE
• 1 major criterion and 1 minor criterion; or • 3 minor criteria
Rejected IE
• Firm alternate diagnosis; or • Resolution of symptoms suggesting IE with antibiotic therapy for ≤4 days; or • No pathological evidence of IE at surgery or autopsy, with antibiotic therapy for ≤4 days; or • Does not meet criteria for possible IE, as above

<u>Figure 6</u> : Critères de Duke

D'après l'ESC 2015 (35) *adapté de Li et al.* (36)

8. Traitement

La prise en charge de l'EI se doit de se faire par une équipe multidisciplinaire incluant au minimum un spécialiste des maladies infectieuses, un cardiologue et un chirurgien cardiaque (35). L'objectif du traitement est d'éradiquer le germe infectant les végétations, ce qui permet d'éviter les rechutes. Les lésions cardiaques extensives et destructrices, de même que les complications extracardiaques sont également à prendre en charge afin de réduire la morbi-mortalité de l'EI.

Le principal traitement de l'EI est donc basé sur l'utilisation d'une antibiothérapie prolongée par voie IV, adaptée en fonction du germe incriminé et de son antibiogramme, avec une nécessité d'atteindre de fortes concentrations plasmatiques pendant de longues durées pour

avoir un effet bactéricide sur les bactéries « dormant » dans les foyers infectieux. Le traitement antibiotique permet d'obtenir de bons résultats chez les sujets sans facteur pronostic défavorable (37). Il doit être mis en œuvre le plus précocement possible après le diagnostic.

La chirurgie est nécessaire dans 20 à 30 % des cas en phase aiguë, et 20 à 40% des cas en phase tardive. Les principales indications sont une défaillance cardiaque réfractaire causée par une insuffisance valvulaire, un sepsis persistant provoqué par un foyer retirable chirurgicalement, un anneau valvulaire ou un abcès myocardique, ou encore une embolisation persistante mettant en jeu le pronostic vital (15). Elle concerne donc finalement près de la moitié des patients atteints d'EI (2,34). Cette chirurgie est à réaliser rapidement chez les patients à haut risque pour prévenir l'apparition d'un premier épisode neurologique ou une récurrence, idéalement avant le 15e jour après le diagnostic (18). Elle est alors associée à de bons résultats à long terme et n'augmente pas la mortalité intra-hospitalière (37).

Une antibioprophylaxie est à envisager chez les sujets les plus à risque, cités précédemment, dans des situations potentiellement à risque de déclencher des bactériémies et donc des EI : procédures dentaires principalement, et de manière plus restreinte dans le cas des procédures invasives du tractus respiratoire, gastro-intestinal, génito-urinaire ou encore dermatologique ou musculosquelettique, en fonction de leur niveau de menace respectif (35).

9. Conclusion

L'EI est une pathologie rare mais grave avec une mortalité qui reste élevée. Son profil épidémiologique s'est modifié au cours du temps avec l'apparition de nouveaux facteurs de risque environnementaux ainsi qu'une modification des caractéristiques des patients atteints. L'incidence est toutefois stable depuis de nombreuses années.

Le diagnostic de cette maladie n'est pas toujours évident et nécessite un faisceau d'arguments cliniques, microbiologiques et échocardiographiques. Le traitement est ainsi basé sur une prise en charge multidisciplinaire avec la présence d'infectiologues, cardiologues et chirurgiens cardiaques, et repose majoritairement sur un traitement antibiotique prolongé, de plus en plus souvent associé à une chirurgie.

II- Interactions Plaquettes-Bactéries

1. Généralités

Les plaquettes sont à l'interface entre hémostase et immunité. En effet, elles sont un composant clé du système immunitaire inné, supporté notamment par la présence des Toll Like Receptor (TLR) à leur surface. Toutefois, elles exercent également un rôle majeur au sein de l'hémostase primaire afin de réparer les brèches vasculaires à travers la formation du clou plaquettaire. Ce mécanisme a deux fonctions : éviter une perte sanguine importante, mais aussi bloquer l'accès aux potentiels pathogènes à l'intérieur du système vasculaire.

De plus, l'interaction plaquettes-bactéries joue un rôle crucial dans la pathogenèse des infections cardiovasculaires dont l'EI, et l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries possède un rôle particulier dans la pathogenèse de l'EI.

Lorsque les plaquettes sont activées, elles sécrètent le contenu de leurs granules, qui est connu pour contenir plus de 300 protéines, telles que des molécules bioactives comme l'ADP et la sérotonine. L'ADP agit pour recruter plus de plaquettes dans le thrombus croissant, tandis que la sérotonine provoque une vasoconstriction pour réduire la perte sanguine. Enfin, les cytokines et chimiokines sécrétées vont recruter les leucocytes pour gérer une potentielle infection, et les peptides antimicrobiens sécrétés agissent pour tuer le pathogène.

Néanmoins, les plaquettes peuvent également être activées dans des localisations autres que des blessures, ce qui peut mener à des conséquences graves telles que l'EI ou la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Ainsi, des études ont montré que certaines bactéries ont la capacité d'induire une agrégation plaquettaire *in vitro*, et que cette capacité corrèle avec leur capacité à induire une EI (38). L'agrégation plaquettaire joue donc un rôle majeur dans la pathogenèse de l'EI.

Trois mécanismes existent alors pour la médiation des interactions entre pathogènes et plaquettes :

- **Un mécanisme indirect :** Liaison de la bactérie à une protéine plasmatique qui est un ligand pour un récepteur plaquettaire ;
- **Un mécanisme direct :** Liaison directe de la bactérie à un récepteur plaquettaire ;
- **La sécrétion de produits bactériens** tels que les toxines qui interagissent avec les plaquettes.

Il existe également des interactions qui n'activent pas les plaquettes, et celles-ci sont généralement de haute affinité et jouent probablement un rôle dans le support de l'adhésion plaquettaire sous des conditions de flux sanguin turbulent. On pourrait ainsi supposer que les protéines bactériennes qui induisent l'agrégation sont différentes de celles qui induisent l'adhésion. De même, l'adhésion et l'activation des plaquettes peuvent résulter de mécanismes indépendants médiés par différents composants bactériens ainsi que différents récepteurs plaquettaires (39). Ainsi, une bactérie peut avoir un phénotype d'activation, d'adhésion, les deux ou aucun des deux, et ces différents phénotypes peuvent être spécifiques pour différentes maladies

Plusieurs études sur l'agrégation plaquettaire *in vitro* induite par les bactéries ont été menées et il apparaît qu'elle est souvent caractérisée par la présence d'un temps de latence, très variable en fonction des espèces bactériennes. Une augmentation de la concentration de bactéries utilisée peut réduire ce temps de latence mais ne le fait jamais totalement disparaître (40,41). Le mécanisme est donc différent de l'agrégation plaquettaire classiquement induite par les agonistes plaquettaires solubles pour lesquels il n'existe pas de temps de latence. De plus, l'agrégation induite par les bactéries suit un processus tout ou rien, contrairement à l'agrégation induite par les agonistes plaquettaires habituels qui peuvent ne provoquer qu'une agrégation partielle ou réversible.

Comprendre les interactions plaquettes-bactéries offre alors la possibilité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans les infections vasculaires. *S. aureus* et *S. sanguinis* sont connus pour être parmi les espèces bactériennes les plus fréquemment impliquées dans les évènements emboliques dans l'EI, c'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à ces deux pathogènes.

2. Interactions Plaquettes - *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une bactérie extrêmement bien équipée en facteurs pathogéniques, incluant les adhésines de surface qui favorisent la colonisation des tissus, et les exo-enzymes et toxines qui favorisent les dommages tissulaires et la propagation de la maladie (7). L'équipe de Sullam a mis en évidence en 1996, grâce à l'utilisation d'une souche mutante dépourvue de capacité de liaison dans un modèle lapin d'EI, que la liaison directe de *S. aureus* aux plaquettes est bien un déterminant majeur de sa virulence dans la pathogénèse de l'EI (42). En effet, les animaux qui

ont été infectés avec la souche mutante développent significativement moins fréquemment d'EI et la densité des micro-organismes au sein des végétations est significativement moins importante qu'avec la souche sauvage de *S. aureus*. Une incidence réduite de la dissémination métastatique dans les reins ainsi qu'une diminution des concentrations de bactéries dans le parenchyme rénal ont également été observées avec la souche mutante (42).

Les interactions directes avec *S. aureus* se produisent notamment lorsque les protéines de la paroi cellulaire de la bactérie se lient directement aux récepteurs de l'hôte exposés. Les molécules bactériennes exposent ainsi typiquement des propriétés agonistes-like vis-à-vis du récepteur de l'hôte, et la liaison aboutit le plus souvent à l'activation des cellules de l'hôte.

Les interactions indirectes nécessitent quant à elles une molécule accessoire, qui correspond généralement à une protéine plasmatique qui est un ligand naturel pour le récepteur de l'hôte, et qui va permettre de lier *S. aureus* avec la cellule hôte : c'est notamment le cas du fibrinogène et de la fibronectine.

Enfin, une interaction alternative se produit lorsque *S. aureus* sécrète une protéine ou une toxine capable de se lier directement au niveau des cellules de l'hôte.

Une des particularités de *S. aureus* est qu'il est capable à lui seul d'induire l'expression de Facteur Tissulaire (FT) par les cellules endothéliales, contrairement aux streptocoques et à *S. epidermidis*, qui ont toujours besoin de monocytes sécrétant de l'interleukine 1 et donc d'une lésion endothéliale. Ceci explique l'implication importante de *S. aureus* dans les EI sur valves natives saines (9).

Toutes ces interactions se font par l'intermédiaire des principaux récepteurs plaquettaires que sont l'intégrine αIIbβ3, la GpIbα et le FcγRIIa. La liaison initiale de *S. aureus* à la surface plaquettaire est un processus rapide et saturable, mais également réversible, qui dépend du nombre de récepteurs disponibles à la surface des plaquettes pour les bactéries, et donc du nombre de cellules de *S. aureus* qui vont pouvoir s'y fixer (38).

1- Rôle de l'intégrine αIIbβ3

L'intégrine αIIbβ3 est la glycoprotéine membranaire la plus abondante présente à la surface des plaquettes. Elle fait partie de la famille des récepteurs homodimériques des intégrines qui

régulent l'adhésion plaquettaire et la signalisation. Il existe également un pool additionnel localisé dans les granules alpha et le système canaliculaire ouvert des plaquettes. Lors de l'activation plaquettaire, son expression peut être augmentée jusqu'à 50%. L'intégrine αIIbβ3 correspond en fait au récepteur plaquettaire du fibrinogène et régule la liaison des plaquettes avec le fibrinogène, ce qui va finalement aboutir à la formation des agrégats plaquettaires (43).

Plusieurs études ont montré que *S. aureus* était capable d'adhérer aux plaquettes d'une manière augmentée par le fibrinogène (Figure 7) (44). Ainsi, les MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) regroupent de nombreuses protéines de *S. aureus* hautement similaires entre elles, 24 au total, permettant à la bactérie d'adhérer aux tissus, ce qui représente une étape critique dans l'établissement des infections. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine riche en répétitions serine aspartate.

Parmi ces MSCRAMMs, les plus importantes sont les Clumping Factor A (45) et B (46) (ClfA et ClfB), ainsi que les Fibronectin Binding Protein A et B (FnBPA et FnBPB) (47). Ce sont des protéines de liaison au fibrinogène pour la plupart, mais également à la fibronectine pour les FnBP.

Table 1 Staphylococcus aureus adhesins*

Adhesin	Binding ligand	Role in sepsis/endocarditis
Cell wall-anchored proteins		
Clumping factor A (ClfA)	Fibrinogen γ-chain Complement factor I	Adhesion to fibrin(ogen), clumping and immune evasion, platelet aggregation Immune evasion
Clumping factor B (ClfB)	Fibrinogen γ-chain	Minor, mostly implicated in colonization
Fibronectin binding proteins (FnBPA and FnBPB)	Fibrinogen γ-chain Fibronectin Elastin Plasminogen	Adhesion to fibrin(ogen), clumping and immune evasion, platelet aggregation Adhesion, endothelial cell invasion Unknown Breaking free from biofilms
Protein A (SpA)	IgG Fc, IgM Fab VH3 subclass,TNFR1 von Willebrand factor	Immune evasion Adhesion, platelet aggregation
Collagen adhesin (Cna)	Collagen Complement protein C1q	Adhesion Immune evasion
Bone sialoprotein-binding protein	Fibrinogen α-chain Complement regulator C4BP	Unknown
Serine-rich adhesin for platelets (SraP)	N-acetylneuraminic acid, unknown platelet ligand	Platelet binding, implicated in endocarditis
S. aureus iron-regulated surface determinant B (IsdB)	Haem β3 integrins	Iron aquisition Endothelial cell invasion, platelet activation
Secreted proteins		

Secreted proteins		
Staphylocoagulase	Thrombin, fibrinogen	Coagulase activity: immune evasion, growing of endocarditis lesions, platelet activation
von Willebrand factor binding protein (VWbp)	Thrombin, fibrinogen von Willebrand factor	Coagulase activity: immune evasion, growing of endocarditis lesions, platelet activation Adhesion under shear stress
Staphylokinase	Plasmin(ogen)	Activation of fibrinolysis, spreading trough tissue barriers, immune evasion
Extracellular fibrinogen binding protein (Efb)	Fibrinogen, complement C3	Immune evasion
Extracellular matrix binding protein (Emp)	Fibronectin, fibrinogen, collagen and vitronectin	Adhesion
Extracellular adherence proteins (Eap)	Prothrombin, fibrinogen, fibronectin, thrombospondin-1, bone sialoprotein, vitronectin Osteopontin Homophilic interactions ICAM-1	Adhesion, immune evasion, platelet and endothelial cell activation Bacterial clustering Endothelial cell binding, immune evasion
Alfa-toxin	ADAM-10	Cytotoxicity, neutrophil killing, platelet activation, endothelial cell activation and VWF release
Beta toxin		Biofilm ligase, sphingomyelinase activity: cytotoxicity, platelet aggregation, endothelium disruption
Staphylococcal superantigen-like 5 (SSL5)	PSGL-1	Immune evasion, platelet activation

<u>Tableau 1</u> : Adhésines de *S. aureus*

D'après Liesenborghs et al. (48)

a) ClfA et FnBP

Le ClfA se lie au fibrinogène par l'intermédiaire de la région C-terminale de la chaîne gamma du fibrinogène, comme c'est également le cas pour la FnBPA et la FnBPB. Il contient environ 500 résidus de domaine de liaison au fibrinogène à sa surface (39). Le fibrinogène lié à la bactérie régule alors l'activation plaquettaire de manière similaire aux autres surfaces recouvertes de fibrinogène.

Les interactions médiées par les FnBP impliquent principalement la fibronectine. La FnBPA peut ainsi interagir avec deux molécules de fibronectine sur chacun de ses domaines de liaison à la fibronectine, qui sont répétés en tandem et situés sur le domaine C-terminal de la molécule. Toutefois, elles peuvent également lier l'intégrine αIIbβ3 par l'intermédiaire du fibrinogène (49). En effet, les FnBPA et FnBPB possèdent un domaine A N-terminal ayant une similarité de séquence avec le ClfA, et qui interagit donc avec la même région du fibrinogène que le ClfA. La liaison avec la fibronectine réduit toutefois l'affinité de la FnBP pour le fibrinogène et c'est donc cette liaison qui prédomine de manière générale car la fibronectine est omniprésente dans le plasma et la matrice extracellulaire (50).

Ainsi, les MSCRAMMs liées au fibrinogène et à la fibronectine peuvent interagir avec l'intégrine αIIbβ3, ce qui génère un « outside » signal capable de déclencher l'activation plaquettaire.

L'agrégation plaquettaire induite par le ClfA et la FnBP via le fibrinogène et la fibronectine est une agrégation rapide, et peut alors expliquer l'importance de l'incidence de *S. aureus* dans l'EI et la puissance de cette bactérie à déclencher la formation d'agrégats en présence d'anticorps dirigés contre elle.

Des études d'interactions plaquettes-bactéries *in vivo* ont été menées pour appuyer ces constatations, notamment avec des modèles de souris infectées par *S. aureus*. Il a ainsi été mis en évidence que celles-ci développent effectivement des thrombus riches en plaquettes selon un processus dépendant du ClfA, car l'administration d'un domaine bloquant le site du fibrinogène du ClfA empêche la formation de ces thrombus (51). De plus, l'utilisation d'une souche de *Lactococcus lactis* par Que et al., normalement dépourvue de toute virulence, modifiée pour exprimer soit le ClfA soit la FnBPA a permis de montrer que l'expression de ces adhésines lui confère des capacités d'adhérence, et que les deux adhésines sont des facteurs de virulence critiques (52). La même équipe a ensuite distingué 4 ans plus tard les rôles respectifs du ClfA et de la FnBPA avec le même modèle expérimental. En effet, le ClfA apparaît nécessaire à la colonisation précoce des valves endommagées mais non suffisant à la persistance de l'infection, car la bactérie n'exprimant que cette adhésine est éradiquée en 48 heures. Au contraire, la FnBPA permet l'augmentation progressive des titres de la bactérie dans la végétation et dans la rate, ainsi que l'atteinte de l'endothélium adjacent, et favorise donc à la fois la colonisation et la persistance de l'infection (53).

Les résultats obtenus par Veloso et al. sont en accord avec ces précédentes observations et suggèrent que le fibrinogène est le médiateur principal de l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus*, et que la liaison de la fibronectine n'est pas nécessaire à l'infection de la valve mais elle contribue à la sévérité et à la progression de la maladie (54).

Ainsi, fibrinogène et fibronectine coopèrent pour la colonisation de la valve par *S. aureus* et l'invasion endothéliale *in vivo*.

L'utilisation de souches déficientes en Clf dans des modèles rats d'EI a également montré que ces mutants étaient au moins 100 fois moins efficaces que le type sauvage pour se lier au fibrinogène et étaient par conséquent moins adhérents aux caillots fibrino-plaquettaires (55).

Le taux de ClfA à la surface des bactéries est néanmoins un paramètre crucial pour que l'activation plaquettaire puisse se produire (40).

L'interaction de *S. aureus* lié au fibrinogène avec l'intégrine αIIbβ3 nécessite également la présence d'anticorps spécifiques anti-ClfA, permettant de créer un pont entre le fibrinogène et l'intégrine, pour déclencher par la suite l'activation et l'agrégation plaquettaires (40).

Le ClfA est une molécule qui est exprimée par la bactérie principalement pendant la phase de croissance stationnaire et correspond ainsi au médiateur de l'agrégation plaquettaire principal à ce stade de croissance. Au contraire, en phase de croissance exponentielle l'agrégation plaquettaire rapide est plutôt médiée par les FnBPA et FnBPB. Ceci corrèle avec la régulation de l'expression des gènes qui codent pour ces protéines : *fnbpA* et *fnbpB,* qui sont uniquement transcrits lors de la phase de croissance exponentielle (56), tandis que *clfA* est transcrit très faiblement pendant la phase de croissance exponentielle, et est stimulé d'une façon sigB dépendante lors de la phase de croissance stationnaire (53).

De manière identique au ClfA, la présence d'anticorps spécifiques est nécessaire pour l'activation et l'agrégation plaquettaire médiée par les FnBP, ces dernières pouvant se lier au fibrinogène via leur domaine A ou à la fibronectine via leur domaine BCD et ainsi interagir avec l'intégrine αIIbβ3.

Enfin, la FnBPA semble induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales, telles que l'IL-6 et l'IL-1β, et est donc un acteur majeur responsable à la fois de réponses pro-inflammatoires et pro-coagulantes de l'endothélium au cours des infections endovasculaires à *S. aureus* (53). Ces résultats supportent donc la possibilité qu'une réponse inflammatoire augmentée favorise de développement de l'EI.

b) ClfB

Le ClfB provoquerait également une agrégation plaquettaire selon un mécanisme dépendant du fibrinogène, mais les bactéries exprimant le ClfB agrègent les plaquettes avec un temps de latence plus long que celles exprimant le ClfA, la FbnBPA ou encore la FnBPB (57).

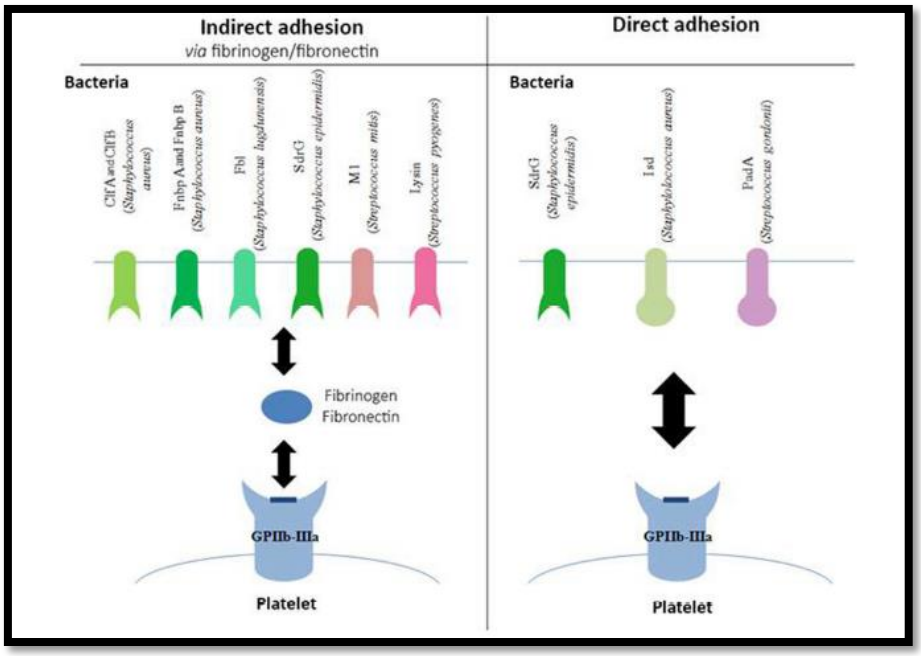
Il est plus fortement exprimé par la bactérie dans la phase précoce de la croissance exponentielle (40). Contrairement au ClfA et aux FnBP, le ClfB se lie au fibrinogène par l'intermédiaire de sa chaîne alpha. À nouveau, un niveau minimum d'expression du ClfB par les bactéries est nécessaire pour pouvoir déclencher l'activation plaquettaire. Le mécanisme d'agrégation induit

par le ClfB semble donc très proche de celui induit par le ClfA et les FnBP mais la principale différence entre ces molécules réside dans le temps de latence. Miajlovic et al. expriment quelques hypothèses quant à ce phénomène : l'implication de la chaîne alpha du fibrinogène par le ClfB et non de la chaîne gamma, cette dernière pouvant potentiellement orienter le fibrinogène dans une conformation plus appropriée pour sa liaison à l'intégrine αIIbβ3 que lorsque la chaîne alpha est engagée ; une moins bonne affinité du ClfB pour lier le fibrinogène ; ou encore une sensibilité augmentée de la chaîne alpha au clivage par les protéases (57).

Le ClfB semble donc posséder une importance mineure dans la pathogénèse du sepsis et de l'EI par rapport aux MSCRAMMs citées précédemment (58).

c) Liaison directe à l'intégrine αIIbβ3

Certaines bactéries expriment des protéines qui peuvent également se lier directement à l'intégrine αIIbβ3 en l'absence d'une molécule de pontage : c'est ce qui se produit pour *S. aureus* par l'intermédiaire d'une de ses protéines liant l'hème, l'iron-regulate surface determinant B (IsdB) capable de supporter l'adhésion plaquettaire et induisant l'agrégation plaquettaire (59), mais aussi pour d'autres espèces telles que *Staphylococcus epidermidis* avec la SdrG (serine-aspartate repeat-containing protein G). Ainsi, l'IsdB se lie à l'intégrine αIIbβ3 plaquettaire avec une haute affinité et l'agrégation plaquettaire qui suit l'adhésion est dépendante de l'expression de l'IsdB.



<u>Figure 7</u> : Rôle de l'intégrine αIIbβ3 **dans l'adhésion des bactéries aux plaquettes**

D'après Hamzeh-Cognasse et al. (60)

2- Rôle de la GpIbα

La GpIbα est une glycoprotéine membre de la famille des protéines riches en répétition leucine, et elle est exclusivement exprimée sur les plaquettes et leurs précurseurs, les mégacaryocytes. Il s'agit d'une molécule capable de lier différents ligands, mais son rôle crucial prend principalement place dans l'hémostase primaire, par sa capacité à interagir avec le facteur Von Willebrand. La GpIbα fait en réalité partie intégrante d'un complexe : la GpIb-IX-V, selon un ratio de 2 :2 :2 :1 (61) et les plaquettes expriment environ 25 000 copies de GpIbα, qui médient la liaison des plaquettes au facteur Von Willebrand exposé en surface de différents supports, et supporte l'activation plaquettaire en condition de fortes forces de cisaillement dans la circulation sanguine (62).

S. aureus est alors capable de se lier à cette GpIbα via le facteur Von Willebrand, et au contraire du facteur Von Willebrand soluble ou immobilisé, cette bactérie est capable de provoquer l'agrégation plaquettaire en l'absence de forces de cisaillement. Cette interaction peut se faire par l'intermédiaire du ClfA et le rôle de la GpIbα dans l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus* est non négligeable car la délétion de cette protéine entraîne une inhibition complète de l'agrégation plaquettaire (63).

L'interaction des bactéries avec la GpIbα peut également se faire par l'intermédiaire de la protéine A de *S. aureus*, qui se lie au facteur Von Willebrand, celui-ci pouvant à son tour interagir avec la GpIbα (64).

