



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 5218](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/5218)

To cite this version :

Collomb, Aurélia. *Caractérisation de la différence de sensibilité à l'infection par staphylococcus aureus de deux lignées de souris.*
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2011, 69 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

CARACTÉRISATION DE LA DIFFÉRENCE DE SENSIBILITÉ À L'INFECTION PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE DEUX LIGNÉES DE SOURIS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

COLLOMB Aurélia
Née, le 5 janvier 1987 à TOULOUSE (31)

Directeur de thèse : Mme Séverine BOULLIER

JURY

PRESIDENT :
M. Bettina COUDERC

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Séverine BOULLIER
M. Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^oCLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2^oCLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A la présidente de thèse

Madame le Professeur Bettina COUDERC

Professeur des universités

Praticien hospitalier

Médecin biologiste

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux

Au jury de thèse

Madame le Docteur Séverine BOULLIER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie générale et médicale

Pour m'avoir proposé ce sujet, pour m'avoir aidée et soutenue dans la réalisation de ce travail, veuillez accepter mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse,

Sincères remerciements

A mes parents, pour m'avoir soutenue, hébergée, nourrie, assistée, et supportée pendant toutes ces années d'études.... et les précédentes. Une mention particulière pour le travail de relecture de ma mère qui a lu et relu cette thèse dont le sens lui échappait au moins partiellement (sinon plus).

A ma sœur pour m'avoir supportée pendant toutes ces années, même si la cohabitation n'a pas toujours été facile, et pour son expertise en anglais (voire en français) qui m'a bien aidée au cours de mes études.

A mon grand-père qui a toujours fait part de son intérêt pour mes différents travaux et sans qui je n'aurais peut-être jamais eu le concours d'entrée à l'école vétérinaire (sans son aide pour mon travail de géologie sur la faille du Rouergue). Tu es malheureusement parti un peu trop tôt pour voir l'aboutissement de cette thèse mais je pense à toi et te remercie pour toute ton aide et ton amour.

A ma grand-mère qui me soutient encore et toujours même si les chevaux, les vaches, les souris et autres sales bêtes sont loin d'être sa passion. Merci pour tout.

A Cyril pour tout son amour, son soutien et sa patience au quotidien.

A mon Ninou qui, malgré son sale caractère de poney, a toujours été de très bonne compagnie, et qui malgré ses performances plus qu'aléatoires m'a permis de m'amuser pendant ces 4 années d'école.

A Elodie et Emma, avec qui j'ai tout fait, ou presque, et qui depuis le lycée me font rire et me soutiennent. Malgré nos orientations différentes et les kilomètres qui nous séparent aujourd'hui merci d'être toujours là pour moi.

A tous mes amis de l'école ou non et ces dizaines de soirées, où le sens du ridicule n'a jamais existé, plus folles les unes que les autres mais toujours aussi drôles.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	14
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1. Classification	15
2. Caractéristiques physiologiques	15
3. Structure.....	16
a. La paroi cellulaire.....	16
b. La capsule.....	17
c. Le génome	17
4. Facteurs de virulence	17
a. Protéines de surfaces	17
b. Les protéines sécrétées	18
5. Régulation de la virulence	19
6. Staphylocoque et résistance aux antibiotiques.....	19
a. Historique de la résistance	19
b. La résistance bactérienne.....	20
c. Pression de sélection et résistance	22
7. Relation entre virulence et acquisition de résistance aux antibiotiques.....	22
II. <i>Infection à S. aureus</i>	24
1. Epidémiologie.....	24
a. Source.....	24
b. Les infections acquises à l'hôpital et en société, deux entités épidémiologiques...	24
c. Prévalence de S. aureus	25
2. Transmission.....	25

a. Mode de transmission.....	25
b. Facteurs de risque	26
3. Les infections à <i>S. aureus</i>	26
a. Les différents types d'infections à <i>S. aureus</i>	26
b. Mécanisme d'invasion tissulaire et de dissémination.....	27
4. Réponse de l'hôte à l'infection	28
<i>III. Immunité Antibactérienne</i>	29
1. Les barrières épithéliales	29
2. Immunité innée	30
a. Les effecteurs de la réponse innée : les phagocytes	30
b. La phagocytose.....	31
c. La réponse induite précoce : l'induction de la réponse inflammatoire.....	31
d. L'extravasation des cellules sanguines.....	32
3. Immunité acquise ou adaptative	33
a. Immunité à médiation humorale et lymphocytes B.....	33
b. Immunité à médiation cellulaire et lymphocyte T	34
c. La mémoire.....	34
<i>IV. Les enjeux de l'étude</i>	36
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	38
<i>I. Matériel et méthodes</i>	38
1. Animaux	38
2. Souche bactérienne	38
3. Infections expérimentales	38
4. Suivi des souris.....	38
5. Prélèvements.....	39
6. Traitement et analyse du liquide de lavage péritonéal.....	40
a. Préparation des cellules du lavage péritonéal.....	40
b. Culture cellulaire	40
c. Détermination des charges bactériennes.....	40
d. Analyse des populations cellulaires.....	40
7. Détermination des charges bactériennes dans le sang et les tissus	41
8. Tests statistiques	41

<i>II. Résultats</i>	42
1. Caractérisation de la sensibilité des lignées de souris C57Bl6 et DBA-2 à une infection à <i>S. aureus</i> par voie intra-péritonéale.....	42
2. Dissémination systémique de <i>S. aureus</i> lors d'infection par voie intra-péritonéale	44
a. Comparaison de la multiplication bactérienne au sein de la cavité péritonéale chez les souris des lignées C57Bl6 et DBA-2 au cours des 16 premières heures de l'infection.....	44
b. Evaluation de la bactériémie chez les souris C57Bl6 et DBA-2 au cours des 16 premières heures de l'infection.....	45
c. Evaluation de la colonisation des organes par <i>S. aureus</i> suite à la dissémination par voie sanguine	46
3. Suivi de la mise en place de la réponse immunitaire innée dans la cavité péritonéale.....	50
a. Caractérisation de l'intensité du recrutement cellulaire dans la cavité péritonéale.....	50
b. Caractérisation de la nature des cellules recrutées dans la cavité péritonéale.....	51
c. Caractérisation de la prise en charge des bactéries par les cellules de l'immunité, recrutées au sein de la cavité péritonéale	53
DISCUSSION	55
CONCLUSION	64
BIBLIOGRAPHIE	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de <i>S. aureus</i> [Lowy 1998]	16
Figure 2 : Invasion tissulaire par <i>S. aureus</i> [Lowy 1998]	27
Figure 3 : Extravasation des cellules sanguines [Simon 2009]	32
Figure 4 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie de flux.....	41
Figure 5 : Taux de survie des souris C57Bl6 et DBA-2 suite à une inoculation de 8.10^7 CFU de <i>S. aureus</i> (souche HG001) par voie intra-péritonéale.....	42
Figure 6 : Moyenne des scores cliniques (calculés comme indiqué dans le matériel et méthode) des souris C57Bl6 et DBA-2 au cours des 4 jours suivant une inoculation de 8.10^7 CFU de <i>S. aureus</i> (souche HG001) par voie intra-péritonéale.	42
Figure 7 : Modifications macroscopiques observées sur les principaux organes abdominaux et la cage thoracique lors de l'autopsie des souris survivantes 5 jours après une inoculation de 8.10^7 CFU de <i>S. aureus</i> (souche HG001) par voie intra-péritonéale.....	43
Figure 8 : Nombre de CFU observées après étalement sur gélose Chapman du surnageant obtenu par centrifugation du lavage péritonéal sur des souris infectées par <i>S. aureus</i> par voie intra-péritonéale.....	44
Figure 9 : Nombre de CFU observées par mL de sang après étalement sur gélose Chapman du sang prélevé sur des souris infectées par <i>S. aureus</i> par voie intra-péritonéale.....	45
Figure 10 : Charges bactériennes par rein prélevé sur des souris C57Bl6 et DBA-2 à différents temps post infection suite une inoculation de <i>S. aureus</i> par voie intra-péritonéale.	47
Figure 11 : Nombre de CFU observés après étalement sur gélose Chapman, du broyat de foie.....	48
Figure 12 : Nombre de CFU observés après étalement sur gélose Chapman, du broyat de rate.....	49
Figure 13 : Nombre de cellules observées, par mL de lavage péritonéal des souris infectées	50
Figure 14 : Proportions de macrophages (CD11b+ Ly6G- F4/80+) et de neutrophiles (CD11b+ Ly6G+ F4/80-) chez les 2 lignées souris infectées par <i>S. aureus</i> par voie intra-péritonéale	52
Figure 15 : A : Bactéries associées aux cellules - B : Bactéries intracellulaires	53

LISTE DES ABREVIATIONS

BCR : B Cell Receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra acétique

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

GNN : Granulocytes neutrophiles

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

IAC : Infections Acquise dans la Communauté

IAH : Infection Acquise à l'Hôpital

Ig : Immunoglobuline

MRSA : Méthicilline Resistant Staphylococcus Aureus

MSSA : Méthicilline Sensible Staphylococcus Aureus

SEM : Standard Error of Mean

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TSB : Tryptic Soy Broth

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus est à la fois une bactérie commensale et un pathogène important des mammifères. Il est responsable d'infections très diverses allant de simples infections cutanées à des affections systémiques pouvant engager le pronostic vital de l'individu. S. aureus est, de plus, caractérisé par sa capacité et sa rapidité à développer des résistances aux antibiotiques, ce qui rend le traitement de ces infections de plus en plus difficile.

De nos jours, le traitement des infections bactériennes s'effectue principalement et quasi exclusivement par l'utilisation de substances antibiotiques. Or, les bactéries telles que S. aureus développent des résistances aux antibiotiques plus rapidement que l'homme ne trouve de nouvelles molécules antibiotiques. Cette approche seule s'avère donc de plus en plus insuffisante et se traduit actuellement par de nombreux échecs thérapeutiques.

De plus nous savons que les infections bactériennes résultent d'une interaction complexe entre le pouvoir infectieux de la bactérie et les mécanismes de défense de l'hôte. Le résultat de l'infection est déterminé par les facteurs de virulence de la bactérie et les facteurs génétiques de l'hôte qui influent sa capacité à mettre en place une réponse immunitaire appropriée.

Etant donnée l'impasse thérapeutique actuelle vis-à-vis du traitement des infections bactériennes et tout particulièrement des infections à S. aureus, il est nécessaire d'envisager le problème sous un nouvel angle, celui de l'hôte et de ses défenses immunitaires.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail de l'équipe « Résistance génétique aux infections à staphylocoques » du laboratoire UMR1225 IHAP, visant à caractériser les différences de sensibilité d'individus génétiquement différents et à déterminer l'implication des cellules de l'immunité innée dans le contrôle des infections par S. aureus.

La première partie de ce travail est une étude bibliographique qui présentera tout d'abord la bactérie Staphylococcus aureus, puis les infections à S. aureus et enfin quelques rappels sur les défenses de l'hôte et l'immunité antibactérienne. La seconde partie est une étude expérimentale visant à caractériser les différences de sensibilité d'individus génétiquement différents à travers un modèle murin. Elle se compose d'une description des méthodes utilisées, suivie d'une présentation des résultats obtenus et d'une discussion de ces derniers.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Staphylococcus aureus

1. Classification

[Decoster]

Les staphylocoques appartiennent à la famille des micrococcaceae composée de quatre genres :

- Le genre Micrococcus qui comprend des microcoques qui sont des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Ils sont sans pouvoir pathogène et sont la plupart du temps des contaminants des prélèvements.
- Le genre Stomatococcus qui comprend des bactéries faisant partie de la flore buccale.
- Le genre Planococcus qui comprend des bactéries du milieu marin.
- Le genre Staphylococcus qui regroupe 36 espèces dont les trois principales sont : staphylococcus aureus, staphylococcus épidermidis et staphylococcus saprophyticus. D'autres espèces existent mais avec une fréquence d'isolation moindre, cependant certaines de ces espèces présentent un pouvoir pathogène non négligeable comme par exemple staphylococcus hyicus chez le porc.

2. Caractéristiques physiologiques

C'est un coque gram positif qui s'organise en grappe et se caractérise par la pigmentation dorée de ses colonies. Il possède un métabolisme aérobie facultatif, il est caractérisé par sa capacité à produire une catalase et à fermenter le glucose ainsi que par l'absence de production d'oxydase. Il est immobile et ne produit pas de spores.

3. Structure

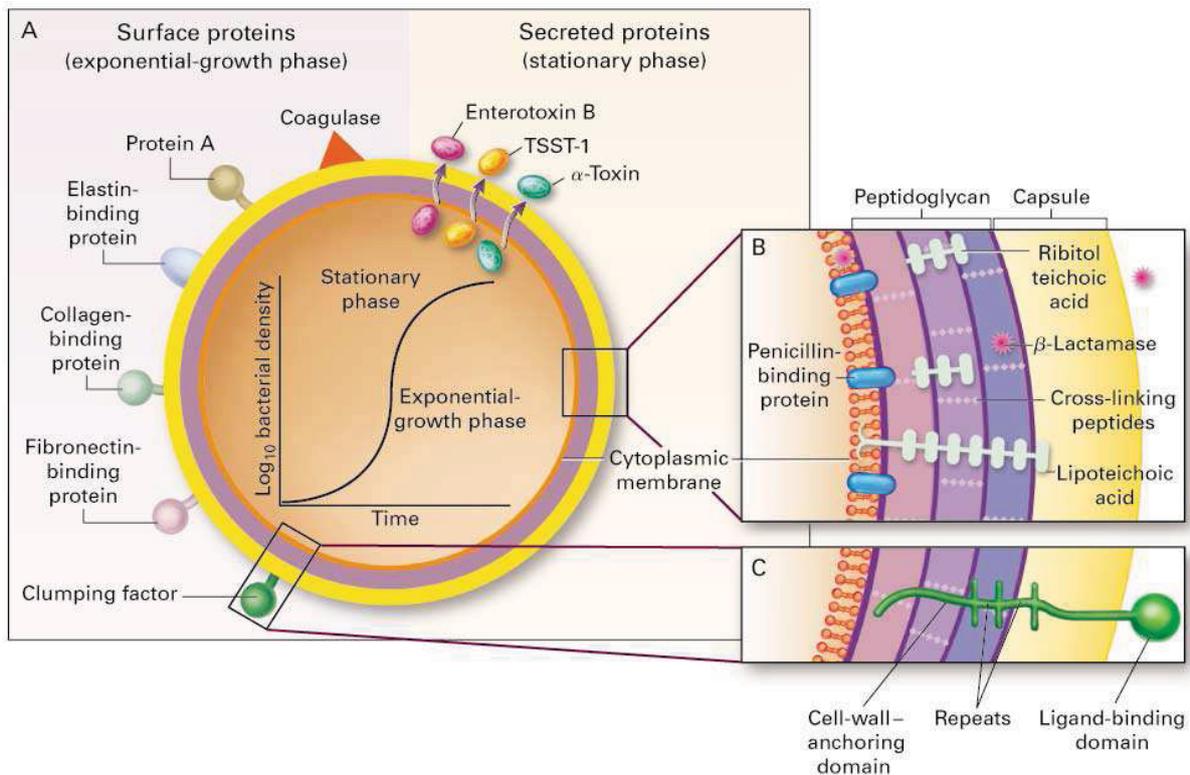


Figure 1 : Structure de *S. aureus* [Lowy 1998]

A : protéines de surface et sécrétées en fonction de la phase de croissance. B : organisation de la paroi bactérienne et de la capsule. C : Détail de l'organisation du « clumping factor ». La majorité des protéines de surfaces ont une organisation similaire.

a. La paroi cellulaire

La paroi des staphylocoques est caractéristique des bactéries à gram positif. C'est une structure rigide et résistante qui entoure la membrane cytoplasmique. Cet exosquelette est responsable de la forme de la bactérie et composé principalement de peptidoglycanes. Ces derniers peuvent avoir une action similaire à celle des endotoxines et ainsi provoquer l'activation des macrophages et du complément, ainsi que l'agrégation plaquettaire. Les acides téichoïques sont quantitativement le deuxième composant et sont associés au réseau de peptidoglycanes. Ils atteignent la surface externe et constituent des antigènes importants.

b. La capsule

La majorité des staphylocoques produisent des micro-capsules polysaccharidiques. Certaines souches de *S. aureus* sont aussi capables de produire des exopolysaccharides responsables de la formation de biofilms, ce qui confère à la bactérie une forme de résistance.

c. Le génome

Il est composé d'un chromosome circulaire (environ 2800 pb), de prophages, de plasmides et de transposons. Des facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés à la fois dans le chromosome et dans les éléments extra-chromosomiques.

4. Facteurs de virulence

[Lowy 1998]

a. Protéines de surfaces

Les protéines présentes à la surface de *S. aureus* ont de nombreux points communs entre-elles. Elles se composent en général d'une séquence signal sécrétrice, d'une partie composée d'acides aminés chargés positivement dans le cytoplasme, d'un domaine membranaire hydrophobe et d'une zone d'ancrage dans la paroi cellulaire.

Certaines d'entre elles possèdent un domaine de liaison exposé à la surface de la bactérie qui leur confère les propriétés d'adhésine.

La protéine A, qui est le prototype de ces protéines, a des propriétés antiphagocytaires par sa capacité à se lier à la partie Fc des immunoglobulines.

Les MSCRAMM : « microbial-surface components recognizing adhesive matrix molécules », forment un ensemble de protéines qui, comme son nom l'indique, sont caractérisées par leur capacité à se lier à des éléments de la matrice extracellulaire. Il semblerait qu'elles jouent un rôle majeur dans la capacité des staphylocoques à envahir les tissus de l'hôte.

b. Les protéines sécrétées

Les staphylocoques produisent un grand nombre de molécules qui sont regroupées sur la base de leur mécanisme d'action :

- Les cytotoxines

Les cytotoxines (alpha-toxine par exemple) provoquent la formation de pores et des modifications pro-inflammatoires dans la cellule. Ces modifications sont à l'origine de dommages cellulaires et participent à l'expression du syndrome septique.

- Les toxines pyrogéniques

Ce sont des superantigènes capables de se lier aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Cette liaison induit la prolifération des cellules T et la production de cytokines. Les toxines pyrogéniques les plus connues sont :

- Les entérotoxines responsables de l'intoxication alimentaire et du syndrome du choc toxique.
- La toxine du syndrome du choc toxique 1 (TSST-1) est structurellement très proche des entérotoxines. Le gène codant pour cette toxine est retrouvé chez 20% des *S. aureus* isolés.
- Les toxines exfoliatives (ex : toxines épidermolytiques A et B) causent un érythème et un décollement de la peau. Leur mécanisme d'action est controversé.

- Les enzymes

Les staphylocoques produisent un grand nombre d'enzymes responsables de la destruction des tissus. Ces enzymes facilitent la dissémination des bactéries au sein des tissus, mais leur implication dans la pathogénèse de l'infection n'est pas encore bien définie. Citons par exemple :

- La Béta-lactamase qui est une enzyme située dans la membrane cytoplasmique responsable de l'inactivation de la pénicilline. L'apparition d'une nouvelle bêta-lactamase est actuellement responsable de la résistance des staphylocoques aux pénicillines pénicillase-résistantes et aux céphalosporines.
- La coagulase qui est un activateur de la prothrombine, permet la conversion du fibrinogène en fibrine. Cependant son implication dans la virulence de la bactérie est incertaine.

5. Régulation de la virulence

[Lowy 1998]

Les protéines de surface sont synthétisées surtout au cours de la phase exponentielle de croissance alors que les molécules sécrétées le sont principalement pendant la phase stationnaire. Cette expression séquentielle des gènes semble cliniquement importante et correspond aux besoins des différents stades de l'infection. En effet, les protéines de surface qui permettent la fixation de la bactérie à la matrice extracellulaire sont surtout utiles au début de l'infection afin de permettre la colonisation des tissus. Une fois cette colonisation réussie, la bactérie a besoin de se disséminer à travers les tissus adjacents, ce qui est favorisé par l'excrétion de protéines comme les protéases. L'expression de ces différents facteurs est coordonnée par des gènes régulateurs. Il a été montré que l'inactivation de ces gènes entraîne une diminution significative de la virulence de la bactérie.

6. Staphylocoque et résistance aux antibiotiques

L'apparition des antibiotiques a été une révolution dans le traitement des infections bactériennes et a nourri de grands espoirs. Mais rapidement, l'apparition de souches résistantes à ces molécules a remis en cause l'efficacité de ces traitements. Depuis, l'apparition de facteurs de résistance au sein des souches bactériennes est une préoccupation permanente en santé publique. Le staphylocoque est une des meilleures illustrations de cette évolution.

a. Historique de la résistance

La mortalité des patients présentant une bactériémie à *S. aureus* était proche de 80% avant l'utilisation des antibiotiques. L'apparition de la pénicilline, au début des années 40 a permis une amélioration considérable du pronostic de ces patients. Cependant dès 1942, des Staphylocoques résistants à la pénicilline (avec un plasmide codant pour la pénicillase) ont été identifiés, tout d'abord dans les hôpitaux, puis rapidement au sein de la communauté. Vingt ans après l'introduction de la pénicilline, 80% des souches de *S. aureus* isolées y sont résistantes. Ce schéma se reproduit en 1961 lors de l'introduction de la méthicilline. L'utilisation de ce nouvel antibiotique est rapidement suivie de l'apparition de souches résistantes à la méticilline (les MRSA), et ce, dès l'année suivante *[Lowy 2003]*. De plus, il s'avère que ces dernières sont également peu sensibles voire résistantes aux autres classes d'antibiotiques.

Une étude de surveillance faite entre 1987 et 1997 dans une unité de soins intensifs aux Etats Unis montre que le pourcentage d'infections dues à des MRSA est passé de moins de 50% à presque 100% en 10 ans. De plus, au sein de ces souches résistantes plus de la moitié ne sont sensibles qu'à la vancomycine [Lowy 2003]. La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides, qui tout comme les bêtalactamines inhibe la synthèse de la paroi. Cette étude met en évidence l'importance du phénomène de sélection de bactéries résistantes au sein des organisations hospitalières. La rapidité et l'efficacité avec laquelle *S. aureus* acquiert des facteurs de résistance aux molécules antibiotiques sont particulièrement inquiétantes, et responsables actuellement de nombreux problèmes thérapeutiques, principalement dans les structures hospitalières.

Cependant, ce problème ne concerne pas uniquement les hôpitaux mais également le reste de la population. En effet depuis plusieurs années, le nombre d'infections à staphylocoques au sein de la population augmente, ainsi que la capacité de résistance des souches incriminées. Depuis 2001, 70% des souches isolées lors d'infections à *S. aureus* au sein de la population sont résistantes à la méthicilline [Maltezou 2006].

Il existe aujourd'hui des staphylocoques partiellement et totalement résistants à la vancomycine, et des études récentes tendent à montrer que les dernières molécules encore efficaces, ne le seront bientôt plus sur certaines souches [Lowy 2003], qui seront alors totalement résistantes aux molécules disponibles.

b. La résistance bactérienne
[Euzeby]

Il existe deux types de résistance, la résistance naturelle qui fait partie du patrimoine génétique initial du germe et la résistance acquise qui est due à une évolution du génome.

- La résistance naturelle

Elle a pour support le chromosome bactérien. C'est un caractère d'espèce qui touche généralement toutes les cellules de toutes les souches. Elle préexiste à l'utilisation d'antibiotiques, elle est stable et transmissible à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal.

- La résistance acquise

Elle est le fruit de modification génétique et phénotypique de la bactérie au cours de son évolution, elle ne touche généralement que quelques souches. Elle se produit de deux manières différentes.

- Par mutation du chromosome bactérien (résistance acquise chromosomique) :

Il s'agit d'erreurs lors de la réplication. Elles se produisent en moyenne toutes les 10^9 réplifications, ce qui n'est pas si peu fréquent au vu de la rapidité de multiplication des bactéries. Ces mutations sont rares et aléatoires, mais stables et héréditaires. Leur apparition est spontanée ce qui signifie qu'elles ne dépendent pas de l'utilisation des antibiotiques. Cependant les antibiotiques génèrent une pression de sélection qui favorisera le développement du phénotype résistant. Ces mutations n'atteignent en général qu'un caractère phénotypique de la bactérie et lui confère donc une résistance à un seul antibiotique à la fois.

- Par l'intermédiaire des plasmides, des éléments transposables et des intégrons (résistance acquise extra chromosomique) :

Les plasmides sont le support du génome extra chromosomique bactérien, ce sont des morceaux d'ADN circulaire, libres dans le cytoplasme de la bactérie, qui codent pour des protéines additionnelles. Les bactéries porteuses de plasmides sont donc normales, elles possèdent tous les constituants normaux de la bactérie contrairement aux bactéries résistante suite à une mutation qui sont souvent fragilisées. Les plasmides sont transmissibles sur un mode horizontal ce qui est à l'origine d'une dissémination très importante au sein des populations bactériennes. Cette dissémination des gènes de résistance est exacerbée par la présence d'éléments génétiques transposables et d'intégrons qui permettent la dissémination de gènes entre des bactéries phylogénétiquement éloignées, permettant ainsi la transmission de gènes là où celle d'un plasmide échoue.

Les protéines codées par les gènes de résistance composant les plasmides, les éléments génétiques transposables et les intégrons, peuvent conférer une résistance à la bactérie vis-à-vis des antibiotiques. Elles peuvent être séparées en trois principaux groupes en fonction de leur mécanisme d'action. Les enzymes qui inactivent l'antibiotique en modifiant sa structure (ex les bêtalactamases). Les protéines de transport qui agissent comme des pompes et rejettent l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie, diminuant ainsi sa concentration au-dessous de la concentration active (exemple : les pompes à efflux codées par le gène *msrA* qui confère à *S. aureus* une résistance aux macrolides). Les protéines modifiant la cible de l'antibiotique (exemples : les protéines Van responsables de la résistance à la vancomycine chez les entérocoques). Il s'agit de protéines remplaçant des protéines existantes. Elles ont la même fonction que les protéines d'origine mais ont quelques modifications anatomiques qui leur permettent d'être moins affines avec l'antibiotique. Les plasmides comportent plusieurs gènes régulant la synthèse d'une protéine capable de conférer une résistance à plusieurs

antibiotiques. Ces plasmides ne sont pas transmissibles de manière héréditaire mais sont transmis lors des phénomènes de conjugaison, de transduction ou de transformation.

c. Pression de sélection et résistance

S. aureus est un pathogène commensal des mammifères. Il est donc naturellement présent à la surface de la peau. C'est cette propriété qui confère au staphylocoque une exposition aux substances antibiotiques très fréquente au sein de la communauté, voire quasi permanente au sein des hôpitaux. En effet, lors d'administration d'antibiotiques à un individu, il a été montré qu'une partie est excrétée par la sueur à la surface de la peau, ce qui provoque une exposition des bactéries à de basses concentrations [Maltezou 2006]. Les staphylocoques ne sont pas tués par ces concentrations et sont alors à même d'établir des résistances. La facilité d'accès aux antibiotiques et leur utilisation excessive ou inadaptée sont les principaux responsables de l'émergence des résistances au sein de la communauté.

De même au sein des structures hospitalières, la présence d'agents antibactériens est quasi permanente. Les patients en plus ou moins bonne santé font office de réservoir, et le personnel sain de vecteur. Les bactéries sont alors dans des conditions idéales pour se multiplier et disséminer. Leur cohabitation permanente avec les antibiotiques leur donne tout loisir de développer des résistances ou d'acquérir de nouveaux facteurs de résistance auprès d'autres populations bactériennes présentes.

7. Relation entre virulence et acquisition de résistance aux antibiotiques
[Cameron 2011]

Comme nous venons de le voir, la capacité de résistance aux antibiotiques de *S. aureus* est le résultat de modifications génétiques et phénotypiques. Contrairement aux mécanismes responsables de l'apparition et de l'évolution de ces résistances, l'impact des modifications génétiques et phénotypiques sur la virulence de la bactérie est bien moins connu.