3- Rôle du complément

Lorsque la bactérie pénètre dans le sang, elle déclenche fréquemment la génération des protéines du complément, et les bactéries alors recouvertes de complément sont capables d'induire une agrégation plaquettaire. Les plaquettes sont donc capables d'interagir avec le système du complément, particulièrement lorsqu'elles sont dans leur état activé, ou lorsqu'elles se trouvent dans un environnement pathologique. En effet, elles expriment le gC1qR qui est le récepteur de la protéine C1q du complément, qui peut alors servir de récepteur pour les bactéries qui sont recouvertes de complément. L'activation des plaquettes induit une expression significativement augmentée de gC1qR à leur surface, ainsi qu'une augmentation de l'expression du CD62P, ou P-sélectine, à la membrane, cette dernière ayant été montrée comme capable de lier le C3b, une autre molécule du complément (65). Les voies classique et alterne

sont les voies du complément communément impliquées dans les interactions avec les bactéries (66).

L'interaction des plaquettes avec le complément a été décrite comme bivalente. En effet, d'une part les plaquettes jouent un rôle dans la destruction des bactéries, par la stimulation de l'activité du complément, d'autre part, elles peuvent elles-mêmes devenir la cible de l'activité lytique du complément lorsqu'elles se lient aux protéines du complément. Cette dernière interaction a entre autre été décrite comme se produisant particulièrement dans les cas de purpura thrombopénique immunologique (67). Toutefois, les plaquettes possèdent à l'intérieur de leurs granules α un inhibiteur de la molécule du complément C1, qui permet la modulation de l'activation du complément lorsqu'elles sont activées.
Les interactions plaquettes-bactéries mettant en jeu le complément impliquent ainsi un mécanisme plus immunologique qu'hémostatique, soulignant une nouvelle fois la dualité de la fonction plaquettaire.

Le complément peut également lui-même activer les plaquettes à travers l'induction de facteurs pro-coagulants comme les facteurs du complexe prothrombinase à la surface des cellules (67).

Enfin, pour confirmer le rôle du complément dans l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus*, certaines études ont mis en évidence un apparent bénéfice du blocage du récepteur du complément gC1qR dans l'EI à *S. aureus* (68).

De plus, il apparaît que les ClfA et ClfB de *S. aureus* sont capables d'induire une agrégation plaquettaire de manière dépendante du complément et d'anticorps spécifiques, indépendamment de l'agrégation induite via le fibrinogène (57). L'agrégation générée est alors plus lente.

4- Rôle du FcγRIIa

Le fragment Fc des immunoglobulines exerce ses effets à travers une famille de récepteurs connus sous le nom de Récepteurs au fragment Fc. Ainsi, chaque type d'anticorps possède une sous-famille de récepteurs au fragment Fc, les IgG interagissant alors avec la sous-famille gamma (γ) des Fc récepteurs. Dans cette sous-famille, le FcγRIIa est le récepteur le plus répandu dans la nature. Il est exprimé de manière prédominante sur les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes, les macrophages et les plaquettes, qui sont des cellules connues pour

leur activité de phagocytose. Il possède un domaine transmembranaire unique, qui est un domaine C-terminal contenant le site de liaison à l'IgG, ainsi qu'un domaine cytoplasmique. Ce récepteur peut alors lier et internaliser les complexes immuns impliquant les IgG, qu'ils soient solubles ou cellulaires, et ce mécanisme est régulé par le fait que les IgG complexées ont une très forte affinité pour le FcγRIIa, tandis que cette affinité est très faible pour les IgG monomériques.

Du fait de son expression à la surface des plaquettes, le FcγRIIa joue également un rôle critique dans l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries (69). Il n'agit donc pas seulement comme un simple récepteur aux immunoglobulines mais possède également un rôle important dans la fonction plaquettaire (70). En effet, les bactéries qui vont être reconnues par les IgG et être inclues dans un complexe immun avec ces immunoglobulines sont alors capables d'être reconnues par le FcγRIIa plaquettaire et le complexe immun peut ainsi être internalisé par les plaquettes (71). Les plaquettes expriment ainsi environ 5000 copies de FcγRIIa (63), et constituent finalement le plus grand réservoir de FcγRIIa dans l'organisme du fait de leur grand nombre dans la circulation sanguine.

De plus, il apparaît que la stimulation des autres récepteurs plaquettaires par les bactéries engage très fréquemment le FcγRIIa de manière simultanée, pour permettre une réponse plaquettaire efficace. Ceci souligne donc précisément le lien entre le FcγRIIa et les mécanismes d'agrégation plaquettaire. Ainsi, l'interaction de *S. aureus* lié au fibrinogène ou à la fibronectine avec l'intégrine αIIbβ3 plaquettaire induit également une agrégation plaquettaire de manière dépendante des anticorps.

En effet, l'agrégation médiée par le ClfA nécessite la liaison du fibrinogène mais aussi des anticorps spécifiques de *S. aureus* au ClfA, qui vont à leur tour se lier à l'intégrine αIIbβ3 et au FcγRIIa (40). Également, la protéine A de *S. aureus* peut être reconnue par des anticorps anti-*S. aureus* et les complexes immuns ainsi formés peuvent se lier au FcγRIIa plaquettaire, induisant la libération de sérotonine et une agrégation plaquettaire. Cette réaction est toutefois dépendante du moment où se produit la stimulation ainsi que de la quantité de complexes immuns formés (72). Une étude plus récente semble préciser que la protéine A ne serait en fait pas capable d'induire une agrégation par elle-même, mais elle est capable de maintenir une agrégation déclenchée par un autre mécanisme (39).

Le FcγRIIa plaquettaire n'est finalement pas capable d'induire une agrégation plaquettaire via *S. aureus* à lui seul, mais il constitue un pont indispensable à des nombreuses interactions entre plaquettes et bactéries aboutissant à une agrégation plaquettaire, et a un rôle majeur dans l'optimisation de la fonctionnalité de l'intégrine αIIbβ3 (41).

De manière similaire à l'agrégation médiée par le complément, l'agrégation plaquettaire faisant intervenir les anticorps spécifiques est une agrégation lente.

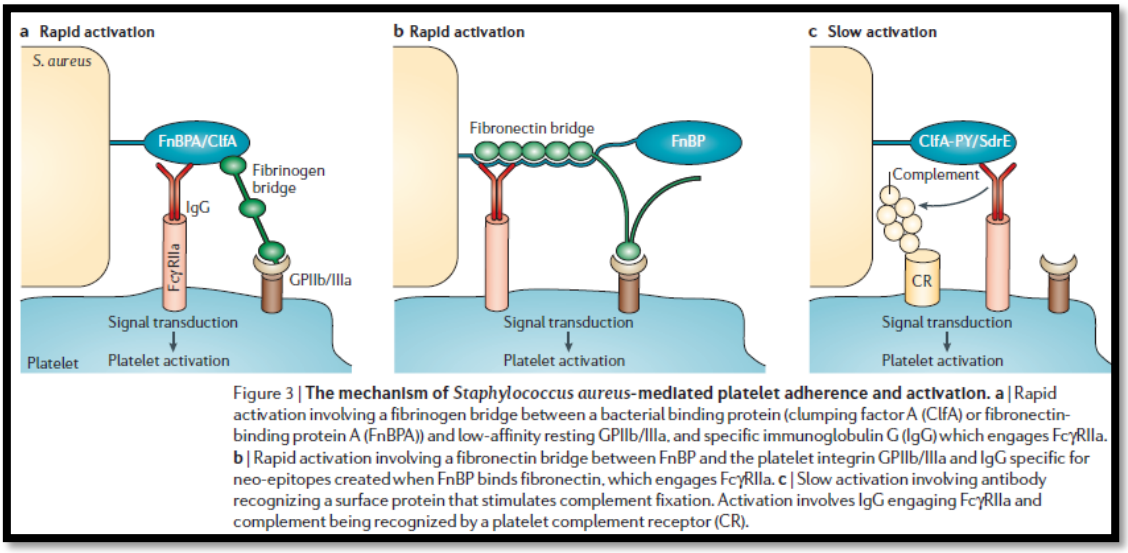


Figure 3 | **The mechanism of *Staphylococcus aureus*-mediated platelet adherence and activation. a** | Rapid activation involving a fibrinogen bridge between a bacterial binding protein (clumping factor A (ClfA) or fibronectin-binding protein A (FnBPA)) and low-affinity resting GPIIb/IIIa, and specific immunoglobulin G (IgG) which engages FcγRIIa. **b** | Rapid activation involving a fibronectin bridge between FnBP and the platelet integrin GPIIb/IIIa and IgG specific for neo-epitopes created when FnBP binds fibronectin, which engages FcγRIIa. **c** | Slow activation involving antibody recognizing a surface protein that stimulates complement fixation. Activation involves IgG engaging FcγRIIa and complement being recognized by a platelet complement receptor (CR).

<u>Figure 8</u> : Mécanismes d'adhérence et d'activation plaquettaires médiés par *S. aureus*

D'après Fitzgerald et al. (39)

5- Toxines

En complément de leur interaction avec les plaquettes à travers les protéines de surface, les bactéries peuvent sécréter des toxines capables d'activer les plaquettes (73,74).

Ainsi, *S. aureus* sécrète une toxine de 34 kDa capable de former des pores appelée l'alpha (α)-toxine, qui est produite par la quasi-totalité des souches de *S. aureus*. L'α-toxine se lie à la bicouche lipidique des plaquettes, créant un pore transmembranaire et par conséquent un influx calcique à l'intérieur des plaquettes (75), ce qui provoque à son tour une activation plaquettaire de manière analogue au ionophore calcique A23187 (76). Elle est également capable d'initier la formation du complexe prothrombinase sur les plaquettes (75), car elle induit la sécrétion des produits contenus dans les granules plaquettaires donc le facteur 4 plaquettaire (PF4) et d'autres médiateurs pro-coagulants (73). L'équipe de Powers et al. a également mis en évidence un rôle

de l'α-toxine dans la protéolyse de la GpVI induite par l'ADAM10, qui entraîne alors une réduction de la liaison des protéines au collagène et au fibrinogène, induisant en conséquence une altération de la réparation endothéliale par les plaquettes (77). En effet, l'interaction entre l'α-toxine et ADAM10 aboutit à l'activation d'ADAM10, ce qui entraîne un clivage pathologique des différents substrats d'ADAM10, notamment la E-cadhérine exprimée sur les cellules épithéliales, et la VE-cadhérine exprimée sur les cellules endothéliales. Le complexe α-toxine-ADAM10 participe donc à la lésion vasculaire à travers l'initiation de la lésion endothéliale, mais également la perturbation de la réparation endothéliale habituellement médiée par les plaquettes, et enfin l'activation synergique de voies pro-inflammatoires par infiltration des cellules du système immunitaire.

De plus, l'α-toxine est impliquée dans la pathogenèse d'autres infections telles que des pneumonies à SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline), en favorisant la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles, provoquant une destruction tissulaire avec des hémorragies intra-alvéolaires et une nécrose extensive du poumon (78).

Enfin, l'α-toxine induit paradoxalement la production de protéines microbicides par les plaquettes et par conséquent la lyse des bactéries (79), et une expression augmentée d'α-toxine par *S. aureus* conduirait finalement à une virulence réduite de la bactérie (80).

S. aureus est également capable de produire une superfamille de toxines, connues comme les toxines superantigènes et superantigènes-like (SSL) (81), dont la SSL5 peut interagir directement avec la GpIbα via ses résidus sialyl-lactosamines qui terminent les chaînes glycanes (82), et peut également se lier directement à la GpIV (63). Finalement, la liaison de SSL5 aux plaquettes déclenche l'activation et l'agrégation plaquettaire.

6- Autres protéines de *S. aureus*

D'autres adhésines mineures de *S. aureus* ont également été décrites. Ainsi, la protéine d'adhérence extracellulaire ou Eap est une adhésine de *S. aureus* qui est ancrée de manière non covalente à la surface cellulaire. Elle existe sous forme d'oligomère et est capable de se lier directement aux glycosaminoglycanes des plaquettes. La thiol-isomérase plaquettaire est alors stimulée, ce qui produit une activation plaquettaire allant de la stabilisation de la liaison au fibrinogène à l'expression membranaire de molécules d'activation plaquettaires telles que le CD62P, CD63 et CD40L. De plus, l'Eap est capable d'interagir avec la prothrombine, le

fibrinogène, la fibronectine, la thrombospondine-1, la sialoprotéine osseuse, ainsi que la vitronectine et l'ostéopontine. Elle a ainsi été décrite comme impliquée dans l'adhérence et l'invasion des cellules eucaryotes par *S. aureus*, et semble également jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immune à l'infection par interférence avec le recrutement des PNN, mais aussi en inhibant la réponse d'hypersensibilité retardée et enfin en induisant la mort des cellules T.

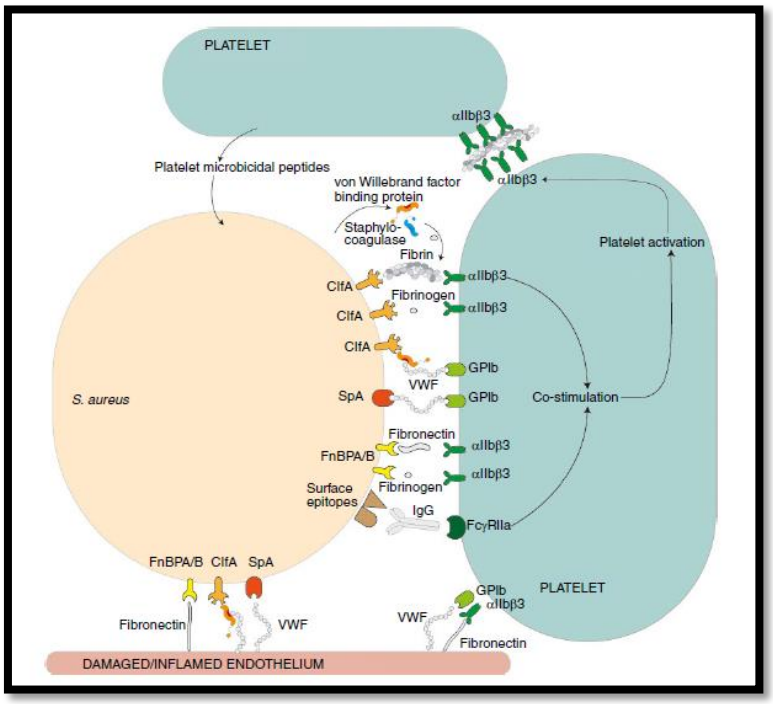
L'Emp (extracellular matrix protein) fait également partie des adhésines de *S. aureus* mais son rôle exact dans les infections n'a pas encore été établi. Néanmoins, il a été montré qu'elle est capable de se lier à la fibronectine, au fibrinogène, au collagène et à la vitronectine.

Une autre adhésine de *S. aureus*, la SraP (serin-rich adhesin for platelets), est une protéine glycosylée de la paroi cellulaire qui peut médier la liaison directe de la bactérie aux plaquettes par une interaction de type ligand-récepteur (83). Cette liaison est rapide et saturable *in vitro*, et il semble que SraP pourrait lier un ou plusieurs récepteurs à la surface des plaquettes, mais son ligand plaquettaire spécifique n'a pas été identifié à l'heure actuelle. De plus, il s'agit d'une protéine homologue de la protéine GspB de *Streptococcus gordonii*, qui est une protéine de liaison à la GpIb. Toutefois, SraP ne semble pas se lier à la GpIb (83). Son expression apparaît également être un facteur de virulence dans les infections endovasculaires

Enfin, les protéines Sdr (SdrC, SdrD et SdrE) semblent capables d'induire une agrégation plaquettaire malgré l'absence d'interaction avec le fibrinogène et la fibronectine (72).

La protéine A de *S. aureus* est une protéine intracellulaire distribuée de manière ubiquitaire et qui est multifonctionnelle. Cette protéine n'est cependant exposée à la surface des bactéries que lorsque celles-ci sont activées. Elle représente alors une protéine de surface majeure et comprend 4 ou 5 domaines de répétition homologues de 56 à 61 résidus, suivis d'une région de répétition de polymorphisme variable X, ainsi qu'une région conservée Xc qui contient la séquence d'attachement à la paroi cellulaire (64).
Elle est ainsi capable d'interagir spécifiquement avec le gC1qR/p33 plaquettaire, ce qui suggère un mécanisme supplémentaire pour l'adhérence des bactéries sur les sites de lésion vasculaire et de thrombose (84). Elle est également capable de se lier par ses 5 domaines au domaine A1 du facteur Von Willebrand avec une forte affinité en conditions de fortes forces de cisaillement, et va servir de pont entre le facteur Von Willebrand et l'intégrine αIIbβ3.

Enfin, la protéine A peut également se lier aux IgG à hauteur de 2 molécules d'IgG par molécule de protéine A.



<u>Figure 9</u> : Schéma général des interactions plaquettes-*S. aureus*

D'après Liesenborghs et al. (48)

Les coagulases de *S. aureus*, la staphycoagulase (Coa) et la protéine de liaison au facteur Von Willebrand (VWbp), peuvent être libérées et se lier à la prothrombine pour former un complexe enzymatique connu sous le nom de staphylothrombine (85). Ce complexe n'a pas une action directe sur l'activation plaquettaire par protéolyse comme cela se produit dans la cascade de la coagulation classique, mais il joue un rôle en transformant le fibrinogène en fibrine. Il agit donc comme stabilisateur de l'agrégation plaquettaire par formation d'un complexe stœchiométrique serré avec la prothrombine, et insertion de ses propres acides aminés N-terminaux qui sont semblables à ceux de la thrombine clivée dans la poche d'activation. De plus, la liaison de la Coa aux filaments de fibrine provoque le confinement de la bactérie au site de l'infection.

La VWbp possède quant à elle une affinité moindre pour le fibrinogène par rapport à la Coa, cette dernière étant plus dispersée et capable de former un plus grand maillage de fibrine. Cependant, une partie de la VWbp peut rester fixée à la paroi cellulaire par l'intermédiaire du ClfA, qui peut alors aider à la livraison du fibrinogène à la staphylothrombine, ce qui va augmenter la formation des agrégats de plaquettes et bactéries (86). Ces agrégats vont permettre à *S. aureus* d'être protégé du système immunitaire et de la phagocytose (87).

La staphylothrombine fait donc partie intégrante des facteurs de virulence de *S. aureus*, et pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante.

Enfin, la staphylokinase est une petite molécule sécrétée par la plupart de souches de *S. aureus* qui est également capable d'induire la fibrinolyse. Elle possède une faible affinité pour le fibrinogène et elle ne peut pas être activée directement mais elle se lie aux petites traces de plasmine pour former des complexes staphylokinase-plasmine capable de cliver le plasminogène et de générer une quantité supplémentaire de plasmine (88). Une des particularités de cette molécule est qu'elle a une forte spécificité pour la plasmine humaine tandis qu'elle est inactive sur les autres espèces, contrairement aux coagulases. Du fait de son mode d'action, elle peut participer à la fragmentation suivie de l'embolisation des végétations riches en fibrine dans l'EI, et explique en partie la grande capacité des végétations de l'EI à *S. aureus* à emboliser.

7- Protéines régulatrices

L'expression des gènes de virulence du staphylocoque est contrôlée par un réseau régulateur complexe. La molécule agr (accessory gene regulator) fait ainsi partie des régulateurs globaux de l'expression des gènes de *S. aureus*. Il s'agit d'un régulateur agissant comme quorum sensing, formé d'un opéron de 4 gènes :

- agrB, qui est une protéase associée à la membrane,
- agrD, produisant le pré-pro-peptide modifié par agrB et sécrété comme un peptide thiolactone de 7 à 9 résidus d'acides aminés, dans lequel le résidu central cystéine est lié de manière covalente à l'acide carboxylique C-terminal formant ainsi un cycle thioester,
- agrC, constituant une « kinase sensor » associée à la membrane,
- agrA, qui est le régulateur cytoplasmique activé par agrC (89).

Le locus agr agit sur la transcription mais aussi sur la translation des gènes dans le but de réguler la production de nombreuses enzymes, toxines et protéines de la surface cellulaire. Il est finalement composé de 2 transcrits divergents RNAII et RNAIII, eux-mêmes initiés respectivement à partir des promoteurs P2 et P3.
De plus, le locus sar (staphylococcal accessory regulator) code pour une seule protéine de liaison à l'ADN qu'est sarA et est essentiel à la régulation agr-dépendante. Toutefois, 3

transcrits distincts (sarA, sarB et sarC) sont produits par 3 promoteurs distincts en amont de sarA, sarA et sarB, étant exprimés de manière préférentielle lors de la phase exponentielle de la croissance, tandis que l'expression maximale du transcrit sarC est retrouvée lors de la phase stationnaire. Il existe de nombreux homologues de sarA constituant la famille de protéines sarA, tous étant impliqués dans l'expression de sarA.
Ainsi, sarA régule l'expression du transcrit RNAIII en se liant au promoteur P2 d'agr, ce qui augmente en conséquence la transcription de RNAII et du RNAIII correspondant (90).

Sar et agr constituent donc un système régulateur global à deux composants majeur de *S. aureus*, impliqué dans la régulation des protéines Emp et Eap. Ces deux régulateurs organisent le métabolisme cellulaire de *S. aureus* lors de la phase exponentielle de sa croissance afin d'assurer un taux de croissance efficace, et favorisent l'expression des adhésines pendant cette même phase de croissance exponentielle, mais stimulent plutôt celles des facteurs solubles lors de la phase de croissance post-exponentielle *in vitro* (91).

Un autre système régulateur est sigmaB correspondant également à un opéron de 4 gènes : rsbU, rsbV, rsbW et sigB.

Enfin, le locus sae (*S. aureus* exoprotein expression) constitue également un important régulateur de l'expression des gènes de virulence. Il est composé de 4 ORFs, dont 2 codent pour un système classique à 2 composants. Sae est lui-même activé par agr mais le mécanisme est inconnu actuellement. Il est indispensable à la transcription des protéines Emp et Eap et capable de moduler leur expression en fonction des conditions environnementales : il s'agit donc d'un régulateur crucial pour l'adaptation de *S. aureus* à son environnement, contribuant à la survie intracellulaire de *S. aureus* (89).

8- Impact des contraintes de cisaillement

La fonction plaquettaire est sensible aux contraintes de cisaillement existant dans le flux sanguin. C'est le cas notamment de l'interaction entre le facteur Von Willebrand et la GpIbα qui ne peut se produire que sous de fortes conditions de cisaillement. Ceci complique donc les études sur l'agrégation plaquettaire et l'adhésion statique qui impliquent des systèmes artificiels qui ne reflètent donc pas réellement la nature dynamique du système circulatoire.

Dans le cas des interactions avec *S. aureus*, les études sur les conditions de cisaillement montrent que la formation du thrombus ne peut se produire que sous des conditions de fortes contraintes de cisaillement (>800 s^{-1}) et que ceci est entièrement dépendant du ClfA (69). Comme l'agrégation plaquettaire, la formation du thrombus est dépendant de l'interaction anticorps-FcγRIIa et fibrinogène-intégrine αIIbβ3.

Les forces de cisaillement sont nécessaires pour la modification de la conformation du fibrinogène, et le rendre alors plus à même d'interagir avec l'intégrine αIIbβ3 et d'aboutir à la formation d'un thrombus.

9- Inhibition des plaquettes

Certaines protéines de *S. aureus* ont en revanche été montrées paradoxalement inhibitrices de la fonction hémostatique des plaquettes. C'est le cas de l'acide lipotechoïque, qui utilise le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAF) pour augmenter les taux d'AMPc dans les plaquettes. L'activité de phosphorylation sur la protéine VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) est alors augmentée et va inhiber l'agrégation plaquettaire et la formation consécutive du thrombus (92). L'acide lipotechoïque inhibe également l'agrégation plaquettaire par prévention de la mobilisation du calcium intracellulaire (92).

La protéine de liaison du fibrinogène extracellulaire (Efb) semble également exercer un effet antithrombotique. Il s'agit d'une protéine produite pendant la phase de croissance post-exponentielle, décrite *in vitro* comme capable d'adhérer directement aux plaquettes et également capable de recruter le fibrinogène dans une forme non conventionnelle qui est plutôt amené à inhiber l'activation plaquettaire, et ceci a été confirmé *in vivo* (93). L'Efb augmente cependant la liaison du fibrinogène aux plaquettes d'une manière indépendante de l'intégrine αIIbβ3.

Enfin, la staphylokinase possède également une activité inhibitrice sur les plaquettes au travers de la dégradation de la plasmine et du fibrinogène, ce qui empêche l'agrégation plaquettaire.

3. Interactions Plaquettes - *S. sanguinis*

Les études sur les interactions entre plaquettes et *S. sanguinis* sont très anciennes mais finalement moins bien documentées que pour *S. aureus*. Les mêmes récepteurs plaquettaires ont cependant été rapportés comme impliqués dans ces interactions. De plus, plusieurs articles soulignent l'existence d'une importante variabilité dans la capacité des souches de *S. sanguinis* à induire une agrégation plaquettaire (94). Kerrigan et al. ont ainsi décrit 3 phénotypes de souches (95) :

- **Type I** : adhésion forte et agrégation rapide des plaquettes,
- **Type II** : temps de latence plus long pour l'activation plaquettaire, pas d'adhésion bactérienne des plaquettes au repos,
- **Type III** : pas d'adhésion ni agrégation plaquettaire.

Il existe également probablement un type IV, capable de supporter l'adhésion bactérienne mais pas l'agrégation plaquettaire qui en découle habituellement. Ceci suggère donc une distinction entre la capacité à supporter l'adhésion plaquettaire et à induire l'agrégation plaquettaire, d'autant que ces deux étapes sont probablement médiées par des protéines bactériennes et des récepteurs plaquettaires différents.