Des études récentes mettent en évidence un taux de mortalité et une durée d'hospitalisation supérieurs dans le cas d'infections acquises à l'hôpital par des MRSA comparés à ceux observés lors d'infection par des MSSA. Il a alors été émise l'hypothèse que l'acquisition de résistances aux antibiotiques de *S. aureus* serait responsable d'une augmentation de la virulence de la bactérie. Cependant, de nombreux facteurs sont susceptibles de modifier le taux de mortalité suite à une infection. Certes, la modification de la virulence de la bactérie est un facteur déterminant mais il faut également considérer la modification de la réponse de l'hôte, le temps nécessaire à la mise en place d'un traitement efficace et la différence d'efficacité des traitements administrés.

Lors d'infections acquises à l'hôpital, l'étude de l'impact des différents facteurs que nous venons de citer révèle que les mauvais résultats cliniques, suite à des infections par des MRSA, sont plus probablement dus aux facteurs liés à l'hôte et aux traitements antibiotiques mis en place qu'à la modification de la virulence de la bactérie. La virulence intrinsèque des souches sensibles et résistantes étant similaire.

Par contre, les souches MRSA rencontrées lors d'infection acquises dans la communauté se sont révélées significativement plus virulentes que les souches MSSA. Ce phénomène est le résultat de la production de nouveaux facteurs de virulence (la toxine PVL par exemple) rarement exprimés chez les souches sensibles, ainsi que de l'augmentation de l'intensité de la production de facteurs de virulence également présents chez les souches sensibles (hémolysine alpha par exemple). Cependant, pour la toxine PVL, il a été montré qu'il n'y a pas de relation entre le gène responsable de la résistance aux bêta-lactamines et la production de ce facteur. Ceci remet donc en cause la relation de cause à effet entre l'acquisition de la résistance à la méthicilline et la production de ces facteurs de virulence. Ce qui permet de penser que ces constatations sont plutôt dues à une évolution parallèle des deux caractères.

Enfin, la faible sensibilité de *S. aureus* à la vancomycine semble inversement corrélée à la virulence de la souche. Dans ce cas-là, des modifications génétiques telles que la modification d'un gène fortement impliqué dans la régulation des facteurs de virulence (le gène *sar*) semblent directement liées à l'augmentation de la CMI de la vancomycine sur *S. aureus*. Ces modifications semblent responsables de l'altération de l'interaction hôte/pathogène à l'origine d'une diminution de l'apparition de signes cliniques aigus et d'une plus grande capacité de la bactérie à persister au sein des cellules.

II. Infection à *S. aureus*

S. aureus est un pathogène humain important pouvant être responsable d'un grand nombre d'affections allant d'infections cutanées modérées à des affections sévères telles que des septicémies, des pneumonies ou des endocardites pouvant entraîner la mort et ce, même en présence d'un traitement adapté.

1. Epidémiologie

a. Source

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. L'homme est le principal réservoir naturel de *S. aureus*, il présente un portage sain, principalement au niveau des cavités nasales. Le portage de *S. aureus* au sein de la population varie considérablement en fonction des pays, avec plus de 30 % de porteurs dans les pays industrialisés (Etats-unis, Pays-bas) et environ 15% dans les pays en voie de développement [Sivaraman 2009]. Comme nous venons de le voir, les taux de portage varient considérablement en fonction des études, mais toutes s'accordent à dire qu'environ 20% de la population sont des porteurs permanents [Sivaraman 2009, Lowy 1998, Panhotra 2005, Best 2011]. Parmi ces 20% de porteurs sains, il semblerait que la grande majorité soit colonisée par des souches sensibles à la méthicilline (MSSA), avec seulement 1 à 3% des souches isolées résistantes à la méthicilline (MRSA) [Panhotra 2005]. Ces porteurs servent de réservoir à la bactérie et permettent sa dissémination au sein de la population. Les facteurs influençant le portage de *S. aureus* au niveau des cavités nasales ne sont pas bien déterminés, seules certaines populations ont été identifiées comme présentant un portage significativement plus important que la moyenne. C'est le cas, par exemple, des personnes immunodéprimées et des personnes utilisant des drogues intraveineuses [Sivaraman 2009].

b. Les infections acquises à l'hôpital et en société, deux entités épidémiologiques

On différencie deux types d'infection à staphylocoque : les infections acquises lors d'un séjour dans une structure hospitalière, les IAH et les infections acquises en dehors, au sein de la société, les IAC. Cette différence est faite car, bien que toutes deux causées par des *S. aureus*, elles n'ont pas les mêmes caractéristiques épidémiologiques (population, transmission, clinique). Tout d'abord, les populations concernées sont différentes. Alors que les IAC touchent principalement des enfants et des adolescents en bonne santé, les IAH touchent surtout des personnes âgées [Maltezou 2006]. Ensuite, la transmission au sein des

hôpitaux peut s'effectuer par l'intermédiaire du matériel médical comme les sutures ou cathéters qui favorisent l'infection [Lowy 1998], et ce, en plus du mode de contamination par contact qui est le seul observé dans les IAC. Enfin, les IAC sont, dans la grande majorité des cas, des infections de la peau et des tissus mous, alors que dans le cas des IAH, les infections invasives telles que les pneumonies et les bactériémies sont majoritaires.

c. Prévalence de S. aureus

Le nombre de cas d'infections à S. aureus a augmenté au cours des dernières années, et ce, dans le monde entier. Aux Etats Unis, en 2003, S. aureus est responsable de 400 000 hospitalisations et de la mort de 19 000 hospitalisés par an [Boucher 2008]. Il est devenu aujourd'hui la principale cause d'endocardites (30% des endocardites) [Boucher 2008] et est responsable d'un nombre croissant de bactériémies au sein des hôpitaux, mortelles dans environ 30% des cas. Cette augmentation étant liée à l'augmentation des infections par des MRSA [Wyllie].

Depuis une dizaine d'années, les infections acquises au sein de la communauté concernant les personnes sans aucun facteur de risque de contamination, sont également rapportées avec une fréquence croissante [Gorak 1999, Maltezou 2006]. L'implication des MRSA dans ces infections est de plus en plus importante, ces souches étant responsables de plus des 2/3 des infections. Il s'agit dans la majorité des cas d'infections cutanées ou des tissus mous (abcès, furoncles, impetigo, folliculite) mais certains cas graves de pneumonie, de sepsis ou de nécrose musculaire ont été rapportés [Maltezou 2006].

2. Transmission

a. Mode de transmission

La transmission se fait dans la plupart des ces cas par le biais de mains contaminées, soit de manière directe parce que la personne est porteuse saine soit de manière indirecte parce qu'elle s'est transitoirement contaminée auprès d'un autre réservoir. La contamination par contact avec des sources environnementales est beaucoup plus rare [Lowy 1998]. L'intoxication alimentaire est également un mode de contamination possible dans le cas de souches excréant des entérotoxines [Maltezou 2006].

b. Facteurs de risque

Il semblerait que les porteurs soient plus à même de développer des infections à *S. aureus* que les non porteurs [Lowy 1998] et ce, d'autant plus s'ils sont colonisés par une souche résistante à la méthicilline [Maltezou 2006, Wyllie, Boucher 2008]. Dans tous les cas, ils constituent un réservoir de la bactérie qui pourra être à l'origine d'une infection lors d'effraction cutanée ou d'immunodépression chez le porteur ou toute personne en contact [Lowy 1998, Sivaraman 2009].

La vie en communauté, les contacts rapprochés et le manque d'hygiène ont été établis comme des facteurs de risque [Maltezou 2006]. Paradoxalement, un accès aux antibiotiques et des traitements antérieurs sont également des facteurs de risques [Maltezou 2006].

L'âge apparaît comme un facteur déterminant dans la gravité de l'infection avec une atteinte plus importante chez les personnes âgées (>65) et les jeunes enfants (<2) [Boucher 2008].

Enfin toute personne ayant une atteinte de la fonction leucocytaire ou plus généralement du système immunitaire, est plus à même de développer une maladie à *S. aureus* [Lowy 1998].

Les cathéters sont reconnus comme favorisant l'infection à *S. aureus*, en effet ils traumatisent l'endothélium vasculaire et provoquent la formation de thrombus favorisant l'adhérence des bactéries [Lowy 1998]. C'est également le cas des sutures qui perturbent la phagocytose et favorisent l'infection à *S. aureus* [Lowy 1998].

3. Les infections à *S. aureus*

Comme nous venons de le voir, les staphylocoques possèdent un grand nombre de facteurs de virulence responsables de leur pathogénicité. Les fonctions de chacun de ces facteurs de virulence sont relativement bien connues. Ils ont des rôles chevauchants et peuvent agir seuls ou de manière coordonnée, cependant leurs interactions, entre eux et avec les facteurs de l'hôte, ainsi que leur importance dans l'infection, sont peu connues.

a. Les différents types d'infections à *S. aureus*

Il existe deux types de syndromes provoqués par *S. aureus*, les toxémies staphylococciques et les infections suppuratives.

- Les toxémies peuvent être dues à des toxines produites in-vivo lors d'une infection, ou bien à des toxines présentes dans des aliments ingérés (entérotoxines).

- L'infection suppurative est la conséquence d'une invasion des tissus de l'hôte par la bactérie suivie d'une multiplication de cette dernière, de la destruction des tissus et de l'intervention du système immunitaire et de la réponse inflammatoire. Elle est permise par la rupture d'une des barrières physiologiques : la peau ou les muqueuses, permettant aux staphylocoques d'avoir accès aux tissus ou au sang.

Le fait que l'infection s'arrête là, ou dissémine dans tout l'organisme dépend ensuite du rapport de force entre la virulence de la souche et les mécanismes de défense de l'hôte.

b. Mécanisme d'invasion tissulaire et de dissémination

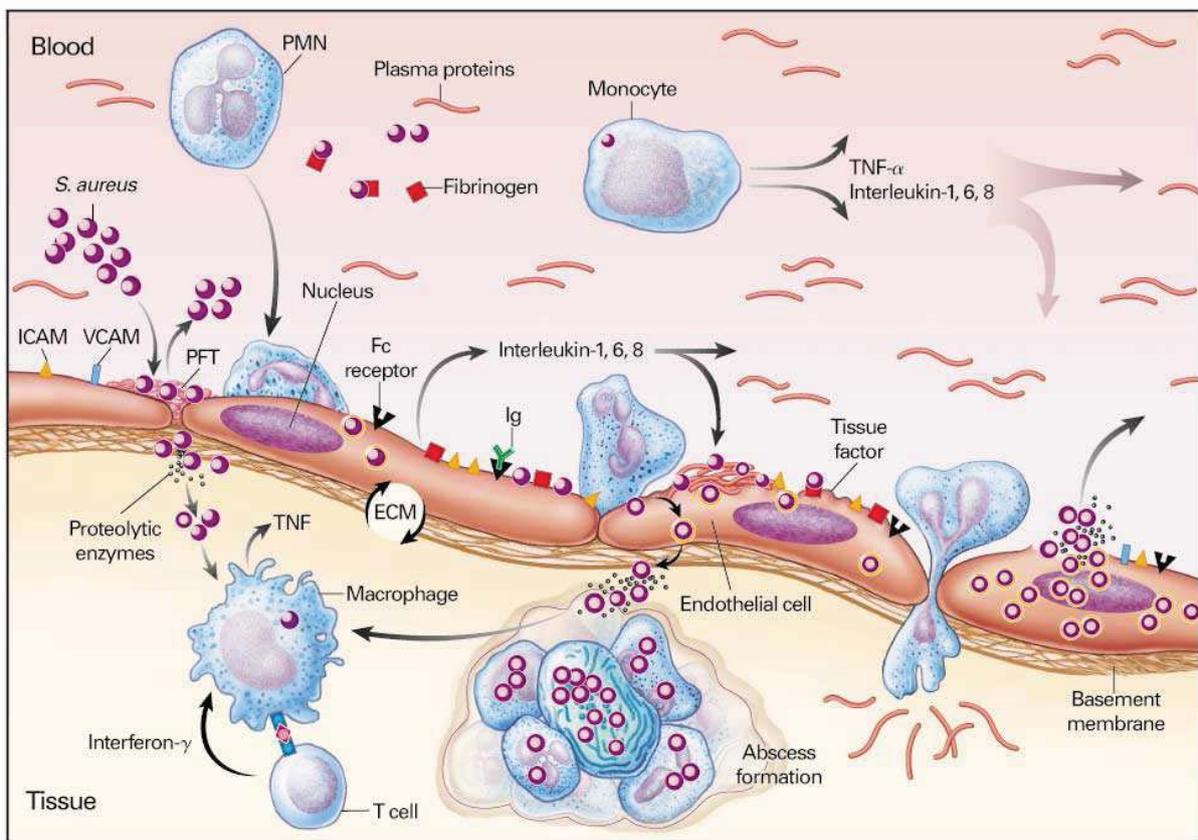


Figure 2 : Invasion tissulaire par *S. aureus* [Lowy 1998]

S. aureus est une bactérie à multiplication extracellulaire ; une de ses particularités est sa capacité à disséminer par voie sanguine et à provoquer des abcès à distance du lieu initial de l'infection, c'est ce que l'on appelle les infections métastatiques. Cette capacité est due à l'interaction particulière de la bactérie avec les cellules endothéliales, réel pivot de ce processus [Lowy 1998].

Les staphylocoques peuvent adhérer aux cellules endothéliales via deux mécanismes. Soit directement, via l'interaction entre les adhésines présentes à la surface de la bactérie et leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Soit indirectement, en se fixant aux molécules de la matrice extracellulaire présentes autour des cellules endothéliales. Une fois la bactérie liée à la cellule, elle est phagocytée par cette dernière. L'environnement intracellulaire protège alors les staphylocoques du système immunitaire de l'hôte et des antibiotiques. Ce phénomène favorise la survie de la bactérie et peut être à l'origine du développement d'infections persistantes et récurrentes. Après avoir été phagocyté, *S. aureus* sécrète des protéases qui vont faciliter sa dissémination dans les tissus avoisinants et lui permettre d'être relâché dans le flux sanguin.