Herzberg et al. ont aussi mis en évidence, grâce à un modèle lapin d'EI expérimentale, une différence dans la capacité des différentes souches de *S. sanguinis* à induire une agrégation plaquettaire, et ont montré une virulence plus importante des souches capables d'induire une agrégation par rapport à celles qui ne le sont pas (96), malgré une densité bactérienne identique dans les végétations.

Enfin, les adhésines mais aussi les exopolysaccharides composant le glycocalyx de *S. sanguinis* contribuent à son infectivité.

1- Rôle de la GpIbα

Les interactions directes des streptocoques avec la GpIbα sont médiées par des serin-rich protein (Srp), et notamment la SrpA pour *S. sanguinis* (97). Elles correspondent à des protéines hautement glycosylées, riches en sérine qui se lient aux résidus acide sialique sur les récepteurs de l'hôte. L'interaction entre la SrpA et la GpIbα plaquettaire se produit au niveau du domaine N-terminal de la GpIbα et supporte l'adhésion plaquettaire qui sera suivie du déclenchement de l'agrégation plaquettaire (95,97). Elle est toutefois dépendante des forces de cisaillement : au

contraire de ce qui se produit pour le roulement des plaquettes sur le facteur Von Willebrand immobilisé nécessitant d'importantes forces de cisaillement, les plaquettes sont capables de rouler sur le streptocoque dans des conditions de faible cisaillement. En effet, la SrpA doit être présente sur la surface bactérienne dans une conformation adéquate pour son interaction avec la GpIbα et il apparaît que cette conformation ne peut être appropriée qu'en conditions de forces de cisaillement modérées. Cette interaction serait également dépendante de l'acide sialique (97).

Après stimulation par *S. sanguinis* via la GpIbα, il se produit l'induction d'une signalisation transmembranaire et les plaquettes libèrent le contenu de leurs granules denses, constitué par des substances vasoactives dont l'ATP et l'ADP (98). De plus, *S. sanguinis* exprime une ectoATPase capable d'hydrolyser l'ATP plaquettaire libérée en ADP. L'ADP, qui est un agoniste plaquettaire habituel, va alors se lier à ses récepteurs plaquettaires, P_2Y_{12} et P_2Y_1, ce qui servira d'étape d'amplification, essentielle à la formation d'un agrégat stable (63).

De plus, le signal induit par *S. sanguinis* est cyclo-oxygénase (COX) et Thromboxane A2 (TXA2) dépendant (95) car l'utilisation d'aspirine pendant l'adhésion de *S. sanguinis* aux plaquettes inhibe totalement l'agrégation plaquettaire. Les plaquettes exposées à *S. sanguinis* produisent donc du TXA2, et le récepteur TPα peut alors amplifier l'activation plaquettaire en se liant au TXA2 nouvellement libéré.

C'est cette interaction directe entre la GpIbα et la bactérie qui se produit pour les souches dites de type I (95).

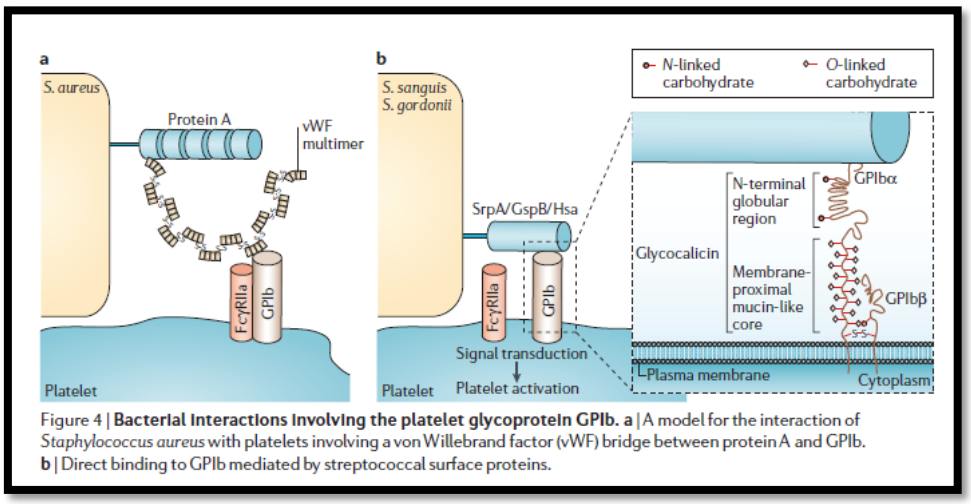


Figure 4 | **Bacterial interactions involving the platelet glycoprotein GPIb. a** | A model for the interaction of *Staphylococcus aureus* with platelets involving a von Willebrand factor (vWF) bridge between protein A and GPIb. **b** | Direct binding to GPIb mediated by streptococcal surface proteins.

<u>Figure 10</u> : Interactions bactériennes impliquant la GpIb plaquettaire

D'après Fitzgerald et al. (39)

2- Rôle du complément

Certaines souches de *S. sanguinis* sont également capables d'induire une agrégation plaquettaire selon un processus impliquant le complément, mais nécessitant la liaison d'un anticorps spécifique (99). Le gC1qR humain permet de lier des protéines au premier composant de la cascade du complément : le C1q, et va ainsi pouvoir servir de récepteur pour *S. sanguinis* recouvert de molécules du complément. L'agrégation plaquettaire médiée par le complément semble se faire principalement via la voie alterne et nécessite la présence d'IgG, qui fournirait un site de liaison au C3b (100).

Comme pour *S. aureus*, l'agrégation plaquettaire induite par *S. sanguinis* médiée par le complément est un processus lent.

3- Rôle du FcγRIIa

FcγRIIa joue un rôle critique dans l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries dont *S. sanguinis*. En présence d'IgG, *S. sanguinis* va provoquer la tyrosine phosphorylation très rapide du FcγRIIa plaquettaire, suivie de la phosphorylation de la PLCγ2, de Syk et LAT (101). Ces évènements précoces sont dépendants de protéines kinases de la famille Src mais indépendants du thromboxane A2 ou de l'engagement de l'intégrine αIIbβ3. Pendant la phase de latence qui précède l'agrégation plaquettaire, une déphosphorylation de FcγRIIa, PLCγ2, de Syk et LAT se produit. Cette voie de signalisation est régulée par la SHP-I qui est liée à PECAM-I, récepteur contenant un motif ITIM, car cette protéine tyrosine phosphatase est ainsi phosphorylée lors de la phase de latence, et PECAM-I co-précipite avec elle (101).

L'engagement secondaire de l'intégrine αIIbβ3 va provoquer la déphosphorylation de SHP-I, permettant alors à son tour une seconde vague de phosphorylation de FcγRIIa, PLCγ2, de Syk et LAT.

Les plaquettes sont alors capables de libérer le thromboxane A2 et le contenu de leurs granules denses dont RANTES, PF4, CD40L soluble et PDGF-αβ, qui vont amplifier et stabiliser l'agrégat plaquettaire (101,102). Le PF4 peut se lier aux bactéries et former un nouveau site de reconnaissance pour les IgG et les cellules immunes effectrices, ce qui peut permettre de réduire le temps de latence, mais ceci est particulièrement vrai pour les bactéries gram négatif (103).

De plus, Sullam et al. ont mis en évidence la colocalisation de la GpIbα et du FcγRIIa au niveau de la membrane plaquettaire, et que cette association n'est pas aléatoire (104). Ceci permet d'obtenir une signalisation médiée par FcγRIIa et la GpIbα qui est indépendante des IgG (104).

4- Rôle des MAP kinases

L'activation plaquettaire par *S. sanguinis* diffère tout de même sur certains points de celle induite par *S. aureus*. En effet, contrairement à *S. aureus*, *S. sanguinis* peut également impliquer la voie des MAP kinases. L'épinéphrine libérée à la suite du stress va agir via la protéine Gz pour upréguler la voie impliquant la PLCγ2, PI3k et Erk. Les MAP kinases Erk2 et p38 subissent des étapes triphasiques de phosphorylation/déphosphorylation comme cela peut se produire avec d'autres phosphoprotéines, et ceci aboutit à une augmentation de l'agrégation plaquettaire induite par *S. sanguinis* (105,106).

5- Rôle de la PAAP

De manière distincte de ce qui se produit avec *S. aureus*, *S. sanguinis* est capable d'induire une agrégation plaquettaire directe par l'intermédiaire d'un composant collagène-like spécifique du streptocoque : la PAAP (platelet aggregation associated protein). Il s'agit d'une protéine de 115 kDa, exprimée sur les parois cellulaires du streptocoque, riche en rhamnose qui contient un domaine collagène-like d'interaction avec les plaquettes comprenant des résidus Pro-Gly-Glu-Gln-Gly-Pro-Lys (107,108). La PAAP est impliquée dans la CbpA (Collagen-binding protein A) qui contient 2 séquences PAAP collagen-like octapeptide (109).

Sur les valves cardiaques lésées, la PAAP augmente l'accumulation des plaquettes dans le thrombus de fibrine et va permettre la colonisation par la bactérie (110). Elle correspond donc à un facteur de virulence important de *S. sanguinis* car son absence ou blocage d'expression entraîne une inhibition de l'agrégation plaquettaire *in vitro* (109), et une réduction de la taille des végétations dans les modèles d'EI expérimentales (110).

Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que cette agrégation induite par PAAP est donneur-spécifique, et que son expression est restreinte à certaines souches de *S. sanguinis* et est absente des autres espèces de streptocoques (109).

6- Libération de médiateurs solubles et autres facteurs de virulence

a) Médiateurs solubles

En dehors de ses interactions directes avec les plaquettes provoquant une réponse plutôt pro-thrombotique, *S. sanguinis* induit une également une réponse pro-inflammatoire et immunomodulatrice des plaquettes (105). En effet, les plaquettes sont capables de libérer de nombreux modulateurs immuns et inflammatoires en réponse à une infection par *S. sanguinis*, parmi lesquels on retrouve des facteurs de croissance, chémokines et cytokines, certains existant à l'état préformé dans les mégacaryocytes et d'autres étant synthétisés de novo (111). Cette libération de médiateurs de l'inflammation à partir des plaquettes se produit toutefois de façon souche et donneur-spécifique (105), et constitue un phénomène indépendant de l'agrégation plaquettaire, suggérant un mécanisme pro-athérogène potentiel en l'absence d'une réponse plaquettaire pro-thrombotique aiguë.

À noter qu'il existe un effet inhibiteur paradoxal de l'épinéphrine sur la libération des médiateurs solubles par les plaquettes stimulées, aussi bien avec les souches de *S. sanguinis* induisant une agrégation qu'avec celles qui ne l'induisent pas. Ceci met en évidence une dissociation entre l'exocytose et l'agrégation qui sont provoquées en réponse à la bactérie (105).

Enfin, lors de la bactériémie transitoire, *S. sanguinis* est également capable d'activer les monocytes et d'induire leur production de FT et de cytokines, ce qui déclenche la cascade de la coagulation. La libération de cytokine peut également découler de l'effet de l'ATP extracellulaire libérée des plaquettes sur les monocytes.

b) Facteurs de virulence

L'analyse du génome de *S. sanguinis* par Fan et al. a permis de distinguer la présence d'une ecto-5' nucléotidase de surface cellulaire (Nt5e), capable d'hydrolyser l'ATP extracellulaire libérée notamment depuis les granules denses des plaquettes pour générer de l'adénosine. Cette dernière est une molécule immunosuppressive pouvant inhiber la phagocytose par les macrophages/monocytes associés aux végétations valvulaires (112). Elle inhibe également la production d'IL-12 et augmente celle de l'IL-10 (113). L'utilisation d'un modèle lapin d'EI expérimental a alors mis en évidence des végétations ayant une masse significativement diminuée lorsqu'ils sont infectés avec des souches délétées en Nt5e.

4. Rôle des plaquettes

1- Généralités sur les plaquettes

Les plaquettes régulent l'hémostase et l'inflammation, et ont un rôle dans l'immunité. Ce sont des éléments anucléés de petite taille (2-4 µm) discoïdes qui proviennent de la lignée des mégacaryocytes. Leur durée de vie dans la circulation sanguine périphérique est de 5 à 10 jours et ces cellules anucléées peuvent effectuer la translation des protéines en utilisant des modèles d'ARNm stable provenant de leurs précurseurs mégacaryocytaires.

Les plaquettes possèdent 3 types distincts de granules cytoplasmiques :

- **Les granules denses**, riches en médiateurs du tonus vasculaire = sérotonine, ADP, calcium et phosphate ;
- **Les granules α**, contenant des protéines spécialisées dans les fonctions hémostatiques dont l'adhésion (fibrinogène, thrombospondine, vitronectine, laminine et facteur Von Willebrand), la coagulation (plasminogène et α2-plasmine inhibiteur), et la réparation des cellules endothéliales (PDGF (platelet derived growth factor), facteur de perméabilité et TGF-α (transforming growth factor) et TGF-β. Ces granules peuvent également contenir des protéines microbicides ;
- **Les granules lysosomales**, contenant des enzymes qui modulent la dissolution du thrombus.

Lorsque les plaquettes sont activées, elles voient leur statut métabolique s'activer, ainsi que leur forme discoïde devenir amiboïde et vont exprimer des récepteurs permettant de médier une adhésion augmentée aux tissus lésés ou infectés, et produire des espèces réactives de l'oxygène incluant radicaux superoxyde, peroxyde et hydroxyles. Enfin, leurs pseudopodes vont s'étendre pour interagir avec les pathogènes microbiens ainsi qu'avec les autres cellules de l'hôte et les plaquettes vont remodeler leur cytosquelette pour faciliter la mobilisation des granules ainsi que la libération de leur contenu. Les plaquettes jouent donc un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections endovasculaires, et leurs effets peuvent être amplifiés par la présence concomitante d'antibiotiques (114).

Il existe également une capacité des bactéries à générer des signaux intracellulaires sur la liaison des plaquettes mais nous disposons de peu de données jusqu'à présent car ces interactions sont complexes et de nature multi-composants. Concernant les signaux induits par *S. aureus*, les

publications actuelles laissent savoir qu'il s'agit de mécanismes cyclooxygénase et thromboxane dépendants (72).

2- Toll Like Receptors

Les Toll like receptors (TLR) sont des récepteurs de l'immunité innée qui régulent la réponse de l'hôte à une infection. Ils reconnaissent les PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) présents sur différentes classes d'agents infectieux (115). En tant que médiateurs de l'immunité, les plaquettes expriment fortement à leur surface les TLR2, TLR4 et TLR9, et n'ont qu'une très faible expression des TLR1, TLR6 et TLR8 (116).

Le ligand du TLR4 est ainsi le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries gram négatives, qui seraient également capables de déclencher une agrégation plaquettaire d'après certaines études (117,118), mais pas pour d'autres (119), et seraient même au contraire responsables d'une inhibition des plaquettes pour certaines équipes (120).

L'acide lipotechoïque est quant à lui un ligand du TLR2, avec des effets variables sur l'agrégation plaquettaire car il peut inhiber l'agrégation plaquettaire comme c'est le cas lorsqu'il dérive de *S. aureus* (121), cependant il supporte l'adhésion plaquettaire de *Staphylococcus epidermidis*.

Généralement, la stimulation des TLR induit la sécrétion de molécules immunomodulatrices et l'activation d'autres cellules telles que les PNN et les cellules endothéliales, plutôt que la formation d'un thrombus, ce qui signifie que les plaquettes agissent en ce sens plutôt comme des acteurs du système immunitaire inné que comme des acteurs de l'hémostase primaire car elles sont capables de détecter la présence des agents infectieux et de coordonner la réponse au pathogène.

3- Phagocytose

La présence du FcγRIIa à la surface des plaquettes laisse entendre que ces dernières ont une capacité de phagocytose. En effet, elles peuvent phagocyter les complexes immuns via le FcγRIIa, mais elles peuvent elles-mêmes être phagocytées (122).

De plus, elles ont la possibilité d'augmenter la phagocytose des pathogènes par les PNN (123) mais peuvent également phagocyter directement certaines bactéries comme *S. aureus* (124). Toutefois, cette phagocytose résulte rarement de la mort de la bactérie car les plaquettes ne possèdent pas de phagolysosomes, et elle peut alors avoir l'effet inverse de l'effet escompté puisqu'elle induit la formation d'un pool de bactéries viables présentes en intracellulaire, ainsi que dans le thrombus, où elles sont alors protégées de l'effet du système immunitaire. Ceci peut jouer un rôle dans la pathogenèse de certaines maladies telles que l'EI puisque cela permet notamment la persistance de la maladie (125–127).

4- Plaquettes et PNN

Les plaquettes possèdent également un rôle essentiel dans la formation des NETs (neutrophil extracellular traps) par les PNN, qui permettent la clairance des bactéries piégées et la concentration des facteurs antibactériens, mais possèdent également des effets délétères car ils peuvent augmenter le risque de thrombose (128). De plus, plaquettes et PNN sont connus pour adhérer les uns aux autres et former des complexes plaquettes-PNN (PNC). La formation de ces PNC est régulée par la P-sélectine plaquettaire et le complexe Mac-1 des PNN, et tient une place importante dans le développement des défaillances multiviscérales.

5- Libération de molécules microbicides

Kraemer et al. ont montré que les plaquettes incubées avec *S. aureus* limitent la croissance de la bactérie (129). Cette observation a permis de mettre en évidence l'existence de molécules plaquettaires antibactériennes : les PMP (platelets microbicidal proteins), qui sont libérées sous l'effet de la thrombine (tPMP) et/ou des bactéries. Elles diffèrent des défensines classiquement décrites par leur masse moléculaire, leur séquence, et l'enchaînement de résidus lysine et arginine qui leur donne leur charge cationique. Ce sont donc des petits peptides cationiques à activité microbicide rapide et puissante contre les pathogènes retrouvés dans les bactériémies tels que *S. aureus* ou les streptocoques du groupe viridans (130).

Pour être fonctionnelles, ces molécules doivent être clivées par la thrombine, libérant deux sous-unités qui vont agir indépendamment mais de manière néanmoins complémentaire en altérant la perméabilité de la paroi bactérienne (79).

La libération des PMP se fait à travers des voies de signalisation plaquettaire qui dépendent de l'ATP/ADP et de leurs récepteurs P_2Y. Ce signal est alors lui-même amplifié par la libération d'ADP, et une activation autocrine des plaquettes se produit, qui va ensuite pouvoir s'étendre aux plaquettes voisines. De plus, les plaquettes activées par l'inflammation vont recruter des plaquettes supplémentaires à travers la signalisation des récepteurs PAR-1 et PAR-4 (protease-activated receptor) médiée par la thrombine, ainsi que par l'activation de l'intégrine αIIbβ3 et la libération de facteur Von Willebrand par les cellules endothéliales activées.

Parmi les tPMP libérées des plaquettes sont retrouvées les chimiokines classiques qui ont un effet bactéricide direct : les kinocidines. Elles sont alors divisées en 2 groupes : les α-kinocidines, incluant les cytokines CXC (PF4, PBP (platelet basic proteins), connective tissus activating peptide (CTAP-3) et neutrophil activating peptide (NAP2)), et les β-kinocidines qui sont des cytokines de type CC, dont fait partie RANTES. Font partie également des kinocidines le fibrinopeptide B et la thymosine β4.
Ces molécules ont un effet synergique entre elles, leur rôle primaire étant la chimio-attraction des leucocytes, permettant la coopération entre facteurs plaquettaires et leucocytaires dans la clairance bactérienne (131).

Les β-défensines humaines 1 (hβD-1) sont également présentes dans les mégacaryocytes et les plaquettes, au niveau de l'ARNm et des peptides (129).

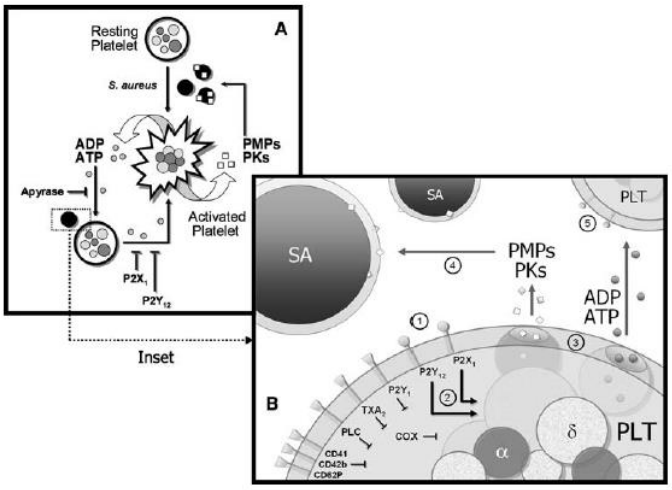
Les tPMP exercent de manière directe les effets anti-staphylocoques précoces des plaquettes dans la défense contre l'EI. Toutefois, les PMP ne sont pas toutes identiques entre elles, et possèdent notamment des différences sur leurs propriétés biochimiques et leur activité microbienne puisqu'elles peuvent exercer une activité seulement microbiostatique, ou plutôt microbicide, et ceci est influencé par leur concentration et le pH du milieu dans lequel elles se trouvent (132).

Toutes les souches de *S. aureus* ne sont pas sensibles de la même manière aux tPMP et il apparaît que les souches résistantes aux tPMP *in vitro* sont plus virulentes dans les modèles d'EI expérimentales que les souches sensibles (133,134). Kupferwasser et al. ont en effet montré sur des modèles lapins d'EI expérimentales des bactériémies plus faibles, une réduction de la croissance et de la taille des végétations et de leur densité bactérienne, l'apparition plus tardive de régurgitation valvulaire aortique, ainsi qu'une réduction des dommages des tissus valvulaires et de l'inflammation péri-valvulaire, et une réduction de la fréquence des

évènements emboliques extracardiaques avec les souches sensibles aux tPMP par rapport aux souches résistantes (135).

Enfin, Yeaman et al. ont observé que les souches issues d'EI sont plus fréquemment résistantes aux PMP que les souches qui sont issues d'autres infections (134), ce qui laisse penser que cette résistance fournit un avantage sélectif de survie au pathogène *in vivo* impliqué dans la pathogenèse de l'EI.

Également, la présence d'une thrombopénie a été montrée comme facteur aggravant dans les EI à streptocoques sur des modèles lapin ou rat (136). Les PMP ont donc un rôle majeur dans la limitation de l'induction et de la progression des infections endovasculaires, avec des conséquences sur de nombreux paramètres associés à la sévérité et au pronostic de l'EI.



<u>Figure 11</u> : Interactions des plaquettes avec *S. aureus*

D'après Yeaman et al. (79)

5. Conclusion

S. aureus et *S. sanguinis* sont deux pathogènes majeurs responsables d'EI et des évènements emboliques qui y sont associés. Nous avons mis en évidence de nombreuses interactions de ces bactéries avec les plaquettes à travers différents mécanismes impliquant les récepteurs plaquettaires. Des mécanismes communs sont retrouvés pour les deux germes mais il apparaît également que chacun a des spécificités, pouvant expliquer quelques différences dans leur pathogénicité et les complications qu'ils induisent.

L'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus* semble dépendante, au moins en partie, des voies de la COX et du TXA2 (72), et le rôle central de l'intégrine αIIbβ3 dans l'interaction avec les

adhésines de cette bactérie n'est pas retrouvé aussi marqué pour *S. sanguinis*, bien que la présence de cette intégrine soit nécessaire pour les interactions impliquant notamment le FcγRIIa. Enfin, il semblerait que le polymorphisme des patients sur les récepteurs plaquettaires influe sur le potentiel pro-agrégant de ces bactéries.

D'autre part, les plaquettes en elles-mêmes jouent également un rôle central dans la lutte contre l'infection à travers la libération de petites molécules microbicides au niveau du site de l'infection induite notamment par la thrombine, les tPMP.

Finalement, le rôle des plaquettes en situation d'infection laisse donc place à des effets à la fois bénéfiques et délétères sur le contrôle de cette infection qui donne naissance au « paradoxe plaquettaire ». Dans l'EI, notamment lorsqu'elle est provoquée par *S. aureus*, il existe un équilibre entre les effets pro-agrégants plaquettaires induits, entretenant le développement de la végétation, et les effets antibactériens associés aux interactions plaquettes-PNN et à l'activation du complément. Il semblerait alors que l'utilisation d'antiplaquettaires dans le contexte d'une EI serait inutile voire délétère car elle diminuerait les fonctions antibactériennes des plaquettes. Cependant, il semble que limiter l'adhésion et l'agrégation plaquettaires est indispensable pour diminuer le risque embolique associé à l'EI puisque les plaquettes font partie intégrante de la végétation. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'impact des antiplaquettaires sur les interactions plaquettes-bactéries.

Table 1 Platelet–bacteria interactions

Platelet receptor	Bacteria	Bacterial protein	Bridging protein
GPIIb–IIIa	*S. epidermidis*	SdrG	Fibrinogen
	S. aureus	FnbpA/B	Fibronectin
	S. aureus	FnbpA/B	Fibrinogen
	S. aureus	ClfA	Fibronectin
	S. aureus	ClfA	Fibrinogen
	S. aureus	IsdB	Direct
	S. pyogenes	M1	Fibrinogen
	S. gordonii	PadA	Direct
	S. lugdunensis	Fbl	Fibrinogen
GPIbα	*S. sanguis*	SrpA	Direct
	S. gordonii	GspB/Hsa	Direct
	S. aureus	Protein A	VWF
	Helicobacter pylori	?	VWF
FcγRIIa	*S. aureus*	FnbpA/B	IgG
	S. aureus	ClfA	IgG
TLR2	*S. pneumoniae*	?	Direct
	?	Lipoprotein	Direct
TLR4	*Escherichia coli*	LPS	Direct
gC1q-R	*S. sanguinis*	?	C1

ClfA, clumping factor A; Fnbp, fibronectin-binding protein; GspB, glycosylated streptococcal protein B; Hsa, hemagglutinin salivary antigen; IsdB, iron-regulated surface determinant B; LPS, lipopolysaccharide; PadA, platelet adhesion binding protein A; SdrG, serine–aspartate repeat G; SrpA, serine-rich protein A; TLR, Toll-like receptor; VWF, von Willebrand factor.