Les bactéries provoquent une réaction inflammatoire au sein des tissus sub-épithéliaux à l'origine de la formation d'abcès. Le passage de la bactérie par le milieu intracellulaire des cellules endothéliales provoque des modifications de ces dernières qui expriment alors des molécules d'adhésions supplémentaires à leur surface et sécrètent des interleukines. Ces modifications ont pour conséquence le recrutement de leucocytes sur le lieu de l'infection. Ces derniers sont alors à l'origine d'une réponse inflammatoire importante. Cette réaction inflammatoire n'est pas seulement locale mais également systémique car une partie des interleukines produites par les cellules endothéliales et les leucocytes est libérée dans le sang. Ces dernières contribuent à l'apparition des symptômes du syndrome septique et de la vasculite généralement associée aux infections systémiques à staphylocoque.

4. Réponse de l'hôte à l'infection

Un des principaux aspects de l'infection à staphylocoque est la formation d'abcès. Cette formation est due à l'interaction entre les leucocytes et la bactérie. Ces derniers sont la première ligne de défense de l'hôte face à l'infection. Leur migration sur le lieu de l'infection est provoquée par l'expression de différentes molécules à la surface des cellules endothéliales. Ce processus se fait par l'intermédiaire des cytokines et est induit par les bactéries et les macrophages tissulaires. Ces mécanismes appartiennent à l'immunité innée et vont être détaillés plus tard. Les anticorps, qui eux font partie des mécanismes de l'immunité acquise, ne semblent pas avoir de rôle protecteur majeur (leur taux n'est pas corrélé avec une protection contre l'infection) sauf dans le cas du choc toxique où les anticorps anti-toxine du choc toxique 1 sont protecteurs. De nombreux composants des staphylocoques sont à l'origine de la production d'anticorps, mais on ne sait pas lesquels d'entre eux sont capables d'induire une réponse protectrice.

III. Immunité Antibactérienne

[Josien]

L'immunité antibactérienne dépend de 3 systèmes de défense qui vont agir successivement au cours de l'infection. La première ligne de défense de l'organisme face à l'infection est constituée par les barrières épithéliales qui le séparent du milieu extérieur et s'opposent à la pénétration des micro-organismes.

C'est uniquement une fois cette ligne de défense franchie que l'on considère qu'il y a infection et donc intervention du système immunitaire de l'individu.

Dans un premier temps c'est la réponse innée qui entre en jeu, de manière non spécifique mais immédiate (dès les premières minutes).

Dans un second temps, la réponse immunitaire adaptative entre en jeu, elle est retardée (quelques jours) et spécifique.

1. Les barrières épithéliales

Les surfaces épithéliales (peau, conjonctive et muqueuses) constituent la première ligne de défense contre l'infection par des micro-organismes. Leur mécanisme de défense comprend trois aspects : mécanique, chimique et microbiologique.

Le rôle de barrière mécanique des épithélia est assuré par des jonctions intercellulaires serrées. L'organisation en couches multiples et la sècheresse de la peau en font une barrière très efficace. Au niveau des muqueuses, le mucus empêche l'adhésion des micro-organismes aux cellules épithéliales et les mouvements de péristaltisme (au niveau du tube digestif) et ciliaires (au niveau des poumons) renforcent cette fonction et permettent l'évacuation des bactéries.

Les cellules épithéliales produisent également un certain nombre de substances chimiques bactéricides telles que les lysosymes et les défensines, et bactériostatiques telles que les protéines chélatrices de Fer.

Enfin, les épithélia sont colonisés par une flore microbienne saprophyte qui entre en compétition pour l'espace et la nourriture avec les micro-organismes pathogènes et produit, dans certain cas, des peptides antibactériens. Cette flore protège ainsi l'invasion des épithélia par des bactéries pathogènes.

2. Immunité innée

Cette immunité préexiste à l'exposition à un agent infectieux, c'est pourquoi on l'appelle innée. Elle ne possède pas de mémoire, son efficacité est donc constante au cours des différentes infections et dépend uniquement de facteurs liés à l'individu, tel que les variations génétiques, l'âge ou l'état de nutrition.

La réponse innée possède deux aspects :

- La réponse innée immédiate qui agit dès les premières minutes et implique la reconnaissance des pathogènes par des molécules préformées et met en jeu les phagocytes (macrophages et polynucléaires neutrophiles).

- La réponse induite précoce qui est la production de facteurs solubles (cytokines et chimiokines) responsables du recrutement de nouvelles cellules sur le lieu de l'infection.

a. Les effecteurs de la réponse innée : les phagocytes

Dès qu'un micro-organisme traverse la barrière épithéliale, dans un premier temps il est reconnu par les macrophages tissulaires. Ces macrophages sont présents en permanence au sein des tissus sous épithéliaux et constituent la première ligne de défense après les épithélia.

Dans un deuxième temps, ce sont les granulocytes neutrophiles (GNN) qui entrent en jeu. Ils représentent la deuxième population de phagocytes. Ce sont des cellules circulantes qui ne sont pas retrouvées en temps normal dans les tissus sains mais sont rapidement recrutées et en grand nombre dans les tissus infectés.

- Les macrophages

Les monocytes sont des cellules sanguines issues de la différenciation des cellules myéloïdes, elles-mêmes issues de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Les monocytes sont les précurseurs sanguins des macrophages. Un macrophage est un monocyte ayant quitté la circulation sanguine, pour coloniser un tissu, par un phénomène d'extravasation. Ces macrophages tissulaires expriment, entre autre, à leur surface le marqueur CD11b spécifique des cellules de la lignée myéloïde, ainsi que le marqueur F4/80 spécifique des macrophages.

Les macrophages sont répartis de manière stratégique dans tous les tissus et constituent une première ligne de défense contre les micro-organismes. Grâce à de nombreux récepteurs de surface, ils ont la capacité de reconnaître de manière non spécifique les micro-organismes, ce qui entraîne leur phagocytose et l'activation du macrophage.

- Les GNN

Ce sont des cellules sanguines qui tout comme les monocytes et les macrophages appartiennent à la lignée myéloïde. Ils expriment donc à leur surface, le marqueur CD11b caractéristique de cette famille ainsi que le marqueur Ly6G spécifique des GNN.

Les GNN ne sont pas présents de manière physiologique au sein des tissus mais sont les premières cellules recrutées lors d'une infection. Leur recrutement se fait via des messagers chimiques, les cytokines, et leur passage dans les tissus se fait par un phénomène d'extravasation similaire à celui des monocytes. Une fois sur le lieu de l'infection les GNN reconnaissent de manière non spécifique les micro-organismes et les phagocytent. Cependant, contrairement aux macrophages, les GNN ne sont capables que d'une seule phagocytose et meurent suite à celle-ci.

- b. La phagocytose

La phagocytose est le mécanisme de destruction des bactéries par les macrophages et GNN. Les phagocytes expriment des récepteurs spécifiques de certains déterminants bactériens et leur interaction déclenche la phagocytose. C'est un processus actif se traduisant par l'émission de pseudopodes qui vont entourer le micro-organisme et finir par l'inclure dans le corps cellulaire. La vésicule contenant le micro-organisme est appelée phagosome et va ensuite fusionner avec d'autres vésicules, contenant de nombreux agents antibactériens. Citons, par exemple, le pH acide des lysosomes, les produits dérivés de l'oxygène, les défensines, les protéases et les lysosymes. Dans certains cas, lorsque les particules infectieuses sont trop volumineuses pour être internalisées par le phagocyte, ce dernier peut libérer dans le milieu extracellulaire des substances toxiques qui sont alors à l'origine de lésions tissulaires et d'une réponse inflammatoire importante.

- c. La réponse induite précoce : l'induction de la réponse inflammatoire

La phase inflammatoire se met en place lors d'une infection, elle se traduit par une vasodilatation, une activation endothéliale, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une coagulation intra-vasculaire localisée. Elle a pour but de recruter de nouvelles cellules efficaces pour tuer les micro-organismes, d'éviter la dissémination par voie sanguine et d'initier une cicatrisation tissulaire. Elle est induite par les phagocytes activés qui en parallèle de la destruction des micro-organismes par phagocytose, produisent des facteurs solubles (cytokines, chimiokines, médiateurs lipidiques).

Le macrophage activé sécrète un certain nombre de cytokines, qui vont avoir plusieurs effets sur la réponse inflammatoire. Ces cytokines sont responsables de l'activation des cellules endothéliales et des lymphocytes. Elles permettent également le recrutement d'autres cellules de l'immunité et leur guidage par chimiotactisme à travers les tissus jusqu'au lieu de l'infection. Enfin, les macrophages jouent un rôle de cellule présentatrice d'antigène pour les lymphocytes T. Une fois la bactérie phagocytée, ils exposent à leur surface certains peptides bactériens, présentés par des molécules du CMH qui pourront ensuite être reconnus par les lymphocytes T.

Les GNN activés sécrètent également des cytokines, pro et anti-inflammatoires qui régulent l'activité d'autres cellules du système immunitaire telles que les cellules dendritiques. Ils peuvent également excréter certains éléments contenus dans leurs granules favorisant la cicatrisation et la régénération tissulaire.

d. L'extravasation des cellules sanguines

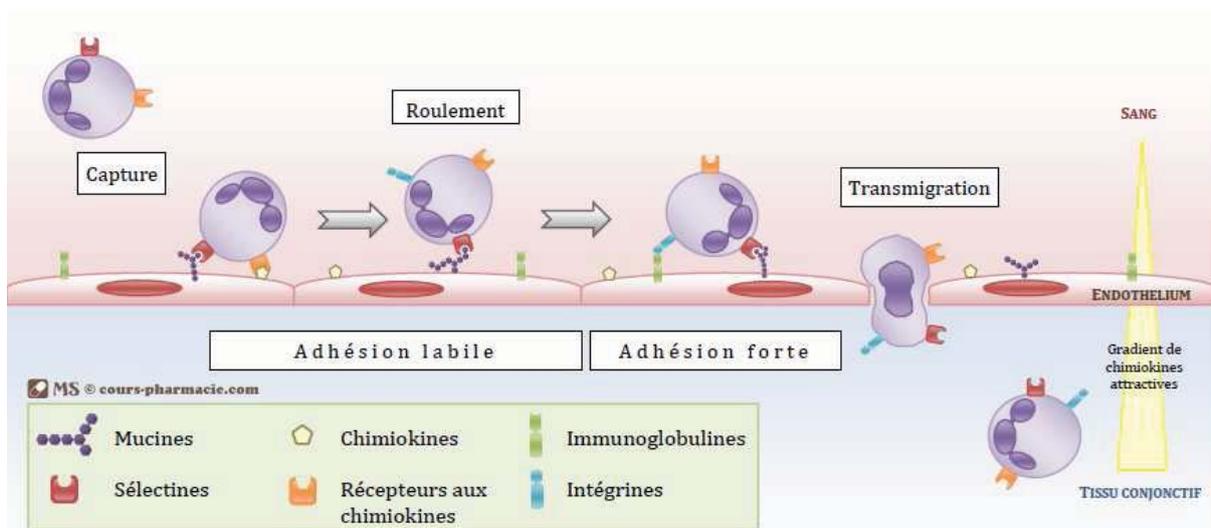


Figure 3 : Extravasation des cellules sanguines [Simon 2009]

Comme nous l'avons vu précédemment, les neutrophiles et les monocytes circulent à travers le réseau sanguin. Lors de l'introduction d'un pathogène, des facteurs sont émis par les macrophages, les cellules épithéliales et endothéliales dans le but d'alerter et de recruter les autres cellules de l'immunité. Les monocytes et les GNN sont les premiers recrutés puis les lymphocytes le sont dans un second temps, lors de l'intervention de l'immunité acquise.

Nous prendrons ici l'exemple de l'extravasation des GNN, mais le mécanisme est similaire pour les autres leucocytes. En temps normal, ils circulent au centre du vaisseau là où le courant est le plus rapide, lors de leur arrivée près d'un site infectieux, il y a une

vasodilatation qui provoque un ralentissement du flux et permet aux GNN d'entrer en contact avec l'endothélium vasculaire, c'est l'étape de capture. Ensuite, l'extravasation des GNN a lieu et se produit en 4 étapes :

- La première est nommée rolling (ou roulement) : elle correspond à l'interaction des GNN avec les sélectines de l'endothélium activé. Il s'agit de liaisons faibles et réversibles qui permettent aux GNN de rouler sur l'endothélium et de ralentir.
- La deuxième étape correspond à l'arrêt du GNN par une adhésion forte à l'endothélium, permise par l'interaction des intégrines, présentes à la surface des GNN, avec leurs récepteurs sur l'endothélium.
- La troisième est la diapédèse (ou transmigration) : le GNN passe du sang au tissu conjonctif en s'infiltrant entre les cellules endothéliales et la membrane basale.
- La dernière étape correspond à la migration intra-tissulaire du GNN vers le site infectieux. Il est alors guidé par un gradient de chimiokines fixées aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire.

3. Immunité acquise ou adaptative

C'est une immunité qui s'acquiert au cours de la vie, elle se met en place suite à l'exposition à une substance ou un micro-organisme. Elle est caractérisée par sa spécificité et sa mémoire, elle a la capacité de différencier les antigènes et est plus efficace à chaque nouvelle confrontation. Sa capacité de reconnaissance lui permet outre le fait de différencier les différents agresseurs, de faire la différence entre les éléments de l'organisme (le soi) et les éléments extérieurs (le non soi).

L'immunité acquise est composée de 3 mécanismes : l'immunité humorale, l'immunité cellulaire et la mémoire.

a. Immunité à médiation humorale et lymphocytes B

Les effecteurs de l'immunité humorale sont les lymphocytes B. Chacun porte un récepteur BCR spécifique d'un antigène donné. Lorsque le récepteur se lie à l'antigène, le lymphocyte se multiplie, c'est l'expansion clonale, et se différencie en plasmocytes. Ces derniers produisent des immunoglobulines, spécifiques de l'antigène rencontré et ce, en grande quantité. Ces immunoglobulines sont libérées dans la circulation sanguine et sont capables de se lier spécifiquement à l'antigène à l'origine de l'activation du lymphocyte et de leur production. Les immunoglobulines produites sont principalement de deux types, les IgM

qui interviennent dans un premier temps puis les IgG dans un second temps. Au niveau des muqueuses, des immunoglobulines particulières sont produites : les IgA.