Table 2 Platelet–toxin interactions

Platelet receptor	Bacteria	Bacterial toxin
PAR1	*Porphyromonas gingivalis*	Gingipains
GPIbα	*S. aureus*	SSL-5
GPVI	*S. aureus*	SSL-5
Phospholipids	*S. pneumoniae*	Pneumolysin
	S. aureus	α-Toxin
	S. aureus	Leukocidin
	S. pyogens	Streptolysin-O

GP, glycoprotein; PAR1, protease-activated receptor 1; SSL, staphylococcal superantigen-like.

<u>Tableau 2</u> : Interactions ligands-récepteurs *D'après Cox et al.* (63)

PARTIE II :
Évaluation du bénéfice des antiplaquettaires sur les interactions Plaquettes-Bactéries

III- Revue de la littérature

L'ensemble des interactions plaquettes-bactéries décrites précédemment et leurs conséquences délétères sur l'évolution des infections et notamment de l'EI ont poussé de nombreuses équipes à s'intéresser précisément à l'impact que pourrait avoir l'utilisation d'antiplaquettaires sur ces évènements. En effet, les traitements antiplaquettaires sont actuellement utilisés dans le cadre de la prévention primaire ou secondaire de la survenue d'évènements emboliques chez les patients à risque cardio-vasculaire élevé.

De plus, les traitements actuels de l'EI se concentrent sur une antibiothérapie associée ou non à une chirurgie cardiaque, mais leurs effets restent modérés sur le risque embolique, ce dernier représentant pourtant une complication grave et relativement fréquente de l'EI comme nous avons pu l'évoquer dans la première partie de ce travail (2,19). Les résistances aux traitements antibiotiques sont également de plus en plus nombreuses, et conduisent à des impasses thérapeutiques pour les patients. Il parait donc judicieux de s'intéresser à de nouvelles molécules capables de réduire l'activation des facteurs de virulence bactériens nécessaires à l'initiation et à la progression des infections. Cibler les plaquettes, bien qu'elles possèdent également des effets bénéfiques sur l'évolution de l'infection, pourrait offrir une nouvelle alternative thérapeutique.

1. Données *in vitro*

1- Aspirine et acide salicylique

De nombreuses études se sont concentrées sur les effets de l'aspirine et de son métabolite principal : l'acide salicylique *in vitro*, et les mécanismes responsables de son effet sur *S. aureus* notamment.

En 2001, l'équipe de Polonio et al. s'intéresse à l'éradication du biofilm de *S. epidermidis* par l'utilisation d'une association de salicylate de sodium et de vancomycine. En effet, la formation du biofilm des bactéries est un paramètre important pour leur virulence, principalement dans la pathogenèse des infections de dispositifs implantés divers. Cette équipe a montré un effet bénéfique de l'utilisation de cette association *in vitro* puisqu'elle inhibe la formation du biofilm de *S. epidermidis*, et l'utilisation simultanée du salicylate de sodium et de la vancomycine augmente l'efficacité de la vancomycine seule (137).

Kupferwasser et al. vont élucider les mécanismes d'action de l'acide salicylique sur l'atténuation de la virulence de *S. aureus* 2 ans plus tard. En effet, cette équipe observe que l'acide salicylique agit sur deux paramètres impliqués dans la virulence de *S. aureus* : la sécrétion de l'α-toxine et la liaison à la fibronectine (138). L'acide salicylique est ainsi capable d'agir au niveau transcriptionnel en réduisant l'expression du gène promoteur de l'α-toxine *hla*, et celui responsable de la liaison à la fibronectine *fnbA*.

En fait, l'acide salicylique génère une réponse au stress du gène *sigB,* qui va atténuer l'expression des régulateurs globaux sarA et agr, et par conséquent celle des gènes de l'α-toxine et de la FnBPA et/ou FnBPB. L'acide salicylique peut également être responsable d'une diminution directe de la liaison à la fibronectine. L'opéron sigmaB est composé de 4 gènes : *rsbU, rsbV, rsbW* et *sigB*. RsbU est un détecteur qui répond à de nombreuses stimulations environnementales par autophosphorylation, qui va alors activer le gène suivant de l'opéron : RsbV. En effet, RsbU phosphorylé agit comme une phosphatase pour déphosphoryler RsbV, qui peut alors se lier compétitivement à un facteur anti-sigma : RsbW, ce qui déplace l'inhibiteur normal RsbW du complexe qu'il forme avec SigB (139). Ainsi, le régulateur SigB peut être activé par des voies dépendantes de *rsbU* et *rsbV,* et permet à *S. aureus* de survivre à de nombreuses conditions de stress, telles que des températures, pH, osmolarité et restrictions nutritives extrêmes, ou encore une exposition à l'éthanol ou une déplétion en oxygène *in vitro* (140).

Enfin, SigB peut également lui-même réguler un autre système de régulation à deux composants : saeRS, lui-même étant capable de réguler positivement l'expression de *hla* et *fnbA*. Toutefois, l'équipe de Karlsson et al. a montré que les souches de *S. aureus* n'expriment pas toutes le même niveau intrinsèque de *sigB* et par conséquent n'ont pas toutes la même expression des gènes dépendants de *sigB,* et elles possèdent également une variabilité dans leur capacité à produire la protéase V8 (staphylococcal serine protease) (141).

De plus, les 2 loci sarA et agr corégulent les gènes qui encodent une variété d'exoenzymes et de toxines de *S. aureus* dont celles responsables de la cytolyse des tissus de l'hôte. L'effet de l'aspirine sur le régulateur agr peut ainsi être direct avec une downrégulation des promoteurs agr RNAII et agr RNAIII, mais également indirect à travers la suppression du locus sarA.

De manière semblable, la réduction de la production de l'α-toxine peut se faire soit par la suppression de la voie agr-dépendante, soit par celle de la voie sarA-dépendante, car le promoteur *hla* peut être activé en réponse aux deux signaux.

D'autres publications ont également fait état de l'effet de l'aspirine *in vitro* et montrent une réduction de l'adhésion aux biomatrices (142), une diminution de la production des capsules bactériennes (143,144), ainsi qu'une atténuation de la formation du biofilm (137), ce qui est en accord avec les constatations énoncées précédemment.
De plus, il apparaît que l'acide salicylique a un impact sur l'expression du ClfA, variable en fonction de la phase de croissance dans laquelle se trouve la bactérie au moment où la molécule est utilisée (138). Un effet moindre peut être retrouvé sur les autres adhésines de liaison au fibrinogène telles que la Coa ou le ClfB.

Finalement, l'acide salicylique permet une réduction de la liaison aux ligands de la matrice impliquant la colonisation des tissus (fibrinogène, fibronectine et fibrine), ainsi qu'une réduction de la liaison aux cellules endothéliales et plaquettes (145) et de la production d'α-toxine (138).

Dotto et al. ont récemment mis en évidence un effet distinct de l'aspirine qui modifie la virulence de *S. aureus* : l'acide salicylique induit une expression et par conséquent une production augmentée de PIA (polysaccharide intercellular adhesin), ce qui diminue le taux de fer libre dans le biofilm et le rend plus sensible à l'action des antibiotiques et aux défenses de l'hôte (146). Toutefois, il a également été observé une augmentation consécutive de la formation du biofilm de *S. aureus* en présence d'acide salicylique par l'intermédiaire de PIA, ce qui peut alors contribuer défavorablement à la persistance de l'infection.

Enfin plus récemment, l'équipe de Chabert et al. s'est intéressée à l'effet de l'aspirine et de la fluvastatine sur l'activation plaquettaire et la réponse inflammatoire *in vitro* à *S. aureus*. Ils ont ainsi mis en évidence une efficacité de l'aspirine, mais pas des statines, pour limiter l'activation plaquettaire et la libération des facteurs de l'inflammation. L'utilisation de l'acide acétylsalicylique a également permis de restaurer le compte plaquettaire, en protégeant les plaquettes de l'induction de l'expression des marqueurs de mort cellulaire par *S. aureus* (147).

Chan et al. a étendu le spectre d'AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) testés et a ainsi utilisé aspirine, ibuprofène, diclofénac et acide méfénamique, en association avec des antibiotiques : le céfuroxime ou le chloramphénicol (148). Ibuprofène, aspirine et diclofénac

ont montré des propriétés antibactériennes contre les bactéries sélectionnées, et un effet synergique de l'ibuprofène et de l'aspirine a été constaté lorsqu'ils étaient associés avec le céfuroxime, aussi bien contre les souches de SASM (*S. aureus* sensible à la méticilline) et SARM. Toutefois, l'effet synergique de l'association de l'aspirine ou de l'ibuprofène avec le chloramphénicol était observé pour les souches de SARM testées, mais pas pour les souches de SASM (148). L'aspirine utilisée seule a également montré une efficacité contre des bactéries gram positives et négatives, ce qui n'est pas le cas du diclofénac.

Les effets de l'acide salicylique sont concentration-dépendants et l'aspirine montre donc un potentiel plutôt intéressant pour son utilisation dans les infections endovasculaires causées par *S. aureus*.

2- Thiénopyridines

Très peu d'études se sont actuellement intéressées à l'effet des thiénopyridines *in vitro* dans le contexte des infections. Farha et al. ont tout de même mis en évidence une capacité de la ticlopidine à cibler la N-acétylglucosamine-1-phosphate transférase, codée dans le gène tarO - qui est le gène codant pour la première étape de la synthèse des acides teichoïques de la paroi bactérienne - qui permet donc de bloquer cette synthèse (149). Les acides teichoïques de la paroi bactérienne sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques à travers le soutien de la fonction coopérative des protéines de liaison à la pénicilline (PBP) qui sont à la base de la résistance aux β-lactames. Cette équipe a ainsi montré une potentialisation de l'effet du céfuroxime par la ticlopidine, permettant une limitation efficace de la croissance des souches de SARM *in vitro* et *in vivo*.

Enfin, l'équipe d'Alsharif et al. a montré que le ticagrelor inhibe la recapture de l'adénosine cellulaire et que ceci potentialise l'effet de cette adénosine sur la chimiotaxie et la phagocytose des PNN (150). En effet, l'adénosine est connue pour être un médiateur majeur de l'inflammation et de l'immunité innée. Elle est générée à partir de l'ATP libérée en condition de stress cellulaire et capable d'upréguler les fonctions pro-inflammatoires des PNN et macrophages.

2. Modèles animaux

Ces résultats *in vitro* laissent suggérer une efficacité des antiplaquettaires *in vivo*, et plusieurs équipes ont donc étudié ces traitements sur des modèles animaux d'EI expérimentales. Ces études ont été surtout réalisées avec des souches de *S. aureus*, mais quelques-unes se sont également intéressées au streptocoque. Les résultats de ces études sont globalement contradictoires en fonction des souches et des traitements utilisés.

Ainsi, Levison et al. dès 1977 avaient testé l'effet de l'aspirine sur un modèle lapin d'EI à *Streptococcus viridans*. Toutefois, cette équipe n'avait pas constaté d'efficacité du traitement avec une taille de thrombus identique par rapport au groupe contrôle non traité (151).

Plus de 15 ans après, Nicolau et al. ont mené plusieurs études également sur des modèles lapin d'EI expérimentale à *S. aureus*. Cette équipe a quant à elle montré une réduction de la densité bactérienne dans les végétations avec l'utilisation d'aspirine à faible dose ainsi qu'une réduction de la taille de ces végétations (152). Elle a ensuite testé l'association de l'aspirine avec la vancomycine, ce qui a permis de constater que les doses d'aspirine de 2.5 et 10 mg/kg entraînent une réduction significative de la taille des végétations par rapport au groupe contrôle et que l'association de ces doses à la vancomycine permet de réduire également la densité bactérienne des végétations proportionnellement à la réduction de la taille des végétations, ce qui n'était pas le cas avec l'aspirine seule (153). Les doses de 20 et 50 mg/kg également testées entraînent également une réduction de la taille des végétations mais de manière non statistiquement significative. L'utilisation de doses supérieures d'aspirine ne semble donc pas apporter de bénéfice supplémentaire et l'effet de l'aspirine est dose-dépendant.

L'équipe de Kupferwasser va corroborer ces résultats puisqu'elle montre de manière similaire une réduction de la taille des végétations et de leur densité bactérienne avec l'aspirine, mais également une réduction de la densité bactérienne au niveau rénal ainsi qu'une réduction des évènements emboliques dans le rein (145), selon un effet dose-dépendant. De plus, cette équipe met en évidence le mécanisme sous-jacent à cet effet paradoxal puisque l'aspirine à une dose de 12mg/kg supprime la synthèse PGI2 (Prostangladine I2) or PGI2 inhibe l'adhésion plaquettaire et la formation du thrombus au niveau du sous-endothélium, cet effet étant moindre pour les doses de 4 et 8 mg/kg. Son inhibition provoque donc le passage des plaquettes dans un état pro-agrégant pour des doses plus fortes d'aspirine sur le site de dommage de l'endothélium,

ce qui favorise la formation de la végétation et l'évolution de l'EI plutôt que son atténuation (145).

Nicolau et al. se sont ensuite intéressés à l'effet d'un autre antiplaquettaire : la ticlopidine, appartenant à la famille des thiénopyridines (inhibiteurs du récepteur à l'ADP P_2Y_{12}). Une réduction significative de la taille des végétations est observée avec des doses de 10 et 100 mg/kg, et il existe également une réduction mais non statistiquement significative avec la dose de 50 mg/kg (154). Comme c'était le cas pour l'aspirine, l'association de la ticlopidine à la vancomycine permet d'obtenir également un effet sur la stérilisation de la végétation avec une diminution de la densité bactérienne (155).

Enfin, cette équipe a également testé pour la première fois une association de traitements antiplaquettaires : aspirine + ticlopidine. Une diminution significative de la taille des végétations est observée avec l'association tandis que cette réduction n'est pas statistiquement significative pour les groupes avec une monothérapie antiagrégante (156). Il semble donc exister une optimisation des effets pharmacologiques sur les interactions plaquettes-plaquettes et plaquettes-bactéries en utilisant deux antiplaquettaires possédant des mécanismes d'action différents.

Plus récemment, l'équipe de Veloso a travaillé sur un modèle rat d'EI expérimentale et s'est intéressée à d'autres germes que *S. aureus* puisqu'elle a étudié *E. faecalis* et *S. gallolyticus*. L'utilisation d'aspirine seule réduit la taille des végétations chez l'animal et prévient même la survenue d'EI chez 31% des animaux pour *E. faecalis,* tandis que la ticlopidine seule n'a aucun effet sur les 2 germes. L'association aspirine + ticlopidine permet quant à elle de réduire de manière importante la taille de la végétation et prévient efficacement l'EI chez 73% des animaux (157). Les mêmes observations sont faites pour les EI expérimentales à *S. gallolyticus*. Cette étude montre donc à nouveau un effet potentialisé d'une association d'antiagrégants sur d'autres germes que *S. aureus,* et ceci est confirmé par les études d'agrégation plaquettaire menées en parallèle des modèles animaux qui montrent un effet important de l'association antiagrégante pour réduire l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries, ce qui n'est pas le cas lorsque les traitements sont utilisés seuls (157).

Cette même équipe va ensuite tester ces traitements sur *S. aureus* et *S. gordonii,* mais également d'autres antiagrégants agissant sur l'intégrine αIIbβ3, eptifibatide et abciximab, ainsi que des traitements anticoagulants : dabigatran, qui est un anticoagulant oral direct agissant sur la

thrombine, et l'acénocoumarol, antivitamine K. Une nouvelle fois, l'association aspirine + ticlopidine est efficace sur ces germes avec une réduction de la survenue des EI et de la taille des végétations chez les animaux traités, de même que l'abciximab (158). L'eptifibatide et l'acénocoumarol sont quant à eux totalement inefficaces sur les 2 espèces. Enfin, le dabigatran montre une efficacité sur *S. aureus* mais pas sur *S. gordonii*, ce qui peut être expliqué par son mode d'action car il inhibe la transformation du fibrinogène en fibrine et la polymérisation de cette dernière, favorisée par un facteur de virulence spécifique de *S. aureus* : la Coa, retrouvée dans le complexe staphylothrombine capable de convertir le fibrinogène en fibrine pour faciliter l'agrégation plaquettaire (158).

D'autres études se sont alors intéressées à un effet potentiel du dabigatran dans des modèles expérimentaux d'infections à *S. aureus*.

Ainsi, Vanassche et al. montrent que l'inhibition de la staphylothrombine de *S. aureus* réduit sa virulence à la fois dans des modèles *in vitro* et *in vivo* avec une réduction de la taille des abcès de souris infectées lorsqu'elles sont traitées par dabigatran (159).

Enfin très récemment Lerche et al. ont également mis en évidence un effet très favorable du dabigatran dans un modèle rat d'EI à *S. aureus*, associé à un traitement antibiotique par gentamicine. En effet, l'utilisation du dabigatran permet de réduire significativement la taille de la végétation valvulaire mais aussi la densité bactérienne dans les valves aortiques ainsi que l'expression de marqueurs pro-inflammatoires tels que les cytokines IL-8, IL-1β et IL-6, ICAM-1, TIMP1 et L-sélectine (160). Une augmentation majeure du nombre de plaquettes circulantes a également été constatée en présence du traitement par dabigatran par rapport aux rats non traités, appuyant l'effet anti-virulence de cet anticoagulant, puisque la présence d'une thrombopénie est également un marqueur de sévérité de l'infection. De plus, il ne semble pas y avoir plus d'évènements hémorragiques chez les rats traités que chez les rats non traités.

Les effets majoritairement positifs des antiplaquettaires aspirine et ticlopidine dans les modèles animaux d'EI confirment les résultats observés *in vitro* et poussent à s'intéresser à un réel effet clinique de ces molécules afin d'évaluer le rapport bénéfice/risque de l'utilisation de ces traitements chez les patients. L'utilisation très récente du dabigatran semble offrir également une nouvelle option thérapeutique pour agir sur les évènements emboliques associés à l'EI et doit être évaluée sur des essais cliniques. Toutefois, ces études se concentrent en majorité sur

les EI à *S. aureus* et sont peu nombreuses sur les autres germes. Aucune étude n'a d'ailleurs été retrouvée sur un effet de ces traitements dans un modèle d'EI expérimentale à *S. sanguinis*.

3. Études cliniques

Les études cliniques qui ont été menées sont surtout des études rétrospectives plutôt que prospectives du fait de l'incidence faible de l'EI, mais ceci peut avoir un impact sur leurs conclusions. Des résultats contradictoires ressortent de ces études.

Ainsi, une première étude prospective a été menée en 1992 sur l'utilisation d'une faible dose d'aspirine chez des patients atteints d'EI et montre une diminution de la taille des végétations chez les patients traités ainsi que l'absence d'évènements emboliques alors qu'ils sont présents dans le groupe contrôle (161). Cependant, cette étude a été menée sur une cohorte de seulement 9 patients, ce qui ne permet pas d'affirmer l'effet bénéfique du traitement par aspirine.

L'équipe de Chan et al. a alors mené une étude prospective sur 115 patients, en utilisant une dose d'aspirine de 325 mg/j, chez des patients traités également par antibiotiques (162). Aucun effet significatif de l'aspirine n'a alors été mis en évidence dans cette étude sur le nombre et la taille des végétations, ainsi que sur les dysfonctions valvulaires dont pouvaient souffrir les patients. En revanche, une augmentation du risque de saignements majeurs et mineurs a été constatée chez les patients traités par aspirine par rapport à ceux qui ne l'étaient pas. Les effets de l'aspirine observés dans cette étude seraient donc bien plus délétères que bénéfiques. Cette même équipe a complété son étude 5 ans plus tard, car un des biais de la première étude réalisée était l'utilisation d'aspirine dans les 34 jours environ après le début des symptômes, ce qui pourrait expliquer l'absence d'efficacité du traitement. Toutefois, cette nouvelle étude réalisée sur des patients ayant pris de l'aspirine avant le début des symptômes et/ou dans les stades précoces de l'EI n'a pas non plus réussi à montrer une efficacité de l'aspirine et confirme l'augmentation du risque hémorragique chez ces patients, même si cette augmentation n'est pas statistiquement significative (163).

L'équipe d'Anavekar et al. a pour sa part mené une étude rétrospective sur une cohorte d'adultes atteints d'EI entre 1980 et 1998, et 2 groupes ont été créés en fonction de la prise d'antiplaquettaires en continu ou non pendant au moins 6 mois avant la survenue de l'EI (164). L'effet de différents antiplaquettaires a ainsi été étudié : aspirine, mais aussi dipyridamole, clopidogrel et ticlopidine, seuls ou en association. Une réduction de 64% de la survenue des

évènements emboliques chez les patients avec une thérapie antiplaquettaire préalable a été constatée par rapport aux patients non traités. Cependant, le bénéfice observé n'est pas identique chez les patients présentant des comorbidités cardiovasculaires telles que l'hypertension, une maladie des artères coronaires ou encore des antécédents d'infarctus du myocarde, car ces patients ont un niveau d'activation plaquettaire potentiellement plus élevé, qui ne peut par conséquent pas être inhibé totalement par l'aspirine, et ce sont des patients chez lesquels sont également parfois retrouvés des phénomènes de résistance à l'aspirine (165).

Finalement, aucune différence sur la mortalité à 6 mois n'a été constatée sur cette étude entre les deux groupes de patients, mais cela peut être attribuable à l'augmentation des comorbidités citées précédemment, ainsi qu'un âge plus avancé des patients traités par antiplaquettaires au long cours.

L'efficacité de l'aspirine a également été montrée par Sedlacek et al. chez les patients hémodialysés équipés de cathéters tunnélisés, particulièrement à risque de bactériémie à *S. aureus* (166). Une réduction de la fréquence des bactériémies à *S. aureus* chez ces patients a pu être observée lors de la prise d'un traitement par aspirine au long terme à une dose de 325 mg/j, avec une diminution du risque de survenue du premier épisode de bactériémie à SARM, mais également une diminution des complications métastatiques dès le premier épisode de bactériémie associée au cathéter. Cette étude permet donc de confirmer l'effet antimicrobien que possède l'aspirine contre *S. aureus*.

Pepin et al. ont également mené une étude rétrospective entre 1991 et 2006 sur une cohorte de 241 patients, et ne montrent pas de différence d'efficacité du traitement chez les patients selon qu'ils ont reçu une dose de 350 ou 80 mg/j (167). Le bénéfice de l'aspirine observé dans cette étude ne concerne pas la diminution du risque d'évènements emboliques majeurs, en revanche une réduction de la mortalité est constatée chez les patients traités par aspirine. Cet effet sur la mortalité pourrait tout de même être attribué à une atténuation de la virulence bactérienne, ainsi qu'à une stérilisation plus rapide des végétations, permettant une destruction valvulaire et une extension locale potentiellement moins sévère, comme cela a été mis en évidence dans plusieurs modèles animaux, plutôt que sur un effet majeur sur l'embolisme.

De plus, Eisen et al. ont montré à leur tour un effet de l'aspirine qui, utilisée précocement au moment du diagnostic, diminue significativement le nombre global de chirurgies aiguës de remplacement de la valve à la suite de l'EI à *S. aureus*, particulièrement si l'indication de la

chirurgie est une régurgitation valvulaire, une insuffisance cardiaque congestive ou un abcès péri-annulaire (168), malgré une absence d'effet sur le risque embolique en lui-même.

Aucune association avec un risque hémorragique augmenté chez les patients traités n'a été mise en évidence. Cette étude a également analysé l'effet de l'aspirine chez des patients avec EI à streptocoques du groupe viridans, et dans ce cas il ne semble pas y avoir de bénéfice du traitement par aspirine sur l'incidence de la chirurgie (168).

L'équipe d'Anavekar a par la suite étudié l'impact d'une thérapie préalable par antiplaquettaires mais également par les statines sur les évènements emboliques symptomatiques dans l'EI sur valve native sur une cohorte rétrospective (169). Les antiplaquettaires étudiés étaient l'aspirine, le dipyridamole, le clopidogrel et la ticlopidine, seuls ou en association comme lors de leur précédente étude, et différentes statines ont également été suivies : atorvastatine, simvastatine, pravastatine, lovastatine, rosuvastatine et fluvastatine. Il existe ainsi un effet significatif des statines sur la réduction des évènements emboliques lorsqu'elles sont utilisées quotidiennement avant l'apparition de l'EI. La réduction des évènements emboliques chez les patients traités par aspirine dans cette étude n'est cependant pas statistiquement significative. À nouveau, ce bénéfice n'est pas reporté sur la mortalité à 6 mois qui ne présente aucune différence entre les groupes de patients (169).

L'efficacité des statines sur le risque embolique semble provenir de leurs effets pléiotropiques, incluant une inhibition des fonctions plaquettaires, ainsi que des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires (170,171). En effet, la réduction de la synthèse du cholestérol qu'elles permettent joue un rôle crucial dans plusieurs voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'immunité innée et adaptative, mais aussi dans des effets anti-inflammatoires. Ainsi, la simvastatine est capable d'inhiber la réponse inflammatoire due à l'α-toxine de *S. aureus* chez le rat (172), et des essais cliniques menés sur l'athérosclérose ont démontré l'influence des statines sur la fonction endothéliale (173). L'atorvastatine possède particulièrement des propriétés antiplaquettaires à travers l'inhibition de PAR 1 (170) qu'elle génère, et qui permet une réduction de l'activité plaquettaire et des thromboses.

Malheureusement, Anavekar et al. ne se sont pas concentrés sur le risque hémorragique pouvant être induit par l'utilisation des antiplaquettaires dans ses différentes études et fournit donc des données uniquement sur l'efficacité des traitements sur les évènements emboliques.