Dans la réponse immunitaire antibactérienne, les anticorps ont principalement deux fonctions : la neutralisation des toxines, et la potentialisation de la phagocytose grâce à l'opsonisation des bactéries. L'opsonisation est la fixation d'anticorps à la surface des bactéries, ce qui va favoriser, voire permettre, l'ingestion des bactéries par les cellules phagocytaires. De plus, cet effet peut être renforcé par la fixation secondaire du complément. Ce mécanisme est particulièrement important vis-à-vis de la lutte contre les bactéries à multiplication extracellulaire.

b. Immunité à médiation cellulaire et lymphocyte T

Les lymphocytes T sont les effecteurs de l'immunité à médiation cellulaire. Les LT reconnaissent les cellules infectées. Ces dernières sont colonisées par un organisme intracellulaire qui est partiellement dégradé et dont certains peptides sont exposés à la surface de la cellule par des molécules du CMH.

On distingue deux types de lymphocytes T :

- Les LT cytotoxiques, reconnaissent les antigènes présentés par des molécules du CMH I et induisent la mort de la cellule infectée ainsi identifiée en provoquant son apoptose.
- Les LT auxiliaires, quant à eux, reconnaissent les antigènes présentés par des molécules du CMH II. Une fois activés, ils produisent un grand nombre de cytokines qui orientent et amplifient la réponse immunitaire. Ils participent ainsi à l'activation des lymphocytes B et des macrophages.

c. La mémoire

Il existe deux types de cellules mémoire, dérivant des deux types de lymphocytes.

- Les LB mémoire

Lors de la rencontre d'un LB avec un antigène, il se multiplie, puis certains de ses clones se différencient en plasmocytes et d'autres en LB mémoire. Les LB mémoire sont spécifiques de l'antigène responsable de leur production.

- Les LT mémoire

La majorité des lymphocytes T effecteurs produits lors d'une infection meurent une fois le pathogène éliminé. Un petit nombre survit et constitue ce qu'on appelle les LT mémoire.

Ces cellules mémoires permettent une réaction secondaire plus rapide et plus efficace que la première. Cette efficacité est due à plusieurs paramètres. Tout d'abord, les cellules mémoire spécifiques de l'antigène sont plus nombreuses et mieux réparties que les cellules naïves lors de la première infection, ce qui augmente les chances de rencontre entre les lymphocytes et l'antigène. De plus, elles possèdent un seuil d'activation plus bas que les cellules naïves et une meilleure affinité pour l'antigène. La mémoire permet donc une meilleure réponse immunitaire lors d'une deuxième infection par un même pathogène et est généralement protectrice.

Bien que nous venions d'étudier séparément l'immunité innée et l'immunité acquise ces deux mécanismes ne fonctionnent pas de manière totalement indépendante. Comme nous l'avons vu, les macrophages servent de cellules présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes. Ces derniers quant à eux stimulent les cellules de l'immunité innée via les cytokines qu'ils sécrètent et favorisent la phagocytose grâce à l'opsonisation des anticorps sur les bactéries. Il y a donc une réelle coopération entre ces deux mécanismes.

IV. Les enjeux de l'étude

Les infections bactériennes résultent d'une interaction complexe entre le pouvoir infectieux de la bactérie et les mécanismes de défense de l'hôte. Le résultat de l'infection est déterminé par les facteurs de virulence de la bactérie et les facteurs génétiques de l'hôte qui influent sa capacité à mettre en place une réponse immunitaire appropriée. L'élimination des bactéries par l'utilisation de substances antibiotiques et antibactériennes est aujourd'hui la principale méthode de lutte contre les infections bactériennes. Or, comme nous venons de le voir, les bactéries ont une capacité d'adaptation remarquable et leur capacité à établir des résistances aux antibiotiques est plus rapide que celle de l'homme à trouver de nouvelles molécules. Cette approche seule semble de plus en plus insuffisante et se traduit actuellement par de nombreux échecs thérapeutiques. Il est alors nécessaire d'envisager le problème sous un autre angle, celui de l'hôte. En effet, bien que les mécanismes généraux de l'immunité antibactérienne soient relativement bien connus, une grande variabilité de sensibilité interindividuelle aux infections bactériennes est observée, sans que les mécanismes mis en jeu ne soient élucidés. Il apparaît alors indispensable de comprendre ces mécanismes afin de mettre en place une démarche thérapeutique rationnelle et efficace.

Les mécanismes de résistance à l'infection impliquent en général un grand nombre de gènes et dépendent fortement de facteurs environnementaux. C'est pourquoi, la souris est classiquement utilisée comme modèle de laboratoire pour étudier la pathogenèse de l'infection ainsi que les mécanismes de défense de l'hôte. Il permet d'effectuer des études dans un environnement contrôlé et sur un grand nombre d'animaux. Les différentes lignées de souris sont plus ou moins sensibles aux infections bactériennes et, grâce à la bonne connaissance du génome murin, il est possible d'obtenir des individus génétiquement très proches, voire avec un génome déterminé (possibilité d'obtenir des souris exprimant ou n'exprimant pas certains gènes). Ces caractéristiques ont été utilisées dans de nombreuses études afin de mettre en évidence les gènes responsables de la résistance ou de la sensibilité d'une race par rapport à une autre. De plus, ceci permet également de déterminer les mécanismes de défense de l'hôte efficaces contre l'infection.

Le but de cette étude est de caractériser la sensibilité entre deux lignées de souris les DBA-2 et les C57Bl6 lors d'une infection par *S. aureus* par voie intra-péritonéale. Dans un premier temps, la survie et la clinique des deux races seront comparées afin de valider une

éventuelle différence de sensibilité. Puis, les charges bactériennes au sein de différents organes à différents temps post inoculation et pour différentes doses seront déterminées afin de quantifier le niveau de sensibilité de chaque lignée. Enfin, le nombre et la nature des cellules recrutées sur le lieu de l'infection (cavité péritonéale) seront caractérisés afin de déterminer des différences dans les mécanismes de défense innées entre les deux lignées.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet plus global visant à comprendre le rôle des cellules de l'immunité innée (GNN et macrophages) dans le contrôle des infections par *S. aureus*.

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes

1. Animaux

Des souris femelles C57Bl/6J et DBA/2 élevées par le laboratoire Janvier ont été utilisées. Pour chaque infection, l'âge des souris a été apparié. Toutes les souris bénéficient d'au moins une semaine d'adaptation avant le début des expériences.

2. Souche bactérienne

La souche de *S. aureus* HG001 rsbU+ dérivée de la souche NCTC8328 isolée en 1960 chez un patient atteint de septicémie a été utilisée dans cette étude [Herbert 2010].

Des bactéries congelées à -80°C sont mises en culture dans 10mL de bouillon tryptique de soja (TSB) à 37°C dans un incubateur rotatif pendant 16h. Le bouillon bactérien est ensuite dilué au 1/100^{ème} et remis en culture dans du RPMI-SVF 5% pendant 4h à 37°C dans l'incubateur rotatif. Les bactéries sont récoltées par centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm suivis de 2 lavages consécutifs avec du sérum physiologique puis mises en suspension dans du sérum physiologique contenant 5% de SVF. La concentration bactérienne de la suspension est déterminée par dépôt d'une série de dilution sur gélose chapman. Les colonies bactériennes sont dénombrées après une incubation de 24h à 37°C. La concentration est ensuite ajustée par dilution dans du PBS en fonction de l'inoculum souhaité.

3. Infections expérimentales

Les souris sont inoculées avec des doses variant de 4.10^7 CFU à $3,3.10^8$ CFU dans 0,1 à 0,4 mL de PBS. Les injections sont effectuées par voie intra-péritonéale avec des seringues sans volume mort de 1 mL.

4. Suivi des souris

Suite à l'infection, l'état général des souris est vérifié 4 fois par jour. A chaque visite sont notés la posture, l'activité, l'aspect des poils, l'ouverture des yeux et l'état d'embonpoint.

Les souris sont sacrifiées lorsqu'elles sont moribondes.

Afin de comparer les observations cliniques, nous avons établi un score clinique. Nous avons défini 5 critères révélateurs d'une atteinte de l'état général de la souris : le dos voûté, l'activité réduite, les poils hérissés, les yeux fermés et l'amaigrissement. Chaque critère est

pondéré à un taux de 0,20. Pour obtenir le score clinique, on comptabilise d'abord le nombre de souris présentant chaque critère, pondéré par 0,20 (par exemple si on observe 2 souris maigres et 3 souris avec le dos voûté et qu'aucun des autres critères n'est présent chez aucune des souris, on obtient une valeur de $2 \times 0,20 + 3 \times 0,20 = 1$). Le score clinique d'une lignée est la valeur ainsi obtenue divisée par le nombre de souris vivantes. On obtient donc un score compris entre 0 (aucune souris ne présente aucun des critères) et 1 (toutes les souris présentent tous les critères) révélant l'atteinte de l'état général des souris de chacune des lignées. (Si l'on reprend l'exemple précédent, pour un groupe de 5 souris, on obtient un score clinique de $1/5=0,20$).

5. Prélèvements

A différents temps post infection, de 4 heures à 6 jours selon les expériences, les souris infectées sont anesthésiées avec 100 μ L de mélange anesthésique (25 μ L de kétamine (Imalgène 1000), 25 μ L de xylozine (rompun 2%) et 50 μ L de Ringer Lactate) en intramusculaire dans la cuisse.

Tout d'abord, les prélèvements sanguins sont effectués à l'œil à l'aide d'une pipette pasteur lavée à l'EDTA 0,05Mol. Le sang prélevé est immédiatement déposé dans un eppendorf contenant 10 μ L d'EDTA à 0,25 Mol. La quantité de sang prélevée varie de 100 à 200 μ L par souris

Le lavage intra-péritonéal est effectué avec 5 mL de milieu de lavage (HBSS, SVF 0,2%, EDTA 5mMol), injectés dans la cavité péritonéale avec une seringue de 5mL et une aiguille de 18,5 G. Un léger massage abdominal est effectué avant de récupérer le liquide par le trou d'injection dans un tube sec de 15mL. Le volume de liquide obtenu varie de 1,5 mL à 4,5 mL.

A ce stade les souris sont disloquées avant d'être disséquées.

Lors de l'ouverture de la cavité abdominale, la présence ou l'absence de graisse est observée ainsi que la présence de fibrine dans la cavité et autour des organes. Ensuite, la présence d'abcès sur les reins, la rate, le diaphragme et l'aspect du foie sont également notés. Enfin, la cavité thoracique est ouverte, et la présence d'abcès sur les poumons et le péricarde est notée.

La rate et le foie sont prélevés et placés dans 5mL de milieu de lavage (HBSS, SVF 0,2%, EDTA 5mMol). De même les reins sont prélevés et placés chacun dans 1mL de ce même milieu.

6. Traitement et analyse du liquide de lavage péritonéal

a. Préparation des cellules du lavage péritonéal

Les cellules sont extraites du liquide lavage péritonéal par centrifugation (350g pendant 5 min) et reprises dans 1mL de milieu complet (RPMI, HEPES 10mMol, glutamax (glutamine 25mMol), SVF 10% décomplémenté (30 min à 56°C)). Une fois purifiées elles sont dénombrées sur cellules de Thoma.

b. Culture cellulaire

Des cellules issues du lavage péritonéal sont mises en culture en présence de gentamycine à la concentration de 100µg/mL pendant 2h à 37°C. Elles sont ensuite récupérées par centrifugation, lavées 2 fois dans du PBS.

c. Détermination des charges bactériennes

Les cellules issues du lavage péritonéal et de la culture en présence de gentamycine sont lysées dans 500µL d'eau bidistillée. Au moins 10 min après l'ajout de l'eau bi-distillée, les mélanges sont homogénéisés puis dilués successivement au dixième et étalés sur gélose chapman. Le surnageant de la culture cellulaire est également récupéré et étalé. Après 24h d'incubation à 37°C les colonies bactériennes sont dénombrées.

d. Analyse des populations cellulaires

L'analyse des populations cellulaires a été réalisée par cytométrie de flux. Pour chaque point de marquage, 10^5 cellules issues du lavage péritonéal sont lavées 2 fois avec du tampon FACS (PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA), puis incubées avec les anticorps 20 min à 4°C à l'abri de la lumière, puis lavées 2 fois avec le tampon FACS. L'acquisition se fait avec un FACSCalibur (Becton Dickinson) et le logiciel CellQuest. Les cellules mortes sont systématiquement exclues par utilisation du marqueur 7 AAD (BD). Pour chaque point, 2.10^4 cellules vivantes sont acquises. L'analyse se fait avec le logiciel Flow Jo. Les anticorps utilisés pour la cytométrie de flux sont détaillés ci-dessous (figure 4).

Molécules	Clone	Fluorochrome	Fournisseur
Ly6G	1A8	FITC	Pharmingen
CD11b	M1/70	PE	Pharmingen
CD11b	M1/70	APC	Pharmingen
CD49d	R1-2	PE	Pharmingen
F4-80	Cl : A3-1	APC	AbD Serotec

Figure 4 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie de flux

7. Détermination des charges bactériennes dans le sang et les tissus

Pour chaque prélèvement, des dilutions successives au dixième sont réalisées dans du PBS tween qui sont ensuite étalées sur gélose Chapman en triplicat. Après 24h d'incubation à 37°C les colonies bactériennes sont dénombrées.

1mL du surnageant du liquide de lavage péritonéal est dilué et étalé afin de déterminer la charge bactérienne dans la cavité péritonéale.

Les reins sont broyés dans le milieu de lavage où ils ont été déposés puis le broyat est dilué et étalé.

Le foie et la rate sont broyés dans les 5mL de milieu de lavage où ils ont été déposés puis 1mL du broyat est prélevé et centrifugé (1300rpm, 5min, 17°C). Le culot est repris dans 1 mL d'eau bi-distillée. Au moins 10 min après l'ajout d'eau, les échantillons sont dilués et étalés.

Le sang est mélangé à volume égal avec de l'eau bi-distillée. Au moins 10 min après l'ajout d'eau, les échantillons sont homogénéisés, dilués et étalés.

8. Tests statistiques

Les données sont présentées sous la forme de moyennes +/- SEM. Lorsque les groupes sont de taille suffisante (> 5) le test non paramétrique de Mann Whitney a été réalisé et les résultats sont considérés comme significativement différents lorsque $p < 0,05$.