Enfin, les données sur l'utilisation des antiplaquettaires chez des patients atteints de sepsis rapportées par Tsai et al. confirme l'efficacité à la fois de l'aspirine mais aussi des thiénopyridines, clopidogrel et ticlopidine, sur une cohorte de 683 421 patients entre 2000 et 2010 (174). Le bénéfice semble toutefois persister plus longtemps chez les utilisateurs d'aspirine par rapport aux thiénopyridines.

Cependant, aucune de ces différentes études citées ne s'est intéressée à un impact variable des traitements en fonction du pathogène incriminé dans l'EI, or il est connu que le risque embolique est dépendant du micro-organisme (164,166). Une étude rétrospective conduite dernièrement par le service de cardiologie du CHU Timone, a démontré le bénéfice de l'aspirine en termes de réduction d'évènements emboliques chez les patients présentant une EI à *S. aureus* traités au long cours par aspirine à faible dose (Veyrier et al . JACC in press). De plus, cette équipe a effectivement mis en évidence une efficacité différente des antiplaquettaires et statines en fonction du germe responsable de l'EI.

4. Conclusion

L'ensemble de ces études menées sur différents niveaux de preuves a permis d'élucider certains mécanismes de fonctionnement des antiplaquettaires, particulièrement l'aspirine. Cette dernière semble ainsi avoir un effet direct bien connu sur les plaquettes, mais également des effets indirects sur la prostacycline ainsi que sur des médiateurs de l'adhérence tels que la thrombospondine et la fibronectine, qui contribuent à la réduction observée de la densité bactérienne et la taille des végétations dans les études animales. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries obtenue avec l'aspirine implique donc des mécanismes antimicrobiens et antiplaquettaires.

Bien que les résultats des études animales et cliniques montrent des discordances sur l'efficacité des antiplaquettaires, une majorité d'études semble aller dans le sens d'un bénéfice de l'utilisation de ces traitements, particulièrement s'ils sont utilisés avant le diagnostic de l'EI ou de manière très précoce après que le diagnostic de la maladie a été posé. Il ne semble néanmoins pas y avoir d'impact final sur la mortalité à 6 mois de ces traitements, cependant un biais non négligeable sur l'ensemble de ces études rétrospectives est introduit par la présence fréquente de très nombreuses comorbidités chez les patients préalablement traités par antiplaquettaires,

qui sont également généralement plus âgés que les patients non traités, et ces paramètres sembleraient être responsables d'une mortalité plus élevée dans ce groupe de patients.

La nécessité de nouvelles études prospectives sur l'utilisation de ces molécules apparaît donc évident car les données actuelles sur ces traitements semblent offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques intéressantes pour améliorer le pronostic de l'EI.

D'autres molécules telles que le dabigatran, mais également les statines semblent avoir des effets positifs, qu'il faudra explorer également.

IV- Travail personnel

1. Introduction

Les données de la littérature évoquées précédemment laissent apercevoir un bénéfice potentiel non négligeable de l'utilisation des antiplaquettaires sur les évènements emboliques associés à l'EI, qui représentent une complication majeure et grave de cette pathologie et donc un enjeu de santé publique.

De nombreuses études se sont intéressées à *S. aureus*, et certaines à d'autres pathogènes mais de manière plus anecdotique. Nous avons ainsi choisi de travailler sur les deux pathogènes les plus fréquemment responsables d'EI à l'heure actuelle : *S. aureus* et *S. sanguinis*, et de nous intéresser à différentes souches appartenant à ces espèces, afin d'établir l'efficacité de différents traitements antiplaquettaires basés sur les traitements les plus communément prescrits actuellement : aspirine et ticagrelor, seuls ou en association.

L'objectif de notre étude est de déterminer l'effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et l'activation plaquettaire induite par les interactions plaquettes-bactéries en fonction des espèces et des souches bactériennes de *S. aureus* et *S. sanguinis*.

Une approche fonctionnelle à travers l'étude des profils d'agrégation plaquettaire par agrégométrie, et une approche phénotypique pour déterminer les profils d'activation plaquettaire par cytométrie de flux ont été réalisées.

2. Matériel et Méthodes

1- Préparation des plaquettes

Le plasma riche en plaquettes (PRP) a été préparé selon les recommandations de l'ISTH (175) à partir de prélèvements de sang veineux périphérique, prélevés sur tubes contenant 3.2% de citrate de sodium (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), de donneurs sains (n=80), n'ayant pas d'infection ni pris de traitement anti-inflammatoire ou anti-agrégant dans la semaine précédant le prélèvement. Une numération plaquettaire a été réalisée sur l'analyseur d'hématologie SYSMEX XN 3000 SP-10, à l'issue de l'étape de centrifugation (110g pendant 10 minutes à 20°C). La suspension plaquettaire a été ajustée à 250 G/L avec le plasma dépourvu

en plaquette (PDP) du patient correspondant. Ce PDP a été obtenu par centrifugation à 2300 g pendant 10 minutes à 20°C.

Les PRP ainsi obtenus sont alors incubés dans un bain marie à 37°C afin de maintenir les plaquettes au repos jusqu'au moment de l'analyse. Pour chaque prélèvement, une mesure de l'état de l'activation plaquettaire a été réalisée par la mesure de l'expression de la P-sélectine par cytométrie de flux.

Les plaquettes lavées ont été préparées pour les essais de cytométrie en flux selon le protocole du laboratoire. Elles ont donc été obtenues à partir d'une seconde centrifugation du PRP à 1100g pendant 10 minutes à 20°C, à la suite de laquelle le surnageant a été jeté et le culot plaquettaire a été repris avec du PBS (CHEMSOLUTE Dutscher). La concentration finale de la suspension plaquettaire était de 250 G/L.

2- Préparation des souches bactériennes

Toutes les souches bactériennes utilisées sont issues de la collection de souches de l'IHU Méditerranée Infection et ont été qualifiées par Maldi-Tof selon le protocole classiquement utilisé (176). 5 souches de *Staphylococcus aureus* ont été testées, 4 isolées à partir d'hémocultures réalisées chez des patients ayant présenté des endocardites infectieuses avec de grosses végétations et des complications emboliques (souches : SA P6142, P6207, P6175, P6141), une souche était obtenue à partir de bactériémie non compliquée d'EI: SA P2188 (Annexe 1).

3 souches de *Streptococcus sanguinis* ont été testées (SS P8633, P2760, P2754) issues respectivement d'hémocultures réalisées chez un patient atteint d'EI pour la première souche (P8633), et de prélèvements de pharynx pour les 2 autres (P2760, P2754).

Pour chaque expérience, les souches sont ensemencées sur des boîtes de gélose COS (Columbia + 5% de sang de mouton bioMérieux SA France) et incubées dans une étuve à 37°C pendant 20 heures pour *S. aureus* et 32 heures pour *S. sanguinis*.

Les colonies obtenues ont ensuite été mises en suspension dans du NaCl 0.9% pour obtenir une concentration finale de bactéries de 10^9 CFU/mL pour *S. aureus* (115) et 3*10^9 CFU/mL pour *S. sanguinis* (177). Ces concentrations ont été déterminées en utilisant un densitomètre McFarland (DEN-1B Biosan).

3- Traitement *in vitro* de PRP de sujets sains par des antiplaquettaires pour les tests d'agrégation

Les PRP issus de donneurs sains ont été séparés en plusieurs aliquots de 400µL et traités soit par :

- Aspirine (inhibiteur de la cyclooxygénase) pour une concentration finale de 2mM (146,178)
- Ticagrelor (inhibiteur de la voie de P2Y12) pour une concentration finale de 10µM (179)
- Tirofiban (Anti GpIIbIIIa) pour une concentration finale de 5µM (180).

Un aliquot n'a reçu aucun traitement. Une partie de cet aliquot non traité sera stimulé par du TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide) 20µM (AgroBio, STAGO) et sera alors considéré comme contrôle positif, ou par du NaCl 0.9% et sera alors considéré comme contrôle négatif.

Les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes au bain marie à 37°C (146). Les PRP traités ou non ont été incubés avec les différentes souches bactériennes pour une concentration finale de 10^9 CFU/ml pour *S. aureus* et de 3*10^9 pour *S. sanguinis*, respectivement pendant 15 à 30 minutes et 10 minutes (181).

4- Agrégation plaquettaire induite par les espèces bactériennes

Les essais ont été réalisés sur un agrégomètre de type APACT 4004 (LABiTec). Le principe de l'agrégation repose sur le principe de la turbidimétrie avec agitation constante et maintien de la température à 37°C. L'analyse est faite sur le logiciel APACT LPC-Software.

La calibration de l'agrégomètre s'est faite en utilisant le PRP du patient correspondant à 0% de transmission lumineuse soit 0% d'agrégation et son PDP correspondant à 100% de transmission lumineuse soit 100% d'agrégation.

180µL de PRP ont été traités avec 20µL de suspension bactérienne pour *S. aureus*. Pour les essais avec *S. sanguinis*, 170µL de PRP ont été traités par 30µL de suspension de *S. sanguinis* (38).

L'enregistrement via transmission lumineuse de l'agrégation plaquettaire a été réalisé pendant 20 minutes.

5- Analyse de l'activation plaquettaire par Cytométrie de flux après traitement par les suspensions bactériennes

Les plaquettes lavées et traitées ou non par antiplaquettaire, selon le même protocole que pour l'agrégation plaquettaire, sont mises en contact avec la suspension bactérienne (20 µL + 180µL de suspension plaquettaire) et sont incubées au bain marie pendant 1 heure à 37°C.

A l'issue d'une heure d'incubation, les plaquettes lavées (180µL) traitées ou non par antiplaquettaire ont été traitées pendant 30 minutes avec 4µL du CD41 PC5 de Beckman Coulter et du CD62P PE-Cy5 de BD biosciences (conditions de saturation testées au laboratoire, dilution 1/50e).

Le contrôle négatif, incubé en parallèle, correspond à des plaquettes lavées suspendues dans du NaCl. Le contrôle positif correspond à des plaquettes lavées traitées par du TRAP 20µM (AgroBio, STAGO) et a été réalisé pour chaque expérience.

Tous les patients ont été analysés en double passage.

Les analyses ont été réalisées sur un cytomètre de flux FC 500 (Beckman Coulter) et les résultats ont été analysés avec les logiciels CXP cytometer software (acquisition) et Kaluza flow cytometry analysis.

Les résultats sont exprimés en MFI (unités arbitraires).

6- Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. En fonction de la normalité ou non de la distribution des valeurs, évaluée par le test de normalité de Shapiro-Wilk, les comparaisons entre les groupes ont été faites par des T-tests paramétriques ou par des tests de Wilcoxon (non paramétriques) sur des données appariées. Une différence était considérée comme significative lorsque $p<0.05$.

3. Résultats

1- Agrégation plaquettaire induite par les bactéries

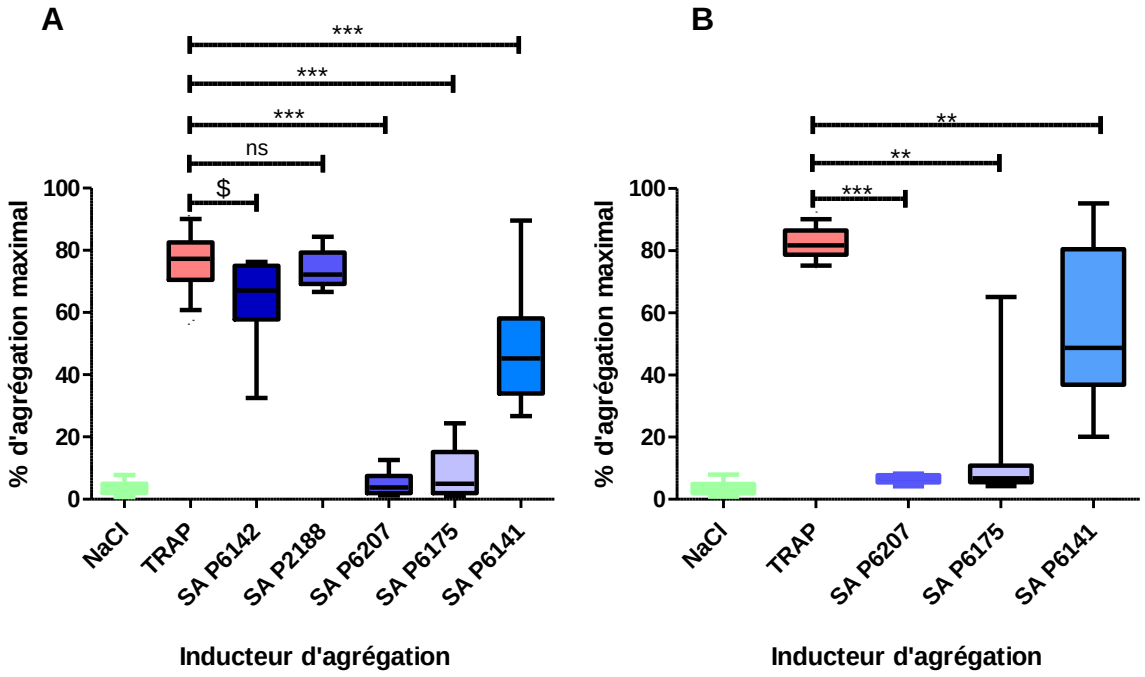
a) *Staphylococcus aureus*

Les souches P6142 et P2188 de *S. aureus* ont induit un pourcentage d'agrégation respectivement de 63.9% +/- 13.4 et de 74% +/- 6.03 (n=10 pour chaque souche) après 15 minutes d'incubation. Il n'existe pas de différence significative par rapport au pourcentage obtenu avec le TRAP, contrôle positif (respectivement 76.4% +/- 11.2, p=0.0678 pour P6142 et 79.1% +/- 5.8, p=0.1111 ; t-test) (Figure 12A).

En revanche, les souches P6207, P6175 et P6141 (n=10 pour chaque souche) induisent un pourcentage d'agrégation respectivement de 4.96% +/- 3.7, 8.4% +/- 7.9 et 48% +/- 18.5 (Figure 12A). Il existe une différence significative par rapport au pourcentage d'agrégation obtenu avec le TRAP (p<0.0001 pour P6207 et P6175, et p=0.0003 pour P6141 ; t-test). Toutefois, il n'existe pas de différence significative entre le contrôle négatif et les souches P6207 et P6175 (respectivement p=0.0697, p=0.2237 ; t-test), cette différence étant au contraire significative pour la souche P6141 (p<0.0001 ; t-test).

Pour ces 3 dernières souches P6207, P6175 et P6141, les essais ont ensuite été réalisés après 30 minutes d'incubation. Seule la souche P6141 a permis d'obtenir un pourcentage d'agrégation de 53% +/-22.9 après 30 minutes d'incubation. Ce pourcentage est cependant significativement diminué par rapport au pourcentage obtenu avec le contrôle positif (n=10, p=0.0023 ; t-test) (Figure 12B). Une grande variabilité inter-individuelle a été obtenue avec la souche P6175 (n=10) avec des pourcentages d'agrégation allant de 4.3% à 65.1% (p=0.0020 ; Wilcoxon test). Enfin, malgré un temps d'incubation plus long, aucune agrégation n'a été obtenue avec la souche P6207 (pourcentage d'agrégation : 6.5% +/- 1.6 ; p<0.0001 ; t-test).

Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une hétérogénéité significative dans le pouvoir pro-agrégant des différentes souches de *Staphylococcus aureus*.



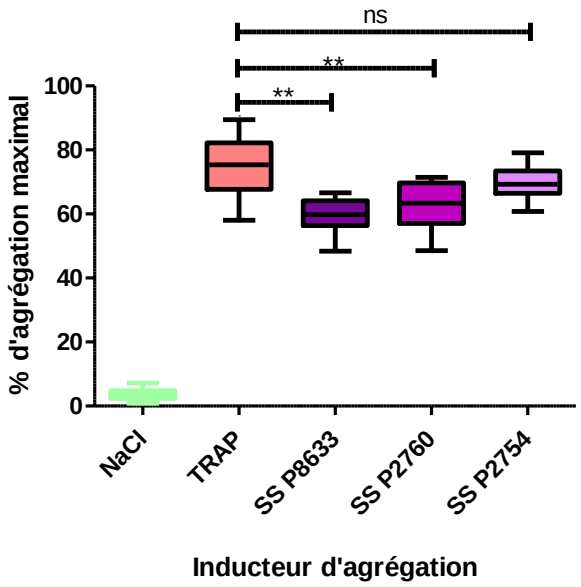
<u>Figure 12</u> : Agrégation plaquettaire obtenue après traitement des PRP de sujets sains par différentes souches de *S. aureus* après 15 minutes (A) et 30 minutes (B) d'incubation. Analyse par agrégation plaquettaire sur une durée de 20 minutes (n= 10). *ns si p>0.05, $ si p<0.05, ** si p<0.005, *** si p<0.0005*

b) *Streptococcus sanguinis*

Quelle que soit la souche testée, un pourcentage d'agrégation important a été obtenu, quel que soit l'échantillon de PRP testé avec respectivement 59.6% +/- 5.5 pour SS P8633, 62.8% +/- 7.3 pour SS P2760, et 69.7% +/- 5.3 pour SS P2754 (n=10 pour chaque souche). Ces pourcentages sont assez comparables à ceux obtenus en présence du TRAP mais sont statistiquement différents pour les 2 premières souches, au contraire de la troisième (74.5% +/- 9.1, respectivement p=0.0018, p=0.0017, et p=0.3691 (t-test)) (Figure 13).

Les 3 souches de *S. sanguinis* induisent une forte agrégation plaquettaire sans différence significative entre les souches.

De plus, aussi bien pour *S. aureus* que pour *S. sanguinis* il semble exister une variabilité inter-patient, en fonction des souches et des espèces sur l'induction d'une agrégation plaquettaire par les bactéries car une agrégation a parfois été obtenue pour un même patient avec une souche mais pas avec une autre (données non montrées).



<u>Figure 13</u> : Agrégation plaquettaire obtenue après traitement des PRP de sujets sains par différentes souches de *S. sanguinis* après 10 minutes d'incubation. Analyse par agrégation plaquettaire sur une durée de 20 minutes (n=10) *ns si p>0.05, $ si p<0.05, ** si p<0.005, *** si p<0.0005*

2- Mesure de l'expression de la P-selectine : témoin de l'état d'activation plaquettaire

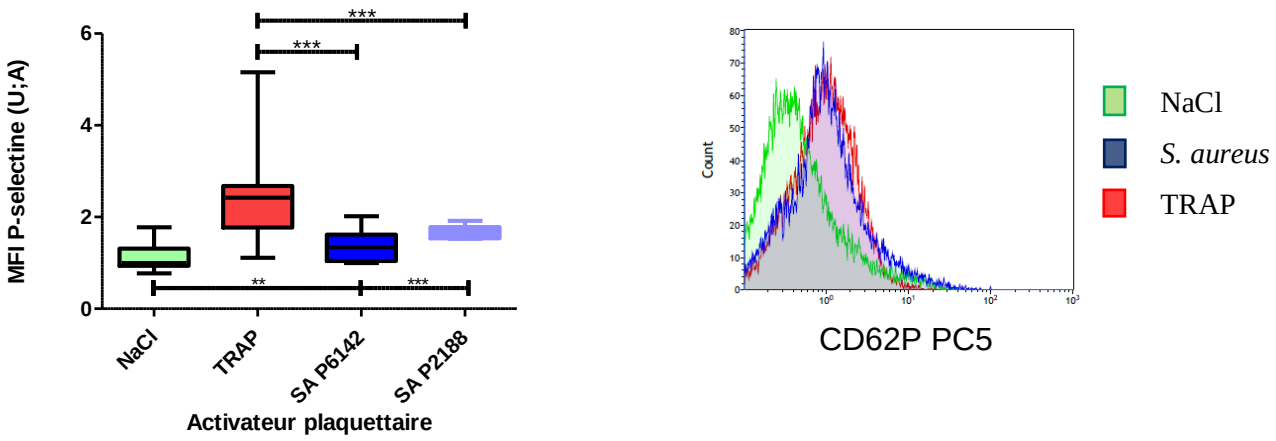
a) *Staphylococcus aureus*

En présence des souches P6142 et P2188, responsables d'une agrégation plaquettaire significative, l'expression de la P-selectine est significativement augmentée par rapport au contrôle négatif (n=12) (Figure 14).

	MFI P-sélectine (U;A)		
	Témoin négatif	**TRAP**	***S. aureus***
P6142 (n=6)	1.166 +/- 0.37	2.753 +/- 1.69	1.373 +/- 0.37 p=0.002 (t-test)
P2188 (n=6)	1.053 +/- 0.15	2.248 +/- 0.45	1.605 +/- 0.15 p=0.0001 (t-test)

<u>Tableau 3</u> : Valeurs de MFI de la P-selectine pour les souches de *S. aureus*

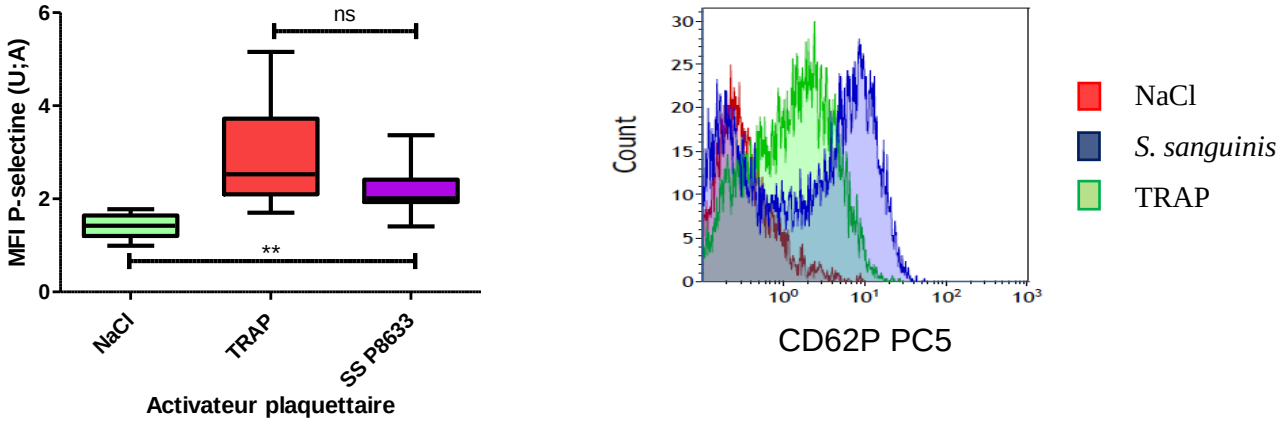
Le traitement des plaquettes par une suspension bactérienne de *S. aureus* induit une activation plaquettaire objectivée par la mesure de l'expression de la P-sélectine. Il n'existe pas de différence significative sur cette activation plaquettaire en fonction des souches de *S. aureus* testées (p=0.1189, t-test).



<u>Figure 14</u> : Expression de la P-selectine par CMF obtenue après traitement des plaquettes lavées de sujets sains par différentes souches de *S. aureus* (n=12) *ns si p>0.05, $ si p<0.05, ** si p<0.005, *** si p<0.0005*

b) *Streptococcus sanguinis*

Lorsque les plaquettes sont incubées avec *S. sanguinis*, l'expression de la P-selectine par les plaquettes est significativement augmentée : MFI= 2.17 +/- 0.52 U;A versus plaquettes témoins MFI = 1.423 +/- 0.26 U;A (n=10 ; p=0.0008 (t-test)) (Figure 15).



<u>Figure 15</u> : Expression de la P-selectine par CMF obtenue après traitement des plaquettes lavées de sujets sains par une souche de *S. sanguinis* (n=10). *ns si p>0.05, $ si p<0.05, ** si p<0.005, *** si p<0.0005*

Les souches de streptocoque testées induisent une activation plaquettaire significative.

3- Effet des antiplaquettaires

a) *Staphylococcus aureus*

Agrégation plaquettaire

L'effet des antiplaquettaires a été évalué sur les 3 souches avec lesquelles une agrégation plaquettaire avait été obtenue. Quels que soient le traitement et la souche testés, une diminution de l'agrégation plaquettaire a été observée. Il existe toutefois des différences entre l'effet de ces traitements (Annexe 2).

	Pourcentage d'agrégation				
	Non traité	**Aspirine (2mM)**	**Ticagrelor (10µM)**	**Aspirine (2mM) + Ticagrelor (10µM)**	**Tirofiban (5µM)**
P6142 (n=10)	63,9 +/- 13,4	20,7 +/- 2,5 p<0,0001 (t-test)	11,3 +/- 3,1 p=0,0020 (Wilcoxon)	18,5 +/- 2,7 p<0,0001 (t-test)	6,5 +/- 4,4 p<0,0001 (t-test)
P2188 (n=10)	74 +/- 6,03	20,5 +/- 5,4 p<0,0001 (t-test)	1,94 +/- 1,33 p<0,0001 (t-test)	7,94 +/- 4,5 p<0,0001 (t-test)	3,3 +/- 2,4 p<0,0001 (t-test)
P6141 (n=10)	48 +/- 18,5	25,5 +/- 17,4 p=0,0020 (Wilcoxon)	15,6 +/- 5 p=0,0020 (Wilcoxon)	21,4 +/- 4,1 p=0,0007 (t-test)	6,1 +/- 2 p<0,0001 (t-test)

Tableau 4 : Pourcentages d'agrégation induit par les souches de *S. aureus* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires.

Le pré-traitement par aspirine induit une diminution de l'agrégation plaquettaire par rapport aux plaquettes non traitées ($p<0.05$, quelle que soit la souche de *S. aureus* testée).

Comme le montrent les Figures 16A et 16B, l'inhibition la plus significative est obtenue lorsque les plaquettes sont prétraitées par le ticagrelor, quelle que soit la souche de *S. aureus* testée ($p<0.05$).

La combinaison aspirine + ticagrelor ne potentialise pas l'effet du ticagrelor seul ($p<0.05$). Comme attendu, le pré-traitement des plaquettes par le tirofiban inhibe de manière très significative l'agrégation plaquettaire induite par les 3 souches de *S. aureus* testées ($p<0.05$).

Mesure de l'expression de la P-selectine

La mesure de l'expression de la P-selectine a été réalisée seulement pour les souches P6142 et P2188.

	MFI P-sélectine (U ;A)				
	Non traité	**Aspirine (2mM)**	**Ticagrelor (10µM)**	**Aspirine (2mM) + Ticagrelor (10µM)**	**Tirofiban (5µM)**
P6142 (n=6)	1.37 +/- 0.37	0.98 +/- 0.28 p=0.0016 (t-test)	0.87 +/- 0.29 p=0.0027 (t-test)	0.94 +/- 0.17 p=0.011 (t-test)	1.1 +/- 0.37 p=0.0011 (t-test)
P2188 (n=6)	1.66 +/- 0.15	1.45 +/- 0.16 p=0.0274 (t-test)	1.17 +/- 0.13 p<0.0001 (t-test)	1.2 +/- 0.07 p=0.0004 (t-test)	1.3 +/- 0.06 p=0.0017 (t-test)

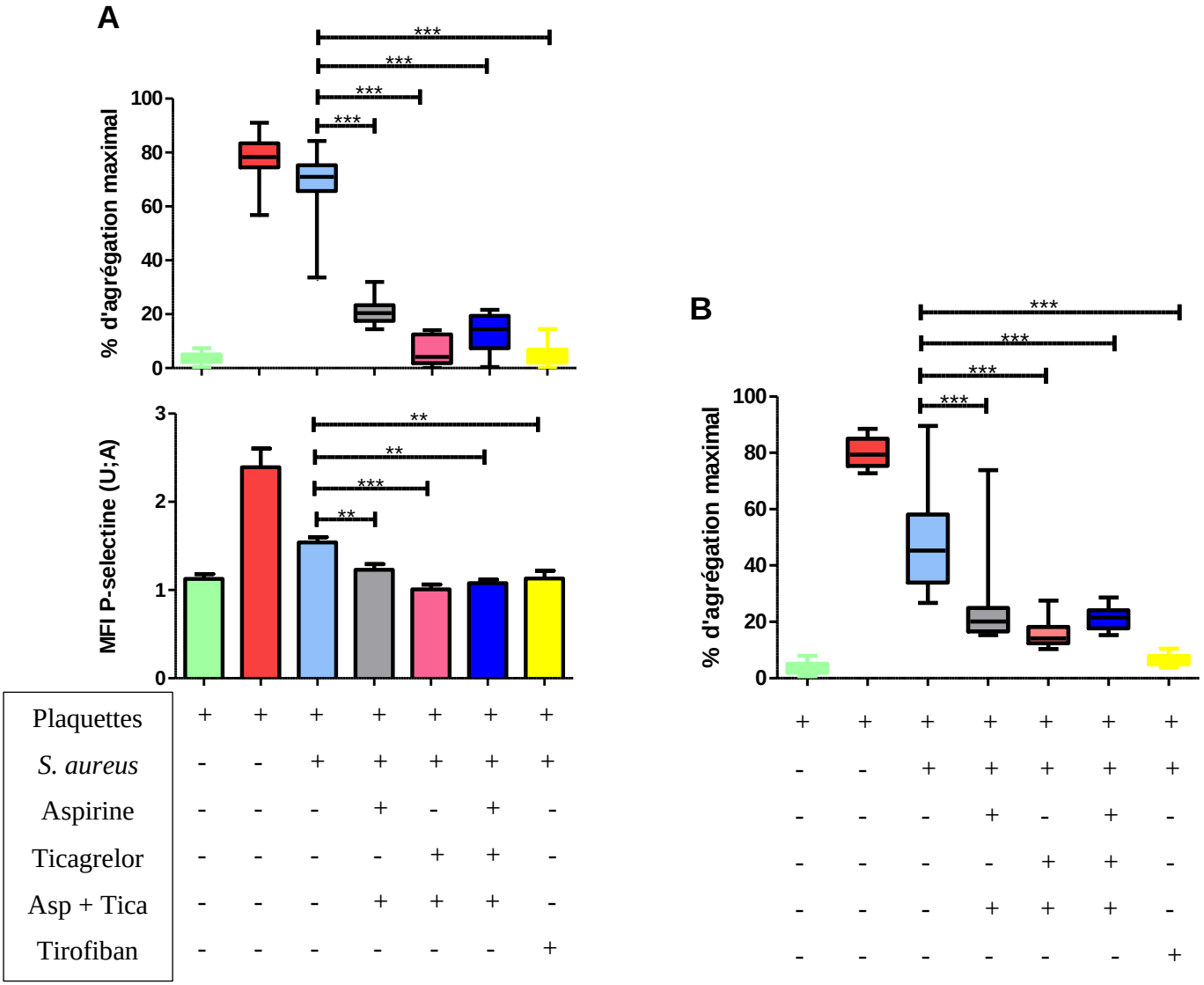
Tableau 5 : Valeurs de MFI de la P-selectine pour les souches de *S. aureus* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires.

Le pré-traitement par aspirine induit une réduction significative de l'expression de la P-selectine par les plaquettes pour les 2 souches ($p<0.05$).

Comme le montre la Figure 16A, la réduction la plus significative de l'expression de la P-selectine est obtenue lorsque les plaquettes sont prétraitées par ticagrelor quelle que soit la souche testée ($p<0.05$).

A nouveau, la combinaison aspirine + ticagrelor ne potentialise pas l'effet du ticagrelor seul ($p>0.05$, t-test) mais permet de potentialiser légèrement l'effet de l'aspirine seul ($p<0.05$, t-test). Comme attendu, le pré-traitement par tirofiban n'induit pas une inhibition totale de l'expression de la P-selectine, toutefois il réduit significativement l'activation plaquettaire induite par *S. aureus* ($p<0.05$, t-test).

L'étude phénotypique confirme les tests fonctionnels. Le profil de réponse aux traitements est comparable à celui de l'agrégation plaquettaire. Ces résultats suggèrent que les antiplaquettaires, et notamment le ticagrelor, diminuent l'agrégation induite par le Staphylocoque à travers une diminution de l'activation plaquettaire induite par le contact avec la bactérie.



<u>Figure 16</u> : Evaluation de l'effet du traitement *in vitro* des plaquettes par différents antiplaquettaires sur l'agrégation et l'activation plaquettaire induite par les différentes souches de *S. aureus* SA P6142 et P2188 (A) et P6141 (B) (n=10) *ns si p>0.05, $ si p<0.05, ** si p<0.005, *** si p<0.0005*

b) *Streptococcus sanguinis*

Agrégation plaquettaire (Annexe 3)

	Pourcentage d'agrégation				
	Non traité	**Aspirine (2mM)**	**Ticagrelor (10µM)**	**Aspirine (2mM) + Ticagrelor (10µM)**	**Tirofiban (5µM)**
P8633 (n=10)	58.6 +/- 8.1	39.2 +/- 9.5 p=0.0039 (Wilcoxon)	45.6 +/- 7.1 p=0.0273 (Wilcoxon)	20.9 +/- 14.1 p=0.0039 (Wilcoxon)	0.24 +/- 0.23 p=0.0020 (Wilcoxon)
P2760 (n=10)	62.8 +/- 7.3	7.9 +/- 13.5 p=0.0020 (Wilcoxon)	19.4 +/- 27.6 p=0.0039 (Wilcoxon)	2.5 +/- 1.9 p<0.0001 (t-test)	0.75 +/- 0.5 p<0.0001 (t-test)
P2754 (n=10)	69.7 +/- 5.3	24.9 +/- 17.6 p=0.0020 (Wilcoxon)	37 +/- 22.4 p=0.0020 (Wilcoxon)	8.4 +/- 6.6 p<0.0001 (t-test)	0.7 +/- 0.7 p<0.0001 (t-test)

Tableau 6 : Pourcentages d'agrégation induit par les souches de *S. sanguinis* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires.

Le pré-traitement par aspirine induit une diminution de l'agrégation plaquettaire modérée mais significative ($p<0.05$), toutefois plus marquée pour la souche SS P2760 par rapport aux autres souches.

Le pré-traitement par ticagrelor induit quant à lui la réduction de l'agrégation plaquettaire la moins significative par rapport aux autres traitements mais cette réduction reste significative par rapport à l'agrégation induite par *S. sanguinis* ($p<0.05$). Comme observé avec l'aspirine, la diminution de l'agrégation est plus importante pour la souche SS P2760.

Comme le montre la Figure 17, l'inhibition la plus significative est obtenue pour les 3 souches lorsque les plaquettes sont prétraitées avec l'association aspirine + ticagrelor ($p<0.05$).

Comme attendu, le pré-traitement des plaquettes par le tirofiban inhibe de manière très significative et totale l'agrégation plaquettaire induite par les 3 souches de *S. sanguinis* ($p<0.05$).

Le profil global de réponse au traitement observé pour les 3 souches est comparable. Cependant, comme le montrent les valeurs des écart-types, les résultats pour les 3 traitements, et particulièrement pour le pré-traitement par ticagrelor seul et aspirine

seule, sont contrastés avec une variabilité inter-patient au sein de chaque souche très importante pour la réponse à ces traitements. Il est également important de souligner que la souche SS P2760 semble se détacher des 2 autres souches testées car elle montre un profil de sensibilité à l'ensemble des traitements bien plus important que les 2 autres souches. Il existe donc également une variabilité inter-souche sur la sensibilité aux antiplaquettaires.

Mesure de l'expression de la P-selectine

La mesure de l'expression de la P-selectine n'a été réalisée que pour la souche SS P8633 afin d'illustrer le profil d'activation plaquettaire pour *S. sanguinis*.

	MFI P-sélectine (U ; A)				
	Non traité	**Aspirine (2mM)**	**Ticagrelor (10µM)**	**Aspirine (2mM) + Ticagrelor (10µM)**	**Tirofiban (5µM)**
P8633 (n=10)	2.17 +/- 0.52	2.09 +/- 0.58 p=0.3586 (Wilcoxon)	1.86 +/- 0.38 p=0.0014 (t-test)	1.69 +/- 0.28 p=0.0006 (t-test)	2.81 +/- 2.17 p=0.2619 (Wilcoxon)

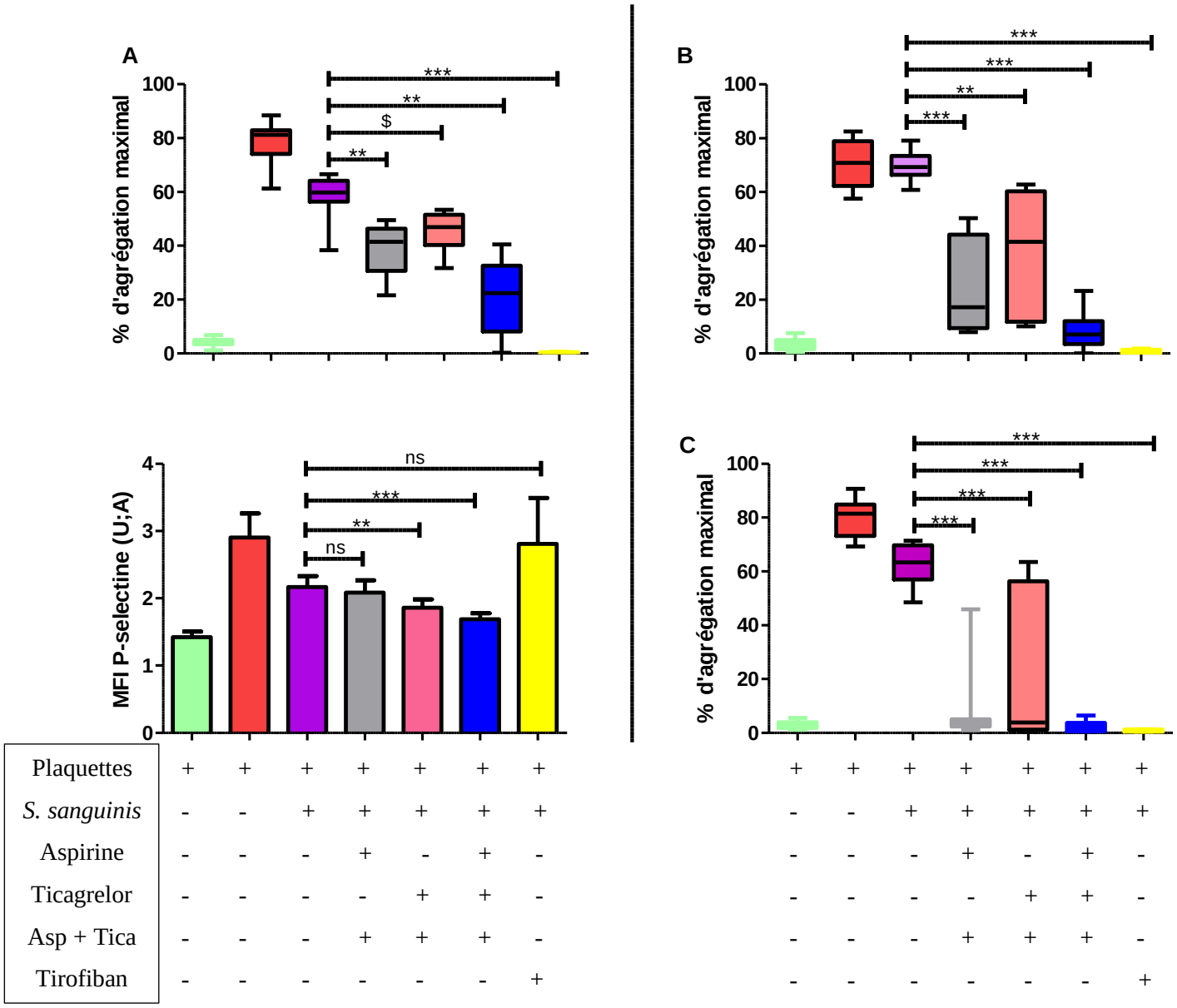
Tableau 7 : Valeurs de MFI de la P-selectine pour *S. sanguinis* avec et sans les différents traitements antiplaquettaires.

Le pré-traitement par aspirine n'induit presque aucune réduction de l'expression de la P-selectine et il n'existe pas de différence significative par rapport à l'expression de la P-selectine avant traitement ($p>0.05$).

Le pré-traitement par ticagrelor induit une réduction significative de l'expression de la P-selectine par les plaquettes plus importante que l'aspirine et significative mais qui reste modérée ($p<0.05$).

Comme le montre la Figure 17A, la réduction la plus significative de l'expression de la P-selectine est obtenue lorsque les plaquettes sont prétraitées par la combinaison aspirine + ticagrelor ($p<0.05$).

De manière similaire à ce qui avait été observé pour *S. aureus*, le pré-traitement par tirofiban n'induit aucune d'inhibition de l'expression de la P-selectine ($p>0.05$).



<u>Figure 17</u> : Evaluation de l'effet du traitement *in vitro* des plaquettes par différents antiplaquettaires sur l'agrégation et l'activation plaquettaire induite par la souche *S. sanguinis* P8633 (A) (n=10), et sur l'agrégation plaquettaire induite par les souches P2754 (B) et P2760 (C) *ns si p>0.05, $ si p<0.05, ** si p<0.005, *** si p<0.0005*

Les résultats de cytométrie de flux ont donc confirmé ceux des tests fonctionnels pour *S. sanguinis* puisque le traitement par l'association aspirine + ticagrelor induisant la réduction la plus significative de l'expression de la P-selectine est le même que celui qui permet d'obtenir la diminution la plus significative d'agrégation plaquettaire induite par la bactérie. Le traitement par ticagrelor seul semble ici toutefois plus efficace que l'aspirine seule pour réduire l'expression de la P-selectine (p=0.0093, Wilcoxon).

V- Discussion

Nos résultats montrent que les espèces bactériennes testées induisent une agrégation et activation plaquettaires variables en fonction de l'espèce mais aussi en fonction des souches pour *S. aureus*. Nous démontrons qu'il existe une réponse différente aux traitements antiplaquettaires en fonction des espèces bactériennes. En effet, le ticagrelor est le traitement le plus efficace pour réduire l'activation et l'agrégation plaquettaires induites par *S. aureus*. En revanche, l'association aspirine + ticagrelor est la plus efficace pour diminuer l'activation et l'agrégation plaquettaires induites par *S. sanguinis*.

Bien que des études ont déjà démontré l'hétérogénéité des souches de *S. aureus* (39,40), à notre connaissance, aucune étude n'a comparé *in vitro* le pouvoir pro-agrégant de différentes souches de cette bactérie. Nos résultats montrent une variabilité entre les souches dans leur capacité pro-agrégante au sein de la même espèce bactérienne. Les souches utilisées dans notre étude étaient presque toutes Meti-Sensibles, à l'exception d'une, et quatre d'entre elles étaient isolées à partir de prélèvements de patients ayant présenté une EI. Nous n'avons pas pu relier la capacité pro-agrégante des souches testées aux manifestations cliniques des patients. Cependant, notre effectif est restreint et il existe de plus une hétérogénéité dans la prise en charge des patients avec parfois une errance au diagnostic et/ou une antibiothérapie systématique avec l'hospitalisation dans le service de cardiologie qui peut expliquer les variations dans les tailles des végétations. Néanmoins, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette capacité variable à induire l'agrégation plaquettaire des différentes souches de *S. aureus* est probablement à relier au niveau d'expression des MSCRAMMS qui, liées au fibrinogène, vont interagir avec l'intégrine αIIbβ3. Cette interaction génère un « outside » signal capable de déclencher l'activation puis l'agrégation plaquettaire (48). Le taux de ClfA à la surface de *S. aureus* est un paramètre crucial pour que l'activation plaquettaire puisse se produire (40). Enfin, il a été démontré que des souches déficientes en ClfA dans des modèles d'EI chez le rat présentaient des végétations de plus petite taille (55). Par ailleurs, il existe d'autres mécanismes d'interactions plaquettes-*S. aureus* directs capables d'induire une activation et une agrégation plaquettaires. En effet, l'iron-regulate surface determinant B (IsdB) exprimé par *S. aureus* est capable de se fixer directement sur l'intégrine αIIbβ3. Une variation d'expression par les différentes souches testées de IsdB pourrait également expliquer les différents profils d'agrégation que nous avons observés.

Cette hétérogénéité de réponse des souches de *S. aureus* que nous avons observée s'inscrit plus largement dans l'hétérogénéité de virulence des souches de *S. aureus*. Dans une étude récente, Chabert et al. ont également démontré cette hétérogénéité des différentes souches de *S. aureus* testées sur l'activation plaquettaire (147). L'hétérogénéité de la virulence des souches de *S. aureus* a été clairement démontrée sur des modèles animaux. Ainsi, la capacité de différentes souches de *S. aureus* à induire des EI et des sepsis léthaux sur des lapins a été corrélée à l'expression de facteurs de virulence sécrétés dont les superantigènes et les cytolysines (dont fait partie l'alpha-toxine) (182).

De plus, Huseby et al. ont montré le rôle essentiel de la β-toxine de *S. aureus* dans son aptitude à induire une EI (183). Ainsi, les souches connues pour produire cette toxine sont mieux à même de causer des végétations que les souches KO pour la β-toxine, et toutes les souches de *S. aureus* existantes ne produisent pas la toxine (183). Enfin, la capacité réduite des souches mutantes sar-/agr- de *S. aureus* à coloniser l'endothélium cardiaque a également été démontrée par Cheung et al (184).

L'ensemble de ces données nous permet d'affirmer qu'il existe une hétérogénéité au sein même de l'espèce bactérienne de *S. aureus* et que ses souches n'ont ainsi pas la même virulence et propension à provoquer des infections majeures tels que le sepsis ou l'EI.

Cependant, l'objectif principal de notre étude était d'évaluer l'effet des différents antiplaquettaires sur la capacité pro-agrégante des bactéries testées. En effet, les végétations au décours des EI sont constituées principalement par des plaquettes, des bactéries et de la fibrine. Ainsi, l'intérêt d'un traitement par antiplaquettaire chez les patients nous semble justifié.

Les études rapportées dans la littérature sur l'effet des antiplaquettaires sur des modèles animaux d'EI se sont principalement intéressées à l'effet de l'aspirine. Nos résultats montrent une diminution significative de l'activation et de l'agrégation plaquettaires induites par les souches de *S. aureus* si les plaquettes sont au préalable traitées *in vitro* par de l'aspirine et ce quelle que soit la souche testée. Chabert et al. ont montré qu'un pré-traitement *in vitro* des plaquettes par de l'aspirine avant l'exposition à différentes souches de *S. aureus* induisait une réduction de l'activation plaquettaire ainsi qu'une amélioration du compte plaquettaire en protégeant les plaquettes de l'expression des marqueurs de mort cellulaire induite par *S. aureus* avec l'aspirine (147). L'équipe de Nicolau et al. sur un modèle lapin d'EI à *S. aureus* a mis en évidence l'efficacité de l'aspirine à travers une réduction de la taille des végétations, avec un

effet dose-dépendant (153). Cet effet serait lié à la fois à l'aspirine ainsi qu'à son métabolite, l'acide salicylique. En effet, en plus de l'acide acétylsalicylique qui inhibe la voie cyclooxygénase (COX) plaquettaire, l'acide salicylique induit une diminution d'expression du gène *fnbA* impliqué dans la liaison de *S. aureus* au fibrinogène mais aussi de l'expression de l'alpha-toxine (139). Enfin, l'aspirine réduirait également le niveau d'expression de ClfA, un autre ligand de l'intégrine αIIbβ3 (138). L'effet bénéfique de l'aspirine que nous observons sur la réduction de l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus* est donc probablement lié aux effets pléiotropiques de l'aspirine et de son métabolite à la fois sur *S. aureus* et sur les plaquettes à travers l'inhibition de la voie de la cyclo-oxygénase.

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux *in vitro* sur l'effet des inhibiteurs de P_2Y_{12}. Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser le ticagrelor, qui est actuellement la molécule de choix parmi les inhibiteurs de P_2Y_{12} puisqu'il s'agit d'un traitement sans métabolisation préalable. Nos résultats montrent que le traitement *in vitro* des plaquettes par le ticagrelor avant l'incubation avec les souches de *S. aureus*, présentant une capacité pro-agrégante, diminue de manière très significative l'agrégation induite par les souches de *S. aureus*. Dans des modèles animaux d'EI, l'intérêt de la ticlopidine puis du clopidogrel a été évalué. Une réduction de la taille des végétations a été observée en réponse à la ticlopidine, selon un mécanisme qui n'est pas dose-dépendant, mais aucun effet sur la densité bactérienne ne fut décrit (154). Le ticagrelor inhibe l'activation plaquettaire induite par l'ADP. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire que nous avons obtenue lorsque les plaquettes sont prétraitées *in vitro* par cet inhibiteur de P_2Y_{12} souligne l'importance de la voie de l'ADP lors du processus d'activation plaquettaire induit par *S. aureus*. Une seule étude dans la littérature a démontré l'intérêt des inhibiteurs de P_2Y_{12} dans un modèle d'infection à *S. aureus* Meti-R (149). Au regard de ces premiers résultats, nous devrons étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu.

De manière surprenante, nos résultats ne montrent pas de bénéfice de l'association aspirine et ticagrelor. Ces résultats sont contradictoires par rapport à ceux obtenus sur un modèle d'EI chez le lapin où l'association aspirine + ticlopidine permet une réduction supérieure de la taille des végétations (156).

Ainsi, nos résultats soulignent l'intérêt des inhibiteurs de P_2Y_{12} dans la prévention des processus d'agrégation plaquettaire dus à *S. aureus*.

Concernant *Streptococcus sanguinis*, nous avons démontré que les résultats d'agrégation et d'activation plaquettaires obtenus sont comparables quelle que soit la souche testée. Notre résultat est en contradiction avec ceux de Kerrigan et al qui distinguent plusieurs groupes de *Streptococcus sanguinis* en fonction de leur capacité à induire une agrégation (95). Notre faible effectif explique probablement que nous n'ayons pas retrouvé cette variabilité. Herzberg et al. ont montré dès 1990 l'existence pour les streptocoques oraux du groupe viridans d'une différence sur le phénotype d'adhésion/agrégation entre les souches (94). Cette même équipe avait montré sur un modèle expérimental d'EI sur des lapins, que les souches de streptocoques induisant une agrégation plaquettaire *in vitro* (agg+) étaient associées à des végétations significativement plus grosses, des manifestations cliniques plus sévères, des lésions plus sévères dans des organes majeurs et une augmentation de la mortalité, par rapport aux souches n'induisant pas d'agrégation, de phénotype « agg- » (96). Toutefois, aucune différence sur la densité de bactéries dans les végétations issues des différents phénotypes de souches n'a été mis en évidence. Nous n'avons pas retrouvé ce phénomène pour les souches de *S. sanguinis* testées.

S. sanguinis présente de multiples récepteurs capables d'induire une adhésion et une agrégation plaquettaire directe notamment via le couple GpIb et son ligand SrpA (97). Cette activation plaquettaire induite par *S. sanguinis* via la GpIb induit un relargage d'ATP et ADP ; *S. sanguinis* possède une ectoATPase capable d'hydrolyser l'ATP plaquettaire en ADP et donc ainsi de renforcer l'activation puis l'agrégation plaquettaire (98). En parallèle, cette voie d'activation plaquettaire induit un relargage de Thromboxane A2 (TXA2).