II. Résultats

1. Caractérisation de la sensibilité des lignées de souris C57Bl6 et DBA-2 à une infection à S. aureus par voie intra-péritonéale

Tout d'abord, nous avons cherché à comparer le niveau de sensibilité à S. aureus des lignées de souris C57Bl6 et DBA-2 lors d'infection par voie intra-péritonéale. Pour cela, nous avons suivi, dans un premier temps, le taux de survie et les manifestations cliniques des souris de chaque lignée, sur une période de 4 jours, suite à une inoculation de 8.10^7 CFU de S. aureus par voie intra-péritonéale. Puis, dans un second temps, nous avons autopsié les souris survivantes, afin d'objectiver la sévérité de l'atteinte des différentes souris grâce à l'observation des modifications macroscopiques consécutives à l'infection.

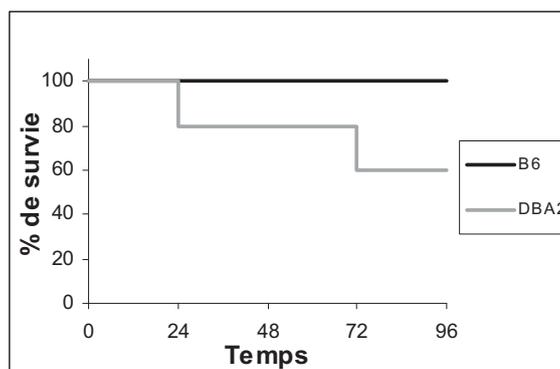


Figure 5 : Taux de survie des souris C57Bl6 et DBA-2 suite à une inoculation de 8.10^7 CFU de S. aureus (souche HG001) par voie intra-péritonéale.

Chaque groupe est composé de 5 souris

La courbe de mortalité ne révèle aucun décès chez les C57Bl6 contre deux chez les souris DBA-2 (24h et 72h) au cours de la période d'observation (120h) (figure 5).

Scores cliniques	J1	J2	J3	J4
DBA-2	1	1	0,81	0,67
C57Bl6	0,75	0,35	0	0

Figure 6 : Moyenne des scores cliniques (calculés comme indiqué dans le matériel et méthode) des souris C57Bl6 et DBA-2 au cours des 4 jours suivant une inoculation de 8.10^7 CFU de S. aureus (souche HG001) par voie intra-péritonéale.

Chaque groupe est composé de 5 souris.

Les suivis cliniques révèlent une atteinte importante des souris des deux lignées à 24h, avec une intensité plus importante chez les souris DBA-2 qui ont un score clinique de 1, que chez les souris C57Bl6 qui ont un score clinique de 0,75 (figure6). Les souris C57Bl6 amorcent une récupération clinique dès 48h (score de 0,35) et une récupération totale est observée à 72h. Les souris DBA-2 ne présentent qu'une très faible amélioration clinique au terme de la surveillance (score de 0,67 à 120h) associée à une cachexie importante, révélant la probable mise en place d'une infection chronique.

	C57Bl6					DBA-2		
Nb abcès Reins G/D	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	Nbx /Nbx	Nbx/Nbx	1/1
Foie	RAS	RAS	RAS	1 ab	1 ab	Jaune	Jaune	Jaune
Cavité thoracique	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	Nbx ab	Nbx ab	1 ab péricardique
Cavité abdominale	RAS	RAS	RAS	1 ab diaph	RAS	Fibrine++ nbx ab	Fibrine++ nbx ab	Fibrine +

Ab = abcès, diaph = diaphragmatique, Nb = nombre, Nbx = nombreux, RAS = aucune anomalie constatée.

Figure 7 : Modifications macroscopiques observées sur les principaux organes abdominaux et la cage thoracique lors de l'autopsie des souris survivantes 5 jours après une inoculation de 8.10^7 CFU de S. aureus (souche HG001) par voie intra-péritonéale.

Chaque groupe est composé de 5 souris.

L'autopsie des souris survivantes, réalisée au terme de la surveillance clinique, soit 5 jours post-infection, révèle des différences importantes entre les deux lignées de souris (figure7). Les DBA-2 présentent une atteinte généralisée de la cavité abdominale (fibrine en grande quantité, très nombreux abcès rénaux et diaphragmatiques) et de la cavité thoracique (abcès péricardiques et pulmonaires) ainsi qu'un foie ictérique. La majorité des C57Bl6 ne présentent aucune anomalie visible (3/5), deux d'entre elles présentent quelques abcès bien délimités, (localisés entre la rate et le foie et sur l'un des deux reins) sans aucun autre signe d'infection ou d'inflammation.

Ces observations nous permettent de conclure que les souris DBA-2 sont plus sensibles à l'infection par S. aureus par voie intra-péritonéale que les souris C57Bl6.

2. Dissémination systémique de *S. aureus* lors d'infection par voie intra-péritonéale

Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est dû, en grande partie, à sa capacité à coloniser les vaisseaux sanguins et à disséminer par voie sanguine. C'est pourquoi nous avons comparé la dissémination de la bactérie dans l'organisme, lors d'infections par voie intra-péritonéale chez les deux lignées de souris DBA-2 et C57Bl6 définies respectivement comme sensibles et résistantes dans ce modèle d'infection. Pour cela nous avons étudié la charge bactérienne au lieu d'infection (la cavité péritonéale), la bactériémie et les charges bactériennes de différents organes (les reins, le foie et la rate) à différents temps post infection et pour différentes doses.

a. Comparaison de la multiplication bactérienne au sein de la cavité péritonéale chez les souris des lignées C57Bl6 et DBA-2 au cours des 16 premières heures de l'infection

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la quantité de bactéries présentes au point d'inoculation, 4h et 16 h post infection, afin de déterminer si la résistance apparente des souris C57Bl6 vis-à-vis des DBA-2 est liée à une meilleure régulation de la multiplication bactérienne au sein même de la cavité péritonéale dès les premières heures de l'infection.

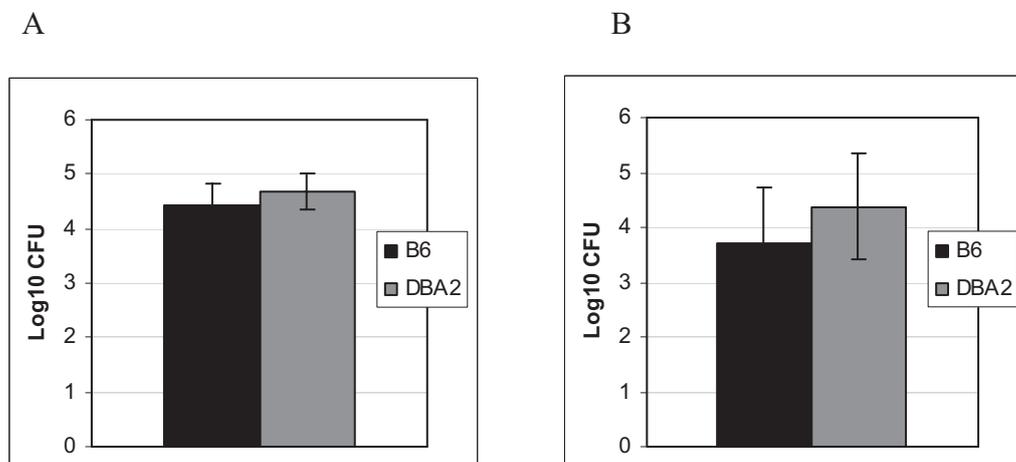


Figure 8 : Nombre de CFU observées après étalement sur gélose Chapman du surnageant obtenu par centrifugation du lavage péritonéal sur des souris infectées par *S. aureus* par voie intra-péritonéale

4h post-infection suite à une inoculation de $2,3 \cdot 10^8$ CFU (A) et 16h post-infection suite à une inoculation de $4,4 \cdot 10^7$ CFU (B). Pour chaque expérience les groupes sont composés de 3 souris de chaque lignée.

Les résultats présentés (Figure 8) ne montrent aucune différence significative dans la quantité de bactéries retrouvées dans les lavages péritonéaux à 4h (Figure 8A) et 16h post infection (Figure 8B). Ces résultats ont également été observés pour des doses de $1,6 \cdot 10^8$ CFU

et $2,3 \cdot 10^8$ CFU 4h post infection et $8 \cdot 10^7$, $1,4 \cdot 10^8$ et $3,3 \cdot 10^8$ 16h post infection (données non montrées).

Il n'y a donc pas de différence significative de charge bactérienne au niveau du site d'infection entre les deux lignées de souris dans les temps précoces de l'infection et ce quelle que soit la dose.

b. Evaluation de la bactériémie chez les souris C57Bl6 et DBA-2 au cours des 16 premières heures de l'infection

Dans un second temps, nous avons étudié la quantité de bactéries présentes par mL de sang, afin de déterminer une éventuelle différence dans la colonisation des vaisseaux et la dissémination par voie sanguine entre les deux lignées de souris.

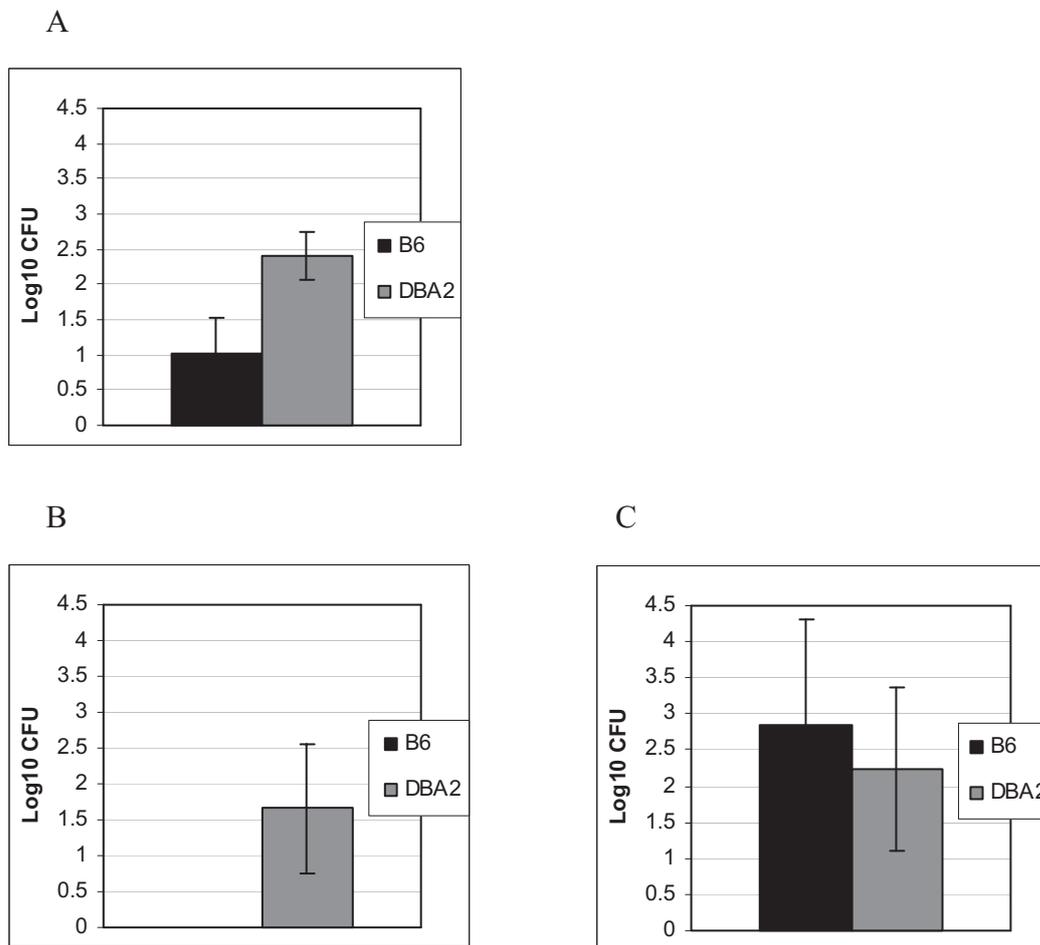


Figure 9 : Nombre de CFU observées par mL de sang après étalement sur gélose Chapman du sang prélevé sur des souris infectées par *S. aureus* par voie intra-péritonéale

4h post infection suite à une inoculation de $2,3 \cdot 10^8$ CFU (A) et 16h post infection suite à une inoculation de $4,4 \cdot 10^7$ CFU (B) et de $8 \cdot 10^7$ CFU (C). Pour chaque expérience les groupes sont composés de 3 souris de chaque lignée.

L'étude de la bactériémie 4h post infection montre que les souris DBA-2 ont une charge bactérienne circulante significativement plus élevée que les souris C57Bl6 pour des doses d'infection élevées $1,6 \cdot 10^8$ CFU (données non montrées) et $2,3 \cdot 10^8$ CFU (Figure 9A).

Cette différence n'est plus observée 16h post infection pour des doses de $8 \cdot 10^7$ CFU à $3,3 \cdot 10^8$ CFU (Figure 9C et données non montrées). Cependant, pour des doses plus faibles : $4 \cdot 10^7$ CFU (Figure 9B) on observe une bactériémie non détectable par notre méthode pour les souris C57Bl6 contrairement aux souris DBA-2.