A notre connaissance, aucune étude n'a étudié *in vitro* l'effet des traitements antiplaquettaires sur l'agrégation plaquettaire induite par *S. sanguinis*. Nos résultats démontrent que l'association aspirine et inhibiteur de P_2Y_{12} permet de réduire le plus significativement l'activation et l'agrégation plaquettaire. La combinaison des deux antiplaquettaires permet d'inhiber ainsi les deux principaux médiateurs, l'ADP et le TXA2, produits lors de l'activation plaquettaire directe médiée par la GpIb.

Cependant, la réponse aux antiplaquettaires était très hétérogène en fonction des patients, mais aussi en fonction des souches puisque nous avons mis en évidence une sensibilité aux antiplaquettaires en général beaucoup plus importante pour la souche P2760 par rapport aux deux autres. Il est à souligner que cette souche semble être moins virulente car issue d'un prélèvement de pharynx et non d'une bactériémie comme c'était le cas pour la souche P8633,

qui semble quant à elle la moins sensible aux différents traitements antiplaquettaires parmi les souches de *S. sanguinis* testées.

Levison et al. en 1977 avaient étudié l'effet de l'aspirine sur un modèle lapin d'EI à *Streptococcus viridans* et n'avaient pas montré de bénéfice du traitement sur l'évolution de la végétation (151). Veloso et al. ont toutefois étudié l'association aspirine + ticlopidine dans des modèles rat d'EI à *Streptococcus gallolyticus* et *Enterococcus faecalis* et cette association était également plus efficace que chacun des traitements utilisés seuls pour réduire la taille des végétations et prévenir la survenue de l'EI (157).

L'effet des antagonistes de la voie ADP n'a pas fait l'objet de nombreuses études. Notre étude est donc la première du genre à s'intéresser à tous les agents antiplaquettaires disponibles ainsi qu'aux différences entre espèces et entre souches.

Bien que notre étude préliminaire n'a pas élucidé les mécanismes moléculaires donnant l'effet inhibiteur des antiplaquettaires sur l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries, il s'agit, à notre connaissance, de la première étude à révéler des différences importantes dans les réponses à ces médicaments entre les espèces mais aussi la souche bactérienne incriminée. Ces différences pourraient, d'une part, expliquer les résultats contradictoires d'études ultérieures prenant l'agrégation plaquettaire par les bactéries comme une notion fixe regroupant différentes espèces pour une même mesure, d'autre part, ces résultats indiquent la nécessité de prendre en considération la bactérie en question pour un traitement antiplaquettaire optimal. D'autres études expérimentales et cliniques sont nécessaires pour élucider ces effets distincts des antiplaquettaires dans la prise en charge des maladies liées à l'agrégation plaquettaire d'origine bactérienne, permettant de prescrire un traitement antiplaquettaire qui dépend du patient ainsi que de la souche bactérienne en question.

Les perspectives pour la suite de notre étude sont de réaliser un séquençage de l'ensemble de ces souches pour trouver des différences qui pourraient expliquer l'hétérogénéité retrouvée dans nos résultats, notamment au niveau de l'expression des facteurs de virulence par les bactéries. Le but final serait de pouvoir proposer une médecine personnalisée aux patients en fonction des germes responsables de leur EI.

VI- Conclusion

L'EI est une pathologie rare mais constituant un problème de santé publique car associée à une mortalité élevée, principalement liée aux complications emboliques et ce malgré les progrès de la prise en charge de cette affection.

Nous avons mis en évidence au cours de ce travail que les mécanismes d'interaction entre plaquettes et bactéries sont nombreux et impliquent un nombre important de récepteurs plaquettaires, aussi bien pour *S. aureus* que *S. sanguinis*, qui représentent actuellement les germes les plus couramment responsables de la maladie. Ces interactions plaquettes-bactéries aboutissent fréquemment à l'induction d'une activation plaquettaire suivie d'une agrégation, à l'origine des complications emboliques. De plus, il a été démontré que les bactéries capables de provoquer cette agrégation plaquettaire *in vitro* sont associées à une plus grande virulence au cours des pathologies dans lesquelles elles sont impliquées au niveau clinique.

Nos essais *in vitro* ont permis de montrer que les antiplaquettaires ont un effet favorable sur la réduction de l'activation et de l'agrégation plaquettaires induites par *S. aureus* et *S. sanguinis*. De plus, nous avons mis en évidence une efficacité différente des traitements antiplaquettaires en fonction des espèces bactériennes mais également entre les souches de *S. sanguinis.* Ces résultats confortent ceux de la littérature, qui ont déjà mis en évidence une efficacité des antiplaquettaires dans des modèles animaux d'EI mais aussi au cours d'essais cliniques, et apportent des données supplémentaires sur la spécificité de réponse en fonction des espèces et des souches bactériennes.

Notre étude permet d'envisager l'utilisation d'autres molécules que l'aspirine qui possèdent une efficacité *in vitro* supérieure à cette dernière, ainsi que l'adaptation du traitement de chaque patient en fonction de ses propres caractéristiques et de celles du pathogène incriminé dans leur maladie. Ce travail devra toutefois être approfondi avec des études expérimentales et cliniques.

VII- Références bibliographiques

1. Duval X, Delahaye F, Alla F, Tattevin P, Obadia J-F, Le Moing V, et al. Temporal Trends in Infective Endocarditis in the Context of Prophylaxis Guideline Modifications. J Am Coll Cardiol. mai 2012;59(22):1968-76.
2. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, Iung B, et al. Preeminence of Staphylococcus aureus in Infective Endocarditis: A 1-Year Population-Based Survey. Clin Infect Dis. 1 mai 2012;54(9):1230-9.
3. Bayer AS. Infective endocarditis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. sept 1993;17(3):313-20; quiz 321-2.
4. Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. FEMS Immunol Med Microbiol. juin 2006;47(1):1-13.
5. Benito N, Miró JM, de Lazzari E, Cabell CH, del Río A, Altclas J, et al. Health Care–Associated Native Valve Endocarditis in Patients with no History of Injection Drug Use: Current Importance of Non-Nosocomial Acquisition. Ann Intern Med. 5 mai 2009;150(9):586-94.
6. Federspiel JJ. Increasing US Rates of Endocarditis With Staphylococcus aureus: 1999-2008. Arch Intern Med. 27 févr 2012;172(4):363.
7. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev. juill 2015;28(3):603-61.
8. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. Circulation. 13 oct 2015;132(15):1435-86.
9. Le Moing V, Alla F, Doco-Lecompte T, Delahaye F, Piroth L, Chirouze C, et al. Staphylococcus aureus Bloodstream Infection and Endocarditis - A Prospective Cohort Study. Greub G, éditeur. PLOS ONE. 28 mai 2015;10(5):e0127385.
10. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. Staphylococcus aureus Endocarditis: A Consequence of Medical Progress. JAMA. 22 juin 2005;293(24):3012-21.
11. Asgeirsson H, Thalme A, Kristjansson M, Weiland O. Incidence and outcome of Staphylococcus aureus endocarditis—a 10-year single-centre northern European experience. Clin Microbiol Infect. août 2015;21(8):772-8.
12. Holland TL, Baddour LM, Bayer AS, Hoen B, Miro JM, Fowler VG. Infective endocarditis. Nat Rev Dis Primer. 01 2016;2:16059.
13. Bouaouina M, Halbwachs-Mecarelli L. Activation des intégrines et adhérence des leucocytes et des plaquettes. Hématologie. 1 janv 2006;12(1):21-33.
14. Werdan K, Dietz S, Löffler B, Niemann S, Bushnaq H, Silber R-E, et al. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen–host interaction and risk states. Nat Rev Cardiol. janv 2014;11(1):35-50.
15. Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. The Lancet. 10 janv 2004;363(9403):139-49.
16. Esquer Garrigos Z, Sohail MR. Attachment is the source of all suffering: delineating mechanisms of adhesion in Staphylococcus aureus endocarditis. Eur Heart J [Internet]. 17 mai 2019 [cité 29 juill 2019]; Disponible sur: https://academic.oup.com/eurheartj/advance-article/doi/10.1093/eurheartj/ehz353/5491102
17. Liesenborghs L, Meyers S, Lox M, Criel M, Claes J, Peetermans M, et al. Staphylococcus aureus endocarditis: distinct mechanisms of bacterial adhesion to damaged and inflamed heart valves. Eur Heart J. 3 mars 2019;
18. Remadi JP, Habib G, Nadji G, Brahim A, Thuny F, Casalta JP, et al. Predictors of Death and Impact of Surgery in Staphylococcus aureus Infective Endocarditis. Ann Thorac Surg. avr 2007;83(4):1295-302.
19. Sanfilippo AJ, Picard MH, Newell JB, Rosas E, Davidoff R, Thomas JD, et al. Echocardiographic assessment of patients with infectious endocarditis: Prediction of risk for complications. J Am Coll Cardiol. nov 1991;18(5):1191-9.
20. Rizzi M, Ravasio V, Carobbio A, Mattucci I, Crapis M, Stellini R, et al. Predicting the occurrence of embolic events: an analysis of 1456 episodes of infective endocarditis from the Italian Study on Endocarditis (SEI). BMC Infect Dis. 29 avr 2014;14:230.

21. Miro JM, Anguera I, Cabell CH, Chen AY, Stafford JA, Corey GR, et al. Staphylococcus aureus Native Valve Infective Endocarditis: Report of 566 Episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. :11.
22. Iung B, Tubiana S, Klein I, Messika-Zeitoun D, Brochet E, Lepage L, et al. Determinants of Cerebral Lesions in Endocarditis on Systematic Cerebral Magnetic Resonance Imaging: A Prospective Study. Stroke. nov 2013;44(11):3056-62.
23. Hubert S, Thuny F, Resseguier N, Giorgi R, Tribouilloy C, Le Dolley Y, et al. Prediction of Symptomatic Embolism in Infective Endocarditis. J Am Coll Cardiol. oct 2013;62(15):1384-92.
24. Pergola V, Salvo GD, Habib G, Avierinos J-F, Philip E, Vailloud J-M, et al. Comparison of clinical and echocardiographic characteristics of Streptococcus bovis endocarditis with that caused by other pathogens. Am J Cardiol. 15 oct 2001;88(8):871-5.
25. Steckelberg JM. Emboli in Infective Endocarditis: The Prognostic Value of Echocardiography. Ann Intern Med. 15 avr 1991;114(8):635.
26. Vilacosta I, Graupner C, SanRomán J, Sarriá C, Ronderos R, Fernández C, et al. Risk of embolization after institution of antibiotic therapy for infective endocarditis. J Am Coll Cardiol. 1 mai 2002;39(9):1489-95.
27. Di Salvo G, Habib G, Pergola V, Avierinos J-F, Philip E, Casalta J-P, et al. Echocardiography predicts embolic events in infective endocarditis. J Am Coll Cardiol. mars 2001;37(4):1069-76.
28. Heiro M, Nikoskelainen J, Engblom E, Kotilainen E, Marttila R, Kotilainen P. Neurologic Manifestations of Infective Endocarditis: A 17-Year Experience in a Teaching Hospital in Finland. Arch Intern Med. 9 oct 2000;160(18):2781-7.
29. Thuny F, Avierinos J-F, Tribouilloy C, Giorgi R, Casalta J-P, Milandre L, et al. Impact of cerebrovascular complications on mortality and neurologic outcome during infective endocarditis: a prospective multicentre study. Eur Heart J. 1 mai 2007;28(9):1155-61.
30. Yang A, Tan C, Adhikari NKJ, Daneman N, Pinto R, Haynen BKM, et al. Time-sensitive predictors of embolism in patients with left-sided endocarditis: Cohort study. PloS One. 2019;14(4):e0215924.
31. Thuny F, Disalvo G, Belliard O, Avierinos J-F, Pergola V, Rosenberg V, et al. Risk of Embolism and Death in Infective Endocarditis: Prognostic Value of Echocardiography: A Prospective Multicenter Study. Circulation. 5 juill 2005;112(1):69-75.
32. Rohmann S, Erbel R, Darius H, Makowski T, Meyer Jür. Effect of antibiotic treatment on vegetation size and complication rate in infective endocarditis. Clin Cardiol. févr 1997;20(2):132-40.
33. García-Cabrera E, Fernández-Hidalgo N, Almirante B, Ivanova-Georgieva R, Noureddine M, Plata A, et al. Neurological complications of infective endocarditis: risk factors, outcome, and impact of cardiac surgery: a multicenter observational study. Circulation. 11 juin 2013;127(23):2272-84.
34. Murdoch DR. Clinical Presentation, Etiology, and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century: The International Collaboration on Endocarditis–Prospective Cohort Study. Arch Intern Med. 9 mars 2009;169(5):463.
35. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC)Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). Eur Heart J. 21 nov 2015;36(44):3075-128.
36. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG, Ryan T, et al. Proposed Modifications to the Duke Criteria for the Diagnosis of Infective Endocarditis. Clin Infect Dis. 1 avr 2000;30(4):633-8.
37. Castillo JC. Long term outcome of infective endocarditis in patients who were not drug addicts: a 10 year study. Heart. 1 mai 2000;83(5):525-30.
38. Bayer AS, Sullam PM, Ramos M, Li C, Cheung AL, Yeaman MR. Staphylococcus aureus Induces Platelet Aggregation via a Fibrinogen-Dependent Mechanism Which Is Independent of Principal Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Fibrinogen-Binding Domains. INFECT IMMUN. 1995;63:8.
39. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. Nat Rev Microbiol. juin 2006;4(6):445-57.
40. Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, et al. Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by Staphylococcus aureus clumping factor A: Platelet activation by Staphylococcus aureus ClfA. Mol Microbiol. 30 juin 2005;57(3):804-18.
41. Kerrigan SW, Cox D. Platelet–bacterial interactions. Cell Mol Life Sci. 1 févr 2010;67(4):513-23.

42. Sullam PM, Bayer AS, Foss WM, Cheung AL. Diminished Platelet Binding In Vitro by Staphylococcus aureus Is Associated with Reduced Virulence in a Rabbit Model of Infective Endocarditis. INFECT IMMUN. 1996;64:7.
43. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin αIIbβ3. J Clin Invest. 1 déc 2005;115(12):3363-9.
44. Herrmann M, Lai QJ, Albrecht RM, Mosher DF, Proctor RA. Adhesion of Staphylococcus aureus to Surface-Bound Platelets: Role of Fibrinogen/Fibrin and Platelet Integrins. J Infect Dis. 1 févr 1993;167(2):312-22.
45. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. janv 1994;11(2):237-48.
46. Eidhin DN, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. 1998;30(2):245-57.
47. Flock JI, Fröman G, Jönsson K, Guss B, Signäs C, Nilsson B, et al. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from Staphylococcus aureus. EMBO J. août 1987;6(8):2351-7.
48. Liesenborghs L, Verhamme P, Vanassche T. *Staphylococcus aureus* , master manipulator of the human hemostatic system. J Thromb Haemost. mars 2018;16(3):441-54.
49. Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, et al. Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcgammaRIIa receptor. Mol Microbiol. janv 2006;59(1):212-30.
50. Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1 déc 2016;35(12):1923-31.
51. Liu C-Z, Huang T-F, Tsai P-J, Tsai P-J, Chang L-Y, Chang M-C. A segment of Staphylococcus aureus clumping factor A with fibrinogen-binding activity (ClfA221–550) inhibits platelet-plug formation in mice. Thromb Res. janv 2007;121(2):183-91.
52. Que Y-A, Francois P, Haefliger J-A, Entenza J-M, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the Role of Staphylococcus aureus Clumping Factor and Fibronectin-Binding Protein by Expression in Lactococcus lactis. Infect Immun. 1 oct 2001;69(10):6296-302.
53. Que Y-A, Haefliger J-A, Piroth L, François P, Widmer E, Entenza JM, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. J Exp Med. 16 mai 2005;201(10):1627-35.
54. Veloso TR, Chaouch A, Roger T, Giddey M, Vouillamoz J, Majcherczyk P, et al. Use of a Human-Like Low-Grade Bacteremia Model of Experimental Endocarditis To Study the Role of Staphylococcus aureus Adhesins and Platelet Aggregation in Early Endocarditis. Payne SM, éditeur. Infect Immun. mars 2013;81(3):697-703.
55. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, Mcdevitt D, Foster TJ, Ois PF, et al. Role of Staphylococcus aureus Coagulase and Clumping Factor in Pathogenesis of Experimental Endocarditis. INFECT IMMUN. 1995;63:6.
56. Saravia-Otten P, Müller HP, Arvidson S. Transcription of Staphylococcus aureus fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. J Bacteriol. sept 1997;179(17):5259-63.
57. Miajlovic H, Loughman A, Brennan M, Cox D, Foster TJ. Both Complement- and Fibrinogen-Dependent Mechanisms Contribute to Platelet Aggregation Mediated by Staphylococcus aureus Clumping Factor B. Infect Immun. 1 juill 2007;75(7):3335-43.
58. Entenza JM, Foster TJ, Ni Eidhin D, Vaudaux P, Francioli P, Moreillon P. Contribution of Clumping Factor B to Pathogenesis of Experimental Endocarditis due to Staphylococcus aureus. Infect Immun. sept 2000;68(9):5443-6.
59. Miajlovic H, Zapotoczna M, Geoghegan JA, Kerrigan SW, Speziale P, Foster TJ. Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of Staphylococcus aureus with the GPIIb/IIIa receptor on platelets. Microbiology. 1 mars 2010;156(3):920-8.
60. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Chabert A, Pozzetto B, Cognasse F, Garraud O. Platelets and infections - complex interactions with bacteria. Front Immunol. 2015;6:82.
61. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. J Thromb Haemost. juill 2009;7:200-5.
62. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb complex as a target for anti-thrombotic drug development. Thromb Haemost. 2008;99(3):473-9.

63. Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation: Platelets and the innate immune system. J Thromb Haemost. juin 2011;9(6):1097-107.
64. O'Seaghdha M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, Cox D, et al. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions: Molecular analysis of protein A-vWF interaction. FEBS J. nov 2006;273(21):4831-41.
65. Hamad OA, Nilsson PH, Wouters D, Lambris JD, Ekdahl KN, Nilsson B. Complement Component C3 Binds to Activated Normal Platelets without Preceding Proteolytic Activation and Promotes Binding to Complement Receptor 1. J Immunol. 1 mars 2010;184(5):2686-92.
66. Verschoor A, Langer HF. Crosstalk between platelets and the complement system in immune protection and disease. Thromb Haemost. 2013;110(11):910-9.
67. Peerschke EI, Yin W, Ghebrehiwet B. Complement activation on platelets: Implications for vascular inflammation and thrombosis. Mol Immunol. août 2010;47(13):2170-5.
68. Peerschke EIB, Bayer AS, Ghebrehiwet B, Xiong YQ. gC1qR/p33 Blockade Reduces Staphylococcus aureus Colonization of Target Tissues in an Animal Model of Infective Endocarditis. Infect Immun. 1 août 2006;74(8):4418-23.
69. Kerrigan SW, Clarke N, Loughman A, Meade G, Foster TJ, Cox D. Molecular Basis for *Staphylococcus aureus* –Mediated Platelet Aggregate Formation Under Arterial Shear In Vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol. févr 2008;28(2):335-40.
70. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of Fc RIIa as the ITAM-bearing receptor mediating IIb 3 outside-in integrin signaling in human platelets. Blood. 1 oct 2008;112(7):2780-6.
71. Worth RG, Chien CD, Chien P, Reilly MP, McKenzie SE, Schreiber AD. Platelet FcγRIIA binds and internalizes IgG-containing complexes. Exp Hematol. nov 2006;34(11):1490-5.
72. O´Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penadés J, Litt D, et al. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A: Multiple mechanisms for stimulating platelet aggregation in S. aureus. Mol Microbiol. 9 mai 2002;44(4):1033-44.
73. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. Microbiol Rev. déc 1991;55(4):733-51.
74. Kerrigan S, Cox D. The Effect of Bacterial Toxins on Platelet Function. In: Kini RM, Clemetson KJ, Markland FS, McLane MA, Morita T, éditeurs. Toxins and Hemostasis [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010 [cité 1 août 2019]. p. 637-51. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-9295-3_36
75. Arvand M, Bhakdi S, Dahlbäck B, Preissner KT. Staphylococcus aureus alpha-toxin attack on human platelets promotes assembly of the prothrombinase complex. J Biol Chem. 25 août 1990;265(24):14377-81.
76. White JG, Rao GHR. Effects of the lonophore A23187 on Blood Platelets. 1974;77(2):16.
77. Powers ME, Becker REN, Sailer A, Turner JR, Bubeck Wardenburg J. Synergistic Action of Staphylococcus aureus α-Toxin on Platelets and Myeloid Lineage Cells Contributes to Lethal Sepsis. Cell Host Microbe. 10 juin 2015;17(6):775-87.
78. Parimon T, Li Z, Bolz DD, McIndoo ER, Bayer CR, Stevens DL, et al. Staphylococcus aureus α-hemolysin promotes platelet-neutrophil aggregate formation. J Infect Dis. 1 sept 2013;208(5):761-70.
79. Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens. Cell Mol Life Sci. févr 2010;67(4):525-44.
80. Bayer AS, Ramos MD, Menzies BE, Yeaman MR, Shen AJ, Cheung AL. Hyperproduction of Alpha-Toxin by Staphylococcus aureus Results in Paradoxically Reduced Virulence in Experimental Endocarditis: a Host Defense Role for Platelet Microbicidal Proteins. INFECT IMMUN. 1997;65:9.
81. Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunol Rev. oct 2008;225(1):226-43.
82. De Haas CJC, Weeterings C, Vughs MM, De Groot PG, Van Strijp JA, Lisman T. Staphylococcal superantigen-like 5 activates platelets and supports platelet adhesion under flow conditions, which involves glycoprotein IbÎ± and Î± $_{IIb}$ Î² $_{3}$. J Thromb Haemost. nov 2009;7(11):1867-74.
83. Siboo IR, Chambers HF, Sullam PM. Role of SraP, a Serine-Rich Surface Protein of Staphylococcus aureus, in Binding to Human Platelets. Infect Immun. 1 avr 2005;73(4):2273-80.
84. Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB. Staphylococcus aureus Protein A Recognizes Platelet gC1qR/p33: a Novel Mechanism for Staphylococcal Interactions with Platelets. Infect Immun. 1 avr 2000;68(4):2061-8.

85. Vanassche T, Kauskot A, Verhaegen J, Peetermans WE, Ryn J van, Schneewind O, et al. Fibrin formation by staphylothrombin facilitates Staphylococcus aureus-induced platelet aggregation. Thromb Haemost. juin 2012;107(6):1107-21.
86. Claes J, Liesenborghs L, Peetermans M, Veloso TR, Missiakas D, Schneewind O, et al. Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor Staphylococcus aureus to the vessel wall. J Thromb Haemost JTH. mai 2017;15(5):1009-19.
87. Higgins J, Loughman A, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Foster TJ. Clumping factor A of Staphylococcus aureus inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. FEMS Microbiol Lett. mai 2006;258(2):290-6.
88. Lijnen HR, Hoef BV, Cock FD, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, et al. On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. J Biol Chem. 25 juin 1991;266(18):11826-32.
89. Harraghy N. sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. Microbiology. 1 juin 2005;151(6):1789-800.
90. Chien Y, Manna AC, Cheung AL. SarA level is a determinant of agr activation in Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. 1998;30(5):991-1001.
91. Cheung AL, Koomey JM, Butler CA, Projan SJ, Fischetti VA. Regulation of exoprotein expression in Staphylococcus aureus by a locus (sar) distinct from agr. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 juill 1992;89(14):6462-6.
92. Waller AK, Sage T, Kumar C, Carr T, Gibbins JM, Clarke SR. Staphylococcus aureus Lipoteichoic Acid Inhibits Platelet Activation and Thrombus Formation via the Paf Receptor. J Infect Dis. 15 déc 2013;208(12):2046-57.
93. Shannon O, Uekötter A, Flock J-I. Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus as an antiplatelet agent in vivo. Thromb Haemost. 2005;93(5):927-31.
94. Herzberg MC, Gong K, Macfarlane GD, Erickson PR, Soberay AH, Krebsbach PH, et al. Phenotypic Characterization of Streptococcus sanguis Virulence Factors Associated with Bacterial Endocarditis. INFECT IMMUN. 1990;58:8.
95. Kerrigan SW. A role for glycoprotein Ib in Streptococcus sanguis-induced platelet aggregation. Blood. 28 juin 2002;100(2):509-16.
96. Herzberg MC, Gong K, Armstrong NN, Witt AR, Erickson PR, Meyer MW. The Platelet Interactivity Phenotype of Streptococcus sanguis Influences the Course of Experimental Endocarditis. 1992;60:10.
97. Plummer C, Wu H, Kerrigan SW, Meade G, Cox D, Ian Douglas CW. A serine-rich glycoprotein of Streptococcus sanguis mediates adhesion to platelets via GPIb. Br J Haematol. avr 2005;129(1):101-9.
98. Herzberg MC, Krishnan LK, MacFarlane GD. Involvement of α2-Adrenoreceptors and G Proteins in the Modulation of Platelet Secretion in Response to Streptococcus sanguis. Crit Rev Oral Biol Med. avr 1993;4(3):435-42.
99. Ford I, Douglas CWI, Heath J, Rees C, Preston FE. Evidence for the involvement of complement proteins in platelet aggregation by *Streptococcus sanguis* NCTC 7863. Br J Haematol. sept 1996;94(4):729-39.
100. Ford I, Douglas CWI, Cox D, Rees DGC, Heath J, Preston FE. The role of immunoglobulin G and fibrinogen in platelet aggregation by *Streptococcus sanguis*. Br J Haematol. juin 1997;97(4):737-7446.
101. Pampolina C, McNicol A. Streptococcus sanguis-induced platelet activation involves two waves of tyrosine phosphorylation mediated by FcγRIIA and αIIbβ3. Thromb Haemost. 2005;93(05):932-9.
102. Arman M, Krauel K, Tilley DO, Weber C, Cox D, Greinacher A, et al. Amplification of bacteria-induced platelet activation is triggered by FcγRIIA, integrin αIIbβ3, and platelet factor 4. Blood. 15 mai 2014;123(20):3166-74.
103. Krauel K, Weber C, Brandt S, Zahringer U, Mamat U, Greinacher A, et al. Platelet factor 4 binding to lipid A of Gram-negative bacteria exposes PF4/heparin-like epitopes. Blood. 18 oct 2012;120(16):3345-52.
104. Sullam PM, Hyun WC, Szöllösi J, Dong J, Foss WM, López JA. Physical Proximity and Functional Interplay of the Glycoprotein Ib-IX-V Complex and the Fc Receptor FcγRIIA on the Platelet Plasma Membrane. J Biol Chem. 27 févr 1998;273(9):5331-6.
105. Mcnicol A, Agpalza A, Jackson ECG, Hamzeh-Cognasse H, Garraud O, Cognasse F. Streptococcus sanguinis-induced cytokine release from platelets: Platelet activation by S. sanguinis and epinephrine. J Thromb Haemost. oct 2011;9(10):2038-49.
106. Abdulrehman AY, Jackson ECG, McNicol A. Platelet activation by Streptococcus sanguinis is accompanied by MAP kinase phosphorylation. Platelets. 1 févr 2013;24(1):6-14.