Les souris C57Bl6 semblent plus efficaces que les souris DBA-2 pour limiter la dissémination par voie sanguine de *S. aureus* dans les temps très précoces de l'infection (4 premières heures).

c. Evaluation de la colonisation des organes par *S. aureus* suite à la dissémination par voie sanguine

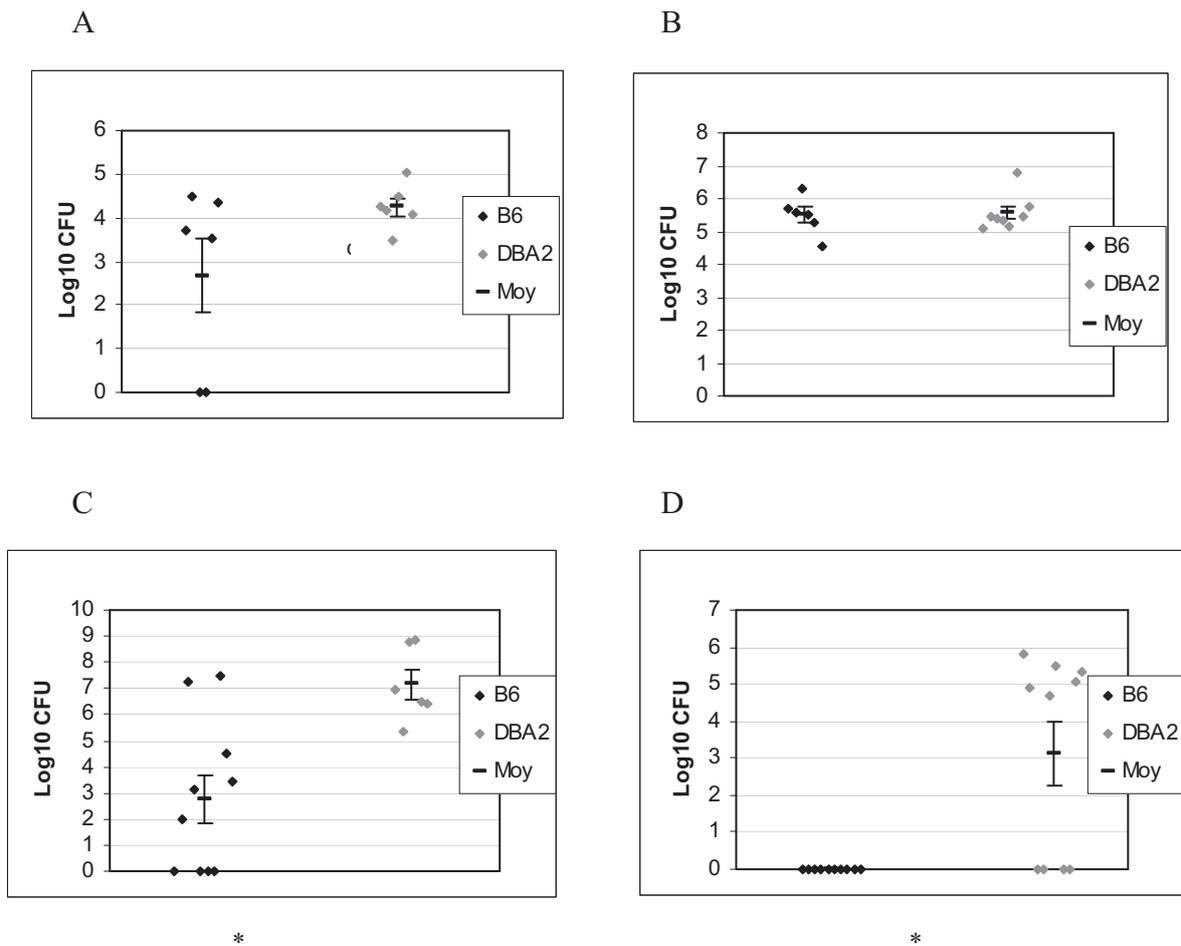
Afin de quantifier la dissémination de la bactérie dans l'organisme, nous avons étudié les charges bactériennes de plusieurs organes. Tout d'abord, nous avons étudié les reins, connus pour être un organe cible de *S. aureus* [Von Köckritz-Blickwede 2008]. Nous avons également étudié un organe filtre, le foie et enfin un organe lymphoïde secondaire, la rate.

- Caractérisation de l'atteinte rénale

Lors de l'étude des reins, en plus de la mesure des charges bactériennes, nous avons noté la présence éventuelle d'abcès sur ces derniers, lors de leur prélèvement.

L'examen macroscopique a révélé la présence d'abcès sur les reins plusieurs jours post infection (J4-J5) ce qui n'est pas le cas au cours des 16 premières heures de l'infection. De plus, ces abcès sont retrouvés plus fréquemment et en plus grand nombre sur les souris DBA-2 que sur les souris C57Bl6 (Figure 7 et données non montrées).

Ces observations confirment le fait que le rein est une cible privilégiée de *S. aureus* et valident l'intérêt de l'étude des charges bactériennes rénales afin de quantifier ces différences.



* = p<0,05

Figure 10 : Charges bactériennes par rein prélevé sur des souris C57Bl6 et DBA-2 à différents temps post infection suite une inoculation de *S. aureus* par voie intra-péritonéale

4h post infection avec une dose de $1,6 \cdot 10^8$ CFU (A), 16h post infection avec une dose de $3,3 \cdot 10^8$ CFU (B), 5j post infection avec une dose de $8 \cdot 10^7$ CFU (C) et 6j post infection avec une dose de $4,4 \cdot 10^7$ (D).

4h post infection pour une dose relativement élevée ($1,6 \cdot 10^8$ CFU) (Figure 10A), les souris DBA-2 semblent avoir des charges bactériennes rénales plus importantes que les souris C57Bl6. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative ($p > 0,05$).

Les résultats obtenus 16h post infection ne permettent pas de confirmer cette observation. En effet, aucun écart significatif n'a pu être mis en évidence pour des doses allant de $4,4 \cdot 10^7$ CFU et $3,3 \cdot 10^8$ CFU (données non montrées et figure 10B).

Par contre, l'étude des charges bactériennes rénales plusieurs jours après l'inoculation (J4-J6) montre que les souris DBA-2 ont un nombre significativement plus élevé de bactéries dans les reins que les souris C57Bl6 pour des doses allant de $4,4 \cdot 10^7$ CFU à $1,1 \cdot 10^8$ CFU (Figure 10C, 10D et données non montrées).

Ces observations suggèrent que l'étude des charges bactériennes rénales dans les temps précoces de l'infection (<24h) semble moins informative que plusieurs jours post infection pour mettre en évidence la différence de sensibilité de ces deux lignées.

Par ailleurs, on note l'absence de bactéries dans la totalité des reins des souris C57Bl6 six jours post infection lors d'une inoculation à $4,4.10^7$ CFU contre 4 reins sur 10 stériles chez les souris DBA-2 (figure 10D). Cette absence de bactéries peut être due à deux phénomènes, l'absence d'atteinte des reins par la bactérie, ou son élimination. Le fait que les deux lignées de souris présentent une atteinte rénale identique pour cette même dose à 16h post infection, prouve que c'est bien une meilleure élimination qui est responsable de cette différence 6 jours après l'infection.

Il semblerait donc que les différences observées entre les charges rénales des souris DBA-2 et des souris C57Bl6 plusieurs jours post infection, soient dues en partie à une meilleure élimination de la bactérie par les souris C57Bl6.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que les souris DBA-2 présentent une atteinte rénale plus importante que les souris C57Bl6 principalement caractérisée par une élimination plus lente des bactéries.

- Caractérisation des charges bactériennes hépatiques

Le foie est un organe filtre richement irrigué, c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier sa colonisation par *S. aureus* dans le cadre de l'étude de la dissémination par voie sanguine de la bactérie.

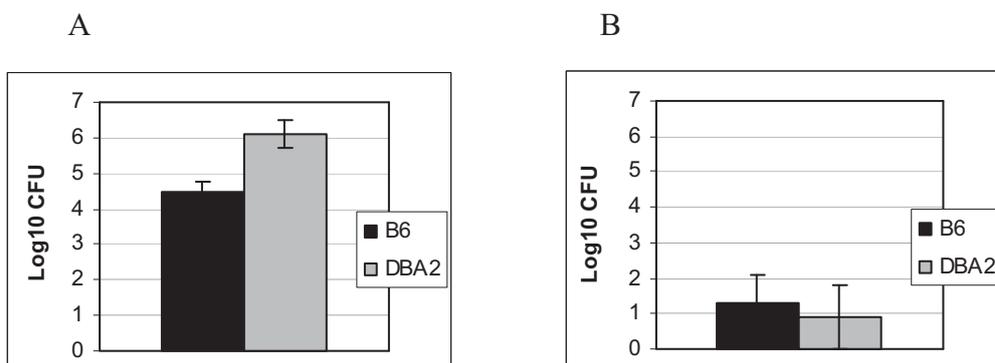


Figure 11 : Nombre de CFU observés après étalement sur gélose Chapman, du broyat de foie

Les foies sont prélevés sur des souris C57Bl6 et DBA-2 suite une inoculation de *S. aureus* par voie intrapéritonéale : 5 jours post infection avec une dose de 8.10^7 CFU (A) et 6 jours post infection avec une dose de $4,4.10^7$ CFU (B). Les groupes sont constitués de 5 souris de chaque lignée

L'étude des charges bactériennes hépatiques plusieurs jours post infection ne révèle pas de différence significative pour une dose de $4.4.10^7$ CFU (figure 11B). Cependant, pour une dose de 8.10^7 CFU (Figure 11A) on observe que les foies des souris C57Bl6 contiennent significativement moins de bactéries que ceux des souris DBA-2.

On peut attribuer l'absence d'écart significatif de la première expérience à une dose trop basse et ainsi supposer que l'atteinte hépatique des souris DBA-2, 5 jours post infection, est plus importante que celle des souris C57Bl6. Cependant, l'absence de répétition de cette expérience ne permet pas de conclure avec certitude.

- Caractérisation des charges bactériennes de la rate

La rate est un organe très vascularisé, c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier sa colonisation par *S. aureus* dans le cadre de l'étude de la dissémination par voie sanguine de cette bactérie. De plus, comme c'est un organe lymphoïde secondaire, une différence de colonisation de cette dernière pourrait révéler une différence dans la prise en charge des bactéries par le système immunitaire des souris des deux lignées.

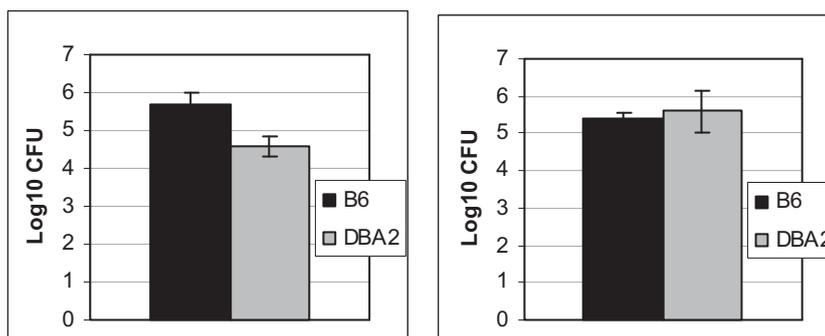


Figure 12 : Nombre de CFU observés après étalement sur gélose Chapman, du broyat de rate

Les rates sont prélevées sur des souris C57BL6 et DBA-2 suite une inoculation de *S. aureus* par voie intrapéritonéale : 4h post infection suite à une inoculation de $7,7.10^7$ CFU (A) et 16h post infection suite à une inoculation de $3,3.10^8$ CFU (B). Pour chaque expérience les groupes sont composés de 3 souris de chaque lignée.

On note une atteinte significativement plus importante de la rate chez les souris C57BL6 4h post infection pour des doses et $7,7.10^7$ CFU (figure 12A) et $2,3.10^8$ CFU (données non montrées). Cependant, on n'observe plus de différence significative 16h post infection pour des doses allant de $4,4.10^7$ CFU à $3,3.10^8$ CFU (figure 12B et données non montrées).

L'étude des charges bactériennes de la rate dans les temps précoces de l'infection (<24h) ne permet pas de mettre en évidence la différence de sensibilité de ces deux lignées.

3. Suivi de la mise en place de la réponse immunitaire innée dans la cavité péritonéale

Lors d'infection bactérienne, la mise en place des mécanismes de l'immunité innée sur le lieu de l'infection est le premier moyen de défense de l'organisme. Cette mise en place est notamment caractérisée par le recrutement de cellules effectrices de l'immunité sur le lieu de l'infection, et la prise en charge des bactéries par ces dernières. Nous avons donc étudié la mise en place de ces mécanismes au sein de la cavité péritonéale, dans les temps précoces de l'infection. Pour cela, nous avons suivi l'intensité du recrutement cellulaire, la nature des cellules recrutées et la prise en charge des bactéries par ces dernières.

a. Caractérisation de l'intensité du recrutement cellulaire dans la cavité péritonéale

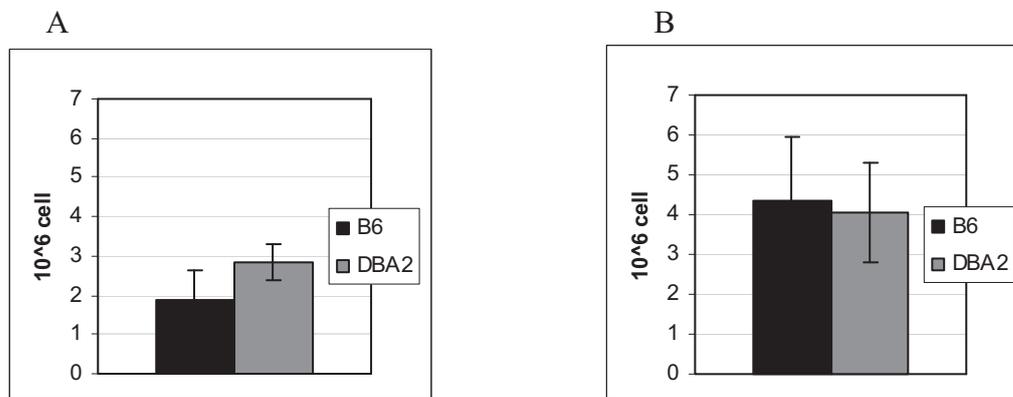


Figure 13 : Nombre de cellules observées, par mL de lavage péritonéal des souris infectées

Le dénombrement est effectué sur cellule de Thoma. 4h post infection suite à une inoculation de $1,6 \cdot 10^8$ CFU (A) et 16h post infection suite à une inoculation de $1,4 \cdot 10^8$ CFU (B). Pour chaque expérience les groupes sont composés de 3 souris de chaque lignée.

Les résultats présentés figure 13 ne montrent pas de différence significative concernant le nombre de cellules récupérées lors des lavages péritonéaux à 4h et 16h post infection. Nous avons obtenu des résultats similaires pour des doses allant de $4,4 \cdot 10^7$ CFU à $3,3 \cdot 10^8$ CFU (données non montrées).