107. Erickson PR, Herzberg MC. Purification and partial characterization of a 65-kDa platelet aggregation-associated protein antigen from the surface of Streptococcus sanguis. J Biol Chem. 25 août 1990;265(24):14080-7.
108. Erickson PR, Herzberg MC. The Streptococcus sanguis platelet aggregation-associated protein. Identification and characterization of the minimal platelet-interactive domain. J Biol Chem. 25 janv 1993;268(3):1646-9.
109. Herzberg MC, Nobbs A, Tao L, Kilic A, Beckman E, Khammanivong A, et al. Oral Streptococci and Cardiovascular Disease: Searching for the Platelet Aggregation-Associated Protein Gene and Mechanisms of *Streptococcus sanguis* -Induced Thrombosis. J Periodontol. nov 2005;76(11-s):2101-5.
110. Herzberg MC. Platelet-Streptococcal Interactions in Endocarditis. Crit Rev Oral Biol Med. juill 1996;7(3):222-36.
111. Flad H-D, Brandt E. Platelet-derived chemokines: pathophysiology and therapeutic aspects. Cell Mol Life Sci. 1 juill 2010;67(14):2363-86.
112. Fan J, Zhang Y, Chuang-Smith ON, Frank KL, Guenther BD, Kern M, et al. Ecto-5′-Nucleotidase: A Candidate Virulence Factor in Streptococcus sanguinis Experimental Endocarditis. Beall B, éditeur. PLoS ONE. 7 juin 2012;7(6):e38059.
113. Moine OL, Stordeur P, Schandené L, Marchant A, Groote D de, Goldman M, et al. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. J Immunol. 1 juin 1996;156(11):4408-14.
114. Mercier R-C, Dietz RM, Mazzola JL, Bayer AS, Yeaman MR. Beneficial Influence of Platelets on Antibiotic Efficacy in an In Vitro Model of Staphylococcus aureus-Induced Endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 1 juill 2004;48(7):2551-7.
115. Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. Genome Biol. 2002;3(8):reviews3011.1-reviews3011.6.
116. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. Immunol Cell Biol. avr 2005;83(2):196-8.
117. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, et al. Lipopolysaccharide Stimulates Platelet Secretion and Potentiates Platelet Aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-Dependent Protein Kinase Pathway. J Immunol. 15 juin 2009;182(12):7997-8004.
118. Ståhl A, Sartz L, Nelsson A, Békássy ZD, Karpman D. Shiga Toxin and Lipopolysaccharide Induce Platelet-Leukocyte Aggregates and Tissue Factor Release, a Thrombotic Mechanism in Hemolytic Uremic Syndrome. Bereswill S, éditeur. PLoS ONE. 11 sept 2009;4(9):e6990.
119. Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MKB, et al. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. Thromb Haemost. oct 2005;94(4):831-8.
120. Hashimoto K, Jayachandran M, Owen WG, Miller VM. Aggregation and Microparticle Production Through Toll-like Receptor 4 Activation in Platelets From Recently Menopausal Women. J Cardiovasc Pharmacol. juill 2009;54(1):57-62.
121. Sheu JR, Lee CR, Lin CH, Hsiao G, Ko WC, Chen YC, et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Staphylococcus aureus lipoteichoic acid in human platelets. Thromb Haemost. mai 2000;83(5):777-84.
122. Huang Z-Y, Chien P, Indik ZK, Schreiber AD. Human platelet FcγRIIA and phagocytes in immune-complex clearance. Mol Immunol. janv 2011;48(4):691-6.
123. Assinger A, Laky M, Schabbauer G, Hirschl AM, Buchberger E, Binder BR, et al. Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2: Plasma and platelets enhance clearance of bacteria. J Thromb Haemost. avr 2011;9(4):799-809.
124. Youssefian T. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. Blood. 13 mai 2002;99(11):4021-9.
125. Clawson CC. Platelet Interaction with Bacteria. 1973;70(3):24.
126. Clawson CC, Rao GHR, White JG. Platelet Interaction With Bacteria. 1975;81(2):10.
127. Clawson CC, White JG. Platelet Interaction With Bacteria. 1980;98(1):15.
128. Johansson D, Shannon O, Rasmussen M. Platelet and Neutrophil Responses to Gram Positive Pathogens in Patients with Bacteremic Infection. Bereswill S, éditeur. PLoS ONE. 29 nov 2011;6(11):e26928.
129. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, et al. Novel Anti-bacterial Activities of β-defensin 1 in Human Platelets: Suppression of Pathogen Growth and Signaling of Neutrophil

Extracellular Trap Formation. PLoS Pathog [Internet]. 10 nov 2011 [cité 14 août 2019];7(11). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3213094/

130. Mercier R-C, Rybak MJ, Bayer AS, Yeaman MR. Influence of Platelets and Platelet Microbicidal Protein Susceptibility on the Fate of Staphylococcus aureus in an In Vitro Model of Infective Endocarditis. Infect Immun. 1 août 2000;68(8):4699-705.
131. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. Clin Immunol. 1 avr 2010;135(1):1-11.
132. Yeaman MR, Tang Y-Q, Shen AJ, Bayer AS, Selsted ME. Purification and In Vitro Activities of Rabbit Platelet Microbicidal Proteins. INFECT IMMUN. 1997;65:9.
133. Dhawan VK, Yeaman MR, Cheung AL, Kim E, Sullam PM, Bayer AS. Phenotypic Resistance to Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein In Vitro Is Correlated with Enhanced Virulence in Experimental Endocarditis Due to Staphylococcus aureus. INFECT IMMUN. 1997;65:7.
134. Yeaman MR, Norman DC, Bayer AS. Staphylococcus aureus susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is independent of platelet adherence and aggregation in vitro. Infect Immun. juin 1992;60(6):2368-74.
135. Kupferwasser LI, Yeaman MR, Shapiro SM, Nast CC, Bayer AS. In Vitro Susceptibility to Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein Is Associated With Reduced Disease Progression and Complication Rates in Experimental ***Staphylococcus aureus*** Endocarditis: Microbiological, Histopathologic, and Echocardiographic Analyses. Circulation. 12 févr 2002;105(6):746-52.
136. Sullam PM, Frank U, Yeaman MR, Tauber MG, Bayer AS, Chambers HF. Effect of Thrombocytopenia on the Early Course of Streptococcal Endocarditis. J Infect Dis. 1 oct 1993;168(4):910-4.
137. Polonio RE, Mermel LA, Paquette GE, Sperry JF. Eradication of Biofilm-Forming Staphylococcus epidermidis (RP62A) by a Combination of Sodium Salicylate and Vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 1 nov 2001;45(11):3262-6.
138. Kupferwasser LI, Yeaman MR, Nast CC, Kupferwasser D, Xiong Y-Q, Palma M, et al. Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in Staphylococcus aureus. J Clin Invest. 15 juill 2003;112(2):222-33.
139. Palma M, Bayer A, Kupferwasser LI, Joska T, Yeaman MR, Cheung A. Salicylic Acid Activates Sigma Factor B by rsbU-Dependent and -Independent Mechanisms. J Bacteriol. août 2006;188(16):5896-903.
140. Gertz S, Engelmann S, Schmid R, Ziebandt A-K, Tischer K, Scharf C, et al. Characterization of the çB Regulon in Staphylococcus aureus. J Bacteriol. déc 2000;182(24):6983-91.
141. Karlsson A, Arvidson S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of Staphylococcus aureus due to different levels of expression of the protease repressor sarA. Infect Immun. août 2002;70(8):4239-46.
142. Farber BF, Wolff AG. The Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs to Prevent Adherence of Staphylococcus epidermidis to Medical Polymers. J Infect Dis. 1 oct 1992;166(4):861-5.
143. Domenico P, Schwartz S, Cunha BA. Reduction of Capsular Polysaccharide Production in Klebsiella pneumoniae by Sodium Salicylate. INFECT IMMUN. 1989;57:5.
144. Alvarez LP, Barbagelata MS, Gordiola M, Cheung AL, Sordelli DO, Buzzola FR. Salicylic Acid Diminishes Staphylococcus aureus Capsular Polysaccharide Type 5 Expression. Infect Immun. 1 mars 2010;78(3):1339-44.
145. Kupferwasser LI, Yeaman MR, Shapiro SM, Nast CC, Sullam PM, Filler SG, et al. Acetylsalicylic Acid Reduces Vegetation Bacterial Density, Hematogenous Bacterial Dissemination, and Frequency of Embolic Events in Experimental *Staphylococcus aureus* Endocarditis Through Antiplatelet and Antibacterial Effects. Circulation. juin 1999;99(21):2791-7.
146. Dotto C, Lombarte Serrat A, Cattelan N, Barbagelata MS, Yantorno OM, Sordelli DO, et al. The Active Component of Aspirin, Salicylic Acid, Promotes Staphylococcus aureus Biofilm Formation in a PIA-dependent Manner. Front Microbiol [Internet]. 23 janv 2017 [cité 10 avr 2019];8. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00004/full
147. Chabert A, Damien P, Verhoeven PO, Grattard F, Berthelot P, Zeni F, et al. Acetylsalicylic acid differentially limits the activation and expression of cell death markers in human platelets exposed to Staphylococcus aureus strains. Sci Rep. déc 2017;7(1):5610.

148. Chan EWL, Yee ZY, Raja I, Yap JKY. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Glob Antimicrob Resist. sept 2017;10:70-4.
149. Farha MA, Leung A, Sewell EW, D'Elia MA, Allison SE, Ejim L, et al. Inhibition of WTA Synthesis Blocks the Cooperative Action of PBPs and Sensitizes MRSA to β-Lactams. ACS Chem Biol. 18 janv 2013;8(1):226-33.
150. Alsharif KF, Thomas MR, Judge HM, Khan H, Prince LR, Sabroe I, et al. Ticagrelor potentiates adenosine-induced stimulation of neutrophil chemotaxis and phagocytosis. Vascul Pharmacol. août 2015;71:201-7.
151. Levison ME, Carrizosa J, Tanphaichitra D, Schick PK, Rubin W. Effect of aspirin on thrombogenesis and on production of experimental aortic valvular Streptococcus viridans endocarditis in rabbits. Blood. avr 1977;49(4):645-50.
152. Nicolau DP, Freeman CD, Nightingale CH, Quintiliani R, Coe CJ, Maderazo EG, et al. Reduction of bacterial titers by low-dose aspirin in experimental aortic valve endocarditis. Infect Immun. avr 1993;61(4):1593-5.
153. Nicolau DP, Marangos MN, Nightingale CH, Quintiliani R. Influence of aspirin on development and treatment of experimental Staphylococcus aureus endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 1 août 1995;39(8):1748-51.
154. Nicolau DP, Tessier PR, Nightingale CH, Quintiliani R. Influence of ticlopidine on the development of experimental Staphylococcus aureus endocarditis. Int J Antimicrob Agents. oct 1996;7(4):271-4.
155. Nicolau DP, Tessier PR, Nightingale CH, Quintiliani R. Influence of adjunctive ticlopidine on the treatment of experimental Staphylococcus aureus endocarditis. Int J Antimicrob Agents. févr 1998;9(4):227-9.
156. Nicolau DP, Tessier PR, Nightingale CH. Beneficial effect of combination antiplatelet therapy on the development of experimental Staphylococcus aureus endocarditis. Int J Antimicrob Agents. févr 1999;11(2):159-61.
157. Veloso TR, Oechslin F, Que Y-A, Moreillon P, Entenza JM, Mancini S. Aspirin plus ticlopidine prevented experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus gallolyticus*. Oswald E, éditeur. Pathog Dis. nov 2015;73(8):ftv060.
158. Veloso TR, Que Y-A, Chaouch A, Giddey M, Vouillamoz J, Rousson V, et al. Prophylaxis of Experimental Endocarditis With Antiplatelet and Antithrombin Agents: A Role for Long-term Prevention of Infective Endocarditis in Humans? J Infect Dis. 1 janv 2015;211(1):72-9.
159. Vanassche T, Verhaegen J, Peetermans WE, Ryn JV, Cheng A, Schneewind O, et al. Inhibition of staphylothrombin by dabigatran reduces Staphylococcus aureus virulence. J Thromb Haemost. 2011;9(12):2436-46.
160. Lerche CJ, Christophersen LJ, Goetze JP, Nielsen PR, Thomsen K, Enevold C, et al. Adjunctive dabigatran therapy improves outcome of experimental left-sided Staphylococcus aureus endocarditis. PLoS ONE [Internet]. 19 avr 2019 [cité 17 août 2019];14(4). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6474597/
161. Taha TH, Durrant SS, Mazeika PK, Nihoyannopoulos P, Oakley CM. Aspirin to prevent growth of vegetations and cerebral emboli in infective endocarditis. J Intern Med. mai 1992;231(5):543-6.
162. Chan K-L, Dumesnil JG, Cujec B, Sanfilippo AJ, Jue J, Turek MA, et al. A randomized trial of aspirin on the risk of embolic events in patients with infective endocarditis. J Am Coll Cardiol. 3 sept 2003;42(5):775-80.
163. Chan K-L, Tam J, Dumesnil JG, Cujec B, Sanfilippo AJ, Jue J, et al. Effect of Long-Term Aspirin Use on Embolic Events in Infective Endocarditis. Clin Infect Dis. 1 janv 2008;46(1):37-41.
164. Anavekar NS, Tleyjeh IM, Anavekar NS, Mirzoyev Z, Steckelberg JM, Haddad C, et al. Impact of Prior Antiplatelet Therapy on Risk of Embolism in Infective Endocarditis. Clin Infect Dis. 1 mai 2007;44(9):1180-6.
165. Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, et al. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance: Aspirin resistance. J Thromb Haemost. 9 juin 2005;3(6):1309-11.
166. Sedlacek M, Gemery JM, Cheung AL, Bayer AS, Remillard BD. Aspirin Treatment Is Associated With a Significantly Decreased Risk of Staphylococcus aureus Bacteremia in Hemodialysis Patients With Tunneled Catheters. Am J Kidney Dis. 1 mars 2007;49(3):401-8.

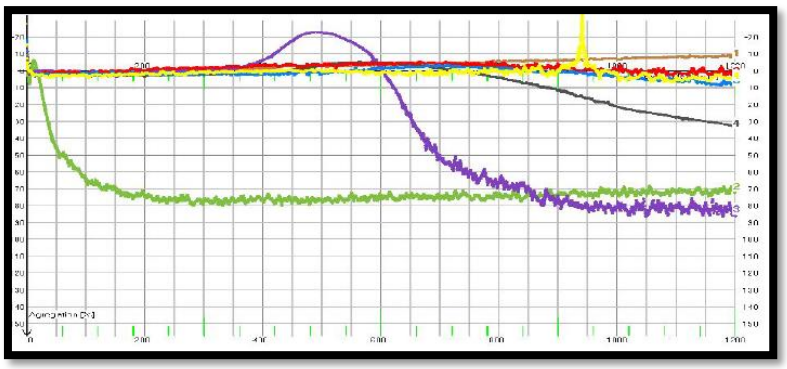
167. Pepin J, Tremblay V, Bechard D, Rodier F, Walker C, Dufresne D, et al. Chronic antiplatelet therapy and mortality among patients with infective endocarditis. Clin Microbiol Infect. févr 2009;15(2):193-9.
168. Eisen DP, Corey GR, McBryde ES, Fowler VG, Miro JM, Cabell CH, et al. Reduced valve replacement surgery and complication rate in Staphylococcus aureus endocarditis patients receiving acetyl-salicylic acid. J Infect. mai 2009;58(5):332-8.
169. Anavekar NS, Schultz JC, De Sa DDC, Thomas JM, Lahr BD, Tleyjeh IM, et al. Modifiers of Symptomatic Embolic Risk in Infective Endocarditis. Mayo Clin Proc. nov 2011;86(11):1068-74.
170. Serebruany VL, Miller M, Pokov AN, Malinin AI, Lowry DR, Tanguay J-F, et al. Effect of Statins on Platelet PAR-1 Thrombin Receptor in Patients With the Metabolic Syndrome (From the PAR-1 Inhibition by Statins [PARIS] Study). Am J Cardiol. mai 2006;97(9):1332-6.
171. Tleyjeh IM, Kashour T, Hakim FA, Zimmerman VA, Erwin PJ, Sutton AJ, et al. Statins for the Prevention and Treatment of Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. Arch Intern Med. 12 oct 2009;169(18):1658-67.
172. Pruefer D, Makowski J, Schnell M, Buerke U, Dahm M, Oelert H, et al. Simvastatin Inhibits Inflammatory Properties of *Staphylococcus aureus* α-Toxin. Circulation. 15 oct 2002;106(16):2104-10.
173. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability by Rho GTPase. J Biol Chem. 11 sept 1998;273(37):24266-71.
174. Tsai M-J, Ou S-M, Shih C-J, Chao P, Wang L-F, Shih Y-N, et al. Association of prior antiplatelet agents with mortality in sepsis patients: a nationwide population-based cohort study. Intensive Care Med. 1 mai 2015;41(5):806-13.
175. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. J Thromb Haemost. juin 2013;11(6):1183-9.
176. Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. Future Microbiol. nov 2010;5(11):1733-54.
177. Ford I, Douglas CWI, Preston FE, Lawless A, Hampton KK. Mechanisms of platelet aggregation by Streptococcus sanguis, a causative organism in infective endocarditis. Br J Haematol. mai 1993;84(1):95-100.
178. Laudy AE, Mrowka A, Krajewska J, Tyski S. The Influence of Efflux Pump Inhibitors on the Activity of Non-Antibiotic NSAIDS against Gram-Negative Rods. PLoS ONE [Internet]. 15 janv 2016 [cité 21 août 2019];11(1). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4714910/
179. Söderlund F, Asztély A-K, Jeppsson A, Nylander S, Berggren A, Nelander K, et al. In vitro anti-platelet potency of ticagrelor in blood samples from infants and children. Thromb Res. sept 2015;136(3):620-4.
180. Ciborowski M, Tomasiak M, Rusak T, Winnicka K, Dobrzycki S. The in-vitro effect of tirofiban, glycoprotein IIb/IIIa antagonist, on various responses of porcine blood platelets. Blood Coagul Fibrinolysis. sept 2008;19(6):557-67.
181. Chia J-S, Lin Y-L, Lien H-T, Chen J-Y. Platelet Aggregation Induced by Serotype Polysaccharides from Streptococcus mutans. Infect Immun. mai 2004;72(5):2605-17.
182. Spaulding AR, Satterwhite EA, Lin Y-C, Chuang-Smith ON, Frank KL, Merriman JA, et al. Comparison of Staphylococcus aureus strains for ability to cause infective endocarditis and lethal sepsis in rabbits. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2012 [cité 29 juill 2019];2. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00018/abstract
183. Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. Proc Natl Acad Sci U S A. 10 août 2010;107(32):14407-12.
184. Cheung AL, Projan SJ. Cloning and sequencing of sarA of Staphylococcus aureus, a gene required for the expression of agr. J Bacteriol. juill 1994;176(13):4168-72.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques des patients infectés par les différentes souches responsables d'EI.

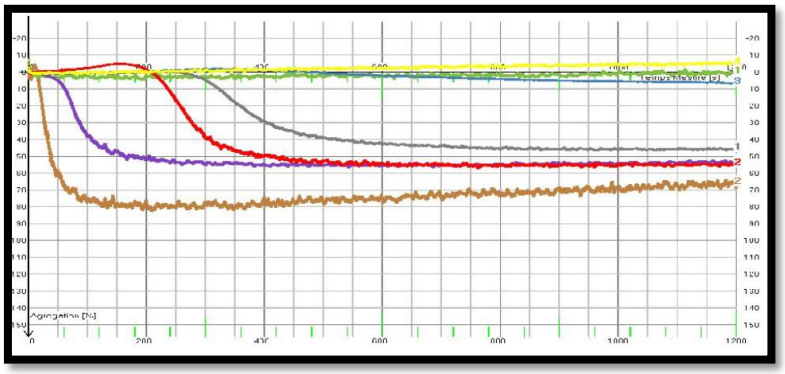
Souche	Sexe	Age	Antécédents	Traitement antiplaquettaire	Site de l'EI	Sensibilité ATB	Taille végétations	Complications emboliques	Evolution
SA P6142	INFORMATIONS NON OBTENUES								
SA P6207	H	82	Cardiopathie ischémique Dyslipidémie Diabète type 2	Plavix	Sonde PMI double chambre implantée	Méti S	20 mm polylobée	Emboles pulmonaires + spondylodiscite	Favorable (extraction de la sonde)
SA P6175	F	78	Adénome hypophysaire opéré	Non	Valve mitrale native	Méti S	17/11 mm	Abcès splénique, emboles rénaux et abcès cérébraux avec remaniements hémorragiques modérés	Favorable
SA P6141	H	35	Toxicomanie IV	Non	Bioprothèse mitrale	Méti R	0 mm (identification précoce)	Magma végétant au niveau de la bioprothèse à J7 + Emboles septiques	Favorable

Annexe 2 : Graphe d'agrégation plaquettaire de *S. aureus* P6142



	Conditions	% Max Agrégation	Pente (% min)
	TRAP 20 µM	78.03	100.68
	NaCl	1.07	0.77
	S. aureus	84.40	42.66
	SA + Aspirine	32.33	7.93
	SA + Ticagrelor	1.85	8.04
	SA + Aspirine + Ticagrelor	8.07	10.22
	SA +Tirofiban	5.87	50.94

Annexe 3 : Graphe d'agrégation plaquettaire de *S. sanguinis* P2760



	Conditions	% Max Agrégation	Pente (% min)
	TRAP 20 µM	80,08	136,41
	NaCl	3,75	9,59
	S. sanguinis	55,56	52,7
	SS + Aspirine	45,94	18,48
	SS + Ticagrelor	55,69	31,21
	SS + Aspirine + Ticagrelor	6,46	2,21
	SS +Tirofiban	0,57	2,54

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *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 respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Résumé

Les complications emboliques au décours de l'endocardite infectieuse (EI) sont liées à la présence de végétations. Ces végétations sont principalement constituées de bactéries, de fibrine et de cellules sanguines notamment des plaquettes. En raison du rôle majeur des plaquettes dans la genèse des complications emboliques, l'administration d'antiplaquettaires au décours de ces pathologies présente un intérêt. Toutefois, il existe peu d'études *in vitro* qui se sont intéressées à l'effet des différentes classes d'antiplaquettaires en fonction des espèces et des souches bactériennes.

L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet des antiplaquettaires sur l'agrégation et l'activation plaquettaire induite par les interactions Plaquettes-Bactéries, en fonction des espèces et des souches bactériennes de *S. aureus* et *S. sanguinis* en utilisant en parallèle une approche fonctionnelle par agrégométrie et une approche phénotypique par cytométrie de flux.

Des plasmas riches en plaquettes (PRP) obtenus à partir de prélèvements de 80 donneurs sains, traités par différents antiplaquettaires : aspirine (2mM), ticagrelor (10µM) seuls ou en association, et tirofiban (5µM) ont été incubés en présence de 3 souches de *S. aureus* (10^9 CFU/ml) ou de *S. sanguinis* (3*10^9 CFU/ml). L'agrégation plaquettaire a été évaluée sur un agrégomètre de type APACT 4004 (LABiTec). L'analyse de l'activation plaquettaire, évaluée par la mesure de l'expression de la P-Sélectine, a été réalisée sur un cytomètre FC 500 (Beckman Coulter).

L'activation et l'agrégation plaquettaires sont variables en fonction des souches de *S. aureus* testées. *S. sanguinis* induit une activation et agrégation plaquettaires comparables quelle que soit la souche testée. La diminution de l'activation et de l'agrégation plaquettaires est la plus significative si les plaquettes sont prétraitées par du ticagrelor en présence de *S. aureus* ($p<0.05$), et par l'association aspirine + ticagrelor en présence de *S. sanguinis* ($p<0.05$).

Nos résultats ont donc montré que l'agrégation plaquettaire induite par les bactéries est variable en fonction de l'espèce mais aussi en fonction des souches pour *S. aureus*. Il existe une réponse différente aux traitements antiplaquettaires en fonction des espèces. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats, et un séquençage des souches doit être réalisé pour comprendre les différences qui pourraient expliquer nos résultats.

Mots-clés : Antiplaquettaires – Plaquettes – Bactéries