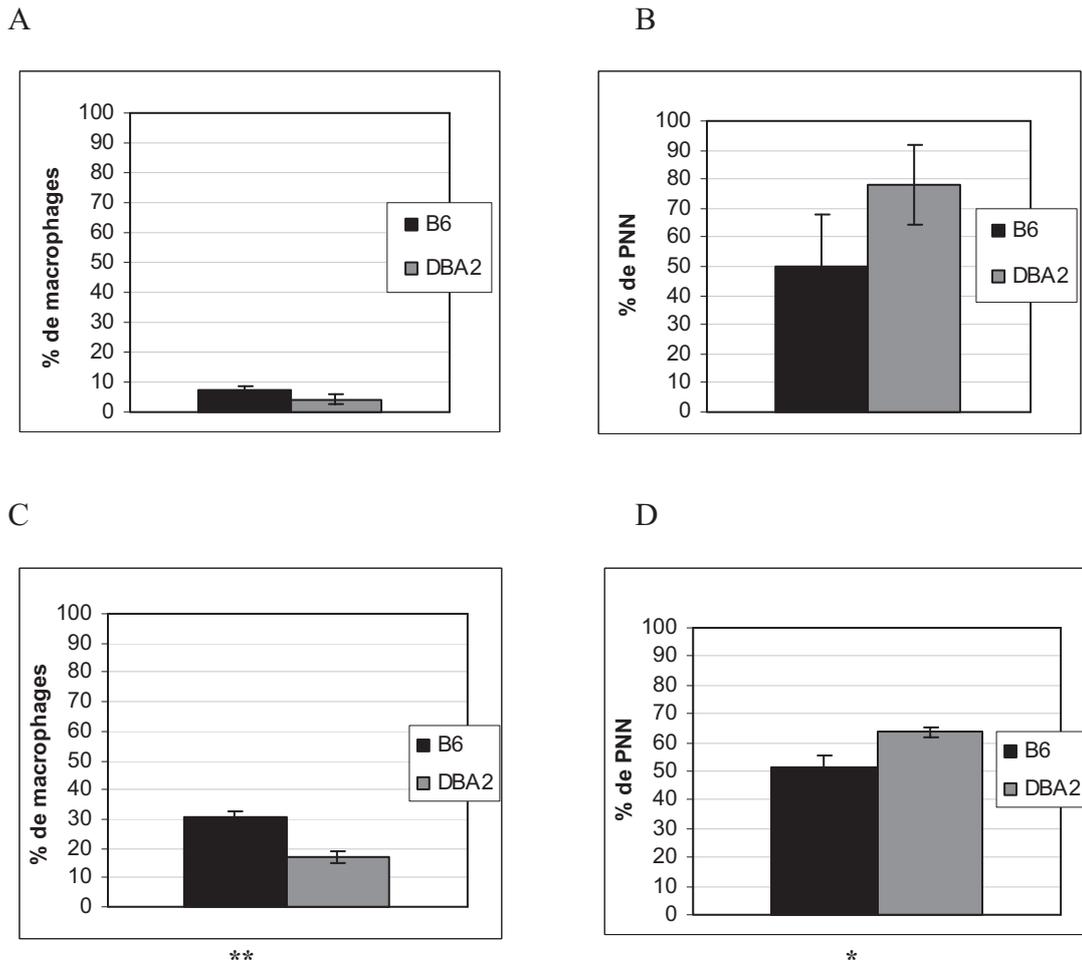
On peut donc conclure que l'intensité du recrutement cellulaire est identique pour les deux lignées de souris au cours des 16 premières heures de l'infection et ce, quelle que soit la dose inoculée.

b. Caractérisation de la nature des cellules recrutées dans la cavité péritonéale

Les principales cellules effectrices de la réponse immunitaire innée sont les phagocytes, composés des macrophages et des granulocytes neutrophiles (GNN). Nous avons donc décidé de caractériser, par cytométrie de flux, les cellules présentes dans le lavage péritonéal. Pour cela, nous avons sélectionné dans un premier temps les cellules ayant une taille et une granulosité compatibles avec celles des cellules de la lignée blanche et exprimant le marqueur CD11b, caractéristique des monocytes et des neutrophiles. Cette population CD11b⁺ est composée de cellules d'origine monocyttaire ou granulocytaire. Dans un second temps, les marqueurs F4/80 et Ly6G ont été utilisés afin de différencier les populations de macrophages et de neutrophiles. Suite à ces marquages, deux populations apparaissent comme largement majoritaires. Elles constituent, à elles deux, 78% (+/-9%) de la population sélectionnée (données non montrées). Il s'agit :

- Des cellules CD11b⁺, LY6G⁺ et F4-80⁻, qui représentent les granulocytes neutrophiles (GNN).
- Des cellules CD11b⁺ LY6G⁻ et F4-80⁺ qui représentent les macrophages.

Nous avons ensuite comparé la proportion de ces deux populations au sein de la population cellulaire recrutée chez les 2 lignées de souris.



* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Figure 14 : Proportions de macrophages (CD11b+ Ly6G- F4/80+) et de neutrophiles (CD11b+ Ly6G+ F4/80-) chez les 2 lignées souris infectées par *S. aureus* par voie intra-péritonéale

4h post infection suite à une inoculation de $2,3 \cdot 10^8$ CFU (A1 et A2) et 16h post infection suite à des inoculations avec des doses allant de $4,4 \cdot 10^7$ CFU à $3,3 \cdot 10^8$ CFU (B1 et B2). Les résultats montrent le pourcentage de cellules ly6G+ ou F4-80 par rapport à la population totale des CD11b+.

Lorsque l'on observe les cellules récoltées 4h post infection, on note une proportion de macrophages plus importante chez les souris C57Bl6 que chez les souris DBA-2 et à l'inverse, plus de GNN chez les souris DBA-2 que chez les souris C57Bl6. Cependant ces différences, bien que marquées, n'apparaissent pas comme statistiquement significatives.

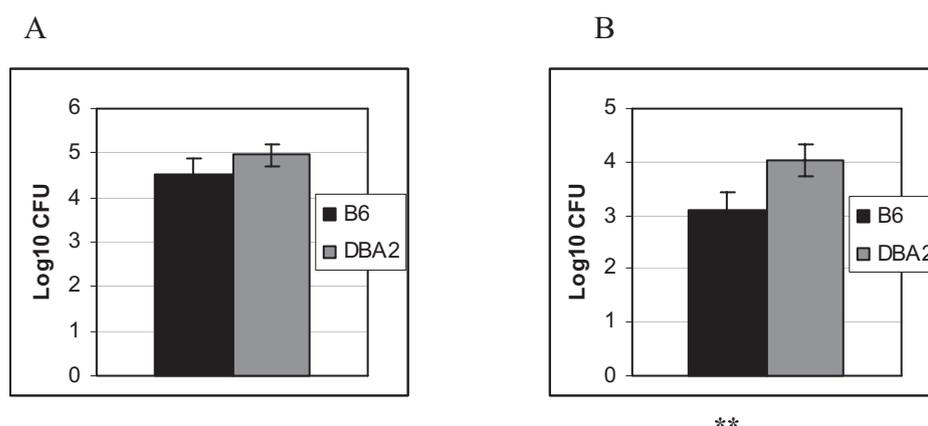
Le nombre de cellules recrutées, 16h post-infection ne semble pas lié à la dose inoculée (données non montrées). C'est pourquoi, afin d'obtenir des groupes de taille statistiquement significative, nous avons regroupé les mesures faites à 16h post infection pour des doses d'inoculation allant de $4,4 \cdot 10^7$ CFU à $3,3 \cdot 10^8$ CFU (8 souris de chaque lignée). Les résultats présentés figure 14B montrent que les souris DBA-2 recrutent significativement plus de neutrophiles que les souris C57Bl6. Les souris C57Bl6 quant à elles, présentent une quantité de macrophages presque 2 fois supérieure à celle observée chez les souris DBA-2.

On observe donc deux populations cellulaires significativement différentes entre les deux lignées de souris à 16h post infection. Cette différence de recrutement cellulaire témoigne d'une différence dans la mise en place de l'immunité innée antibactérienne chez ces deux lignées de souris.

c. Caractérisation de la prise en charge des bactéries par les cellules de l'immunité, recrutées au sein de la cavité péritonéale

Dans un premier temps, nous avons mesuré la charge bactérienne associée aux cellules, afin de déterminer si le rapport cellules/bactéries est identique pour les deux lignées de souris. La charge bactérienne associée aux cellules est le nombre de CFU observées après étalement du lysat des cellules récoltées lors du lavage péritonéal. Ces dernières sont récupérées par centrifugation, on prend donc en compte les bactéries vivantes à l'intérieur des cellules et les bactéries liées à la surface des cellules. (Figure 15A)

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer la répartition des bactéries entre le compartiment intracellulaire et la surface des cellules. Pour cela nous avons comptabilisé le nombre de bactéries intracellulaires vivantes et capables de former des colonies, pour un nombre de cellules identique. Afin que seules les bactéries intracellulaires persistent, avant d'être lysées et étalées, les cellules ont été mises en culture pendant deux heures en présence de gentamycine, un antibiotique efficace contre *S. aureus* et exclusivement extracellulaire (Figure 15B). De plus, afin de contrôler l'efficacité de l'antibiotique sur les bactéries extracellulaires, le surnageant de la culture a également été étalé. Aucune colonie n'a pu être observée après 24h d'incubation (données non montrées).



** = p<0,01

Figure 15 : A : Bactéries associées aux cellules - B : Bactéries intracellulaires

A : Nombre de Log10 de CFU observées suite à l'étalement du lysat de 10^6 cellules isolées par centrifugation du lavage péritonéal. Moyennes obtenues sur des groupes de 15 souris.

B : Nombre de Log10 de CFU observées après étalement du lysat de 10^6 cellules extraites par centrifugation du lavage péritonéal et cultivées 2h en présence de gentamycine à 37°C. Moyennes obtenues pour 21 souris de chaque lignée

Les résultats présentés sont les moyennes de données obtenues suite à plusieurs infections, effectuées à 4 h et 16h post infection, pour des doses d'inoculum allant de $4,4.10^7$ CFU à $3,3.10^8$ CFU.

Tout d'abord, on note que le nombre de bactéries associées aux cellules n'est pas significativement différent entre les deux lignées de souris (Figure 15A).

Ensuite, le fait que l'on observe des colonies après étalement du lysat de cellules à T2 prouve l'existence de bactéries vivantes et capables de former des colonies à l'intérieur des cellules et ce, pour les deux lignées de souris. Ceci met en évidence la capacité des bactéries à pénétrer à l'intérieur des cellules et à y survivre.

Enfin, le nombre de bactéries intracellulaires est significativement plus élevé chez les souris DBA-2 que chez les souris C57Bl6, ce qui signifie que *S. aureus* pénètre et survit plus facilement au sein des cellules des souris DBA-2 (Figure 15B)

On peut donc conclure que le nombre de bactéries associées aux cellules est équivalent pour les deux lignées de souris, cependant leur répartition est différente. Bien que *S. aureus* soit capable de pénétrer et de survivre à l'intérieur des cellules des deux lignées de souris, ce phénomène est significativement plus important chez les souris DBA-2 que chez les souris C57Bl6, ce qui se traduit par une plus grande proportion de bactéries intracellulaires chez les souris DBA-2.

DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent une plus grande sensibilité des souris DBA-2 par rapport aux souris C57Bl6 lors d'infection par *S. aureus* par voie intra-péritonéale. Chez les souris DBA-2 on observe une atteinte clinique sévère et persistante ainsi que de la mortalité tandis que chez les souris C57Bl6 une récupération clinique totale est observée 48 heures post infection. Alors qu'aucune différence de charge bactérienne au point d'infection entre les souris des deux lignées n'est constatée, la dissémination systémique de *S. aureus* est significativement différente entre les deux lignées. Dans un premier temps (4h post infection), la dissémination par voie sanguine, objectivée par la bactériémie, est plus importante chez les souris DBA-2 que chez les souris C57Bl6. Puis dans un second temps (16h post infection), elle est équivalente, la bactériémie et les charges bactériennes rénales étant similaires chez les souris des deux lignées. Enfin, les charges bactériennes rénales plusieurs jours post infection montrent une élimination des bactéries bien plus avancée chez les souris C57Bl6 que chez les souris DBA-2. Les souris DBA-2 sont donc plus sensibles que les souris C57Bl6. Elles présentent une atteinte clinique plus sévère et une dissémination systémique plus précoce que les souris C57Bl6 ainsi qu'un défaut d'élimination des bactéries qui se traduit par une atteinte clinique persistante.

La dissémination plus précoce chez les souris DBA-2 que chez les souris C57Bl6 suggère une différence de mise en place de la réponse immunitaire innée et locale. Cette supposition est confirmée par l'étude des cellules de la cavité péritonéale au cours des 16 premières heures de l'infection. Alors que les souris DBA-2 recrutent majoritairement et massivement des GNN, les souris C57Bl6 présentent un profil cellulaire polymorphe caractérisé par une population de macrophages importante. Bien que cette différence de recrutement ne soit pas directement corrélée au nombre de bactéries sur le lieu d'infection (dans les 16 premières heures post infection), le recrutement massif de GNN est quant à lui corrélé avec un plus grand nombre de bactéries vivantes en position intracellulaire.

Au cours de cette étude nous avons étudié différents paramètres chez les lignées de souris C57Bl6 et DBA-2 à différents temps post infection (4h, 16h et plusieurs jours) et pour différentes doses d'infection (de $4,4.10^7$ CFU à $2,3.10^8$ CFU), dans le but de caractériser les différences de sensibilité entre les deux lignées lors d'infection par voie intra-péritonéale.

Ceci nous a permis de déterminer une dose d'inoculation idéale et les paramètres les plus significatifs pour révéler les différences de sensibilité.

Dans un premier temps, nous avons donc pu déterminer l'influence de la dose d'inoculation sur la différence de sensibilité des deux lignées. Ainsi, lors de l'étude des charges rénales plusieurs jours post infection, la dose intermédiaire de 8.10^7 CFU apparaît comme idéale car l'écart des charges bactériennes entre les deux lignées est statistiquement plus significatif que lors d'inoculation avec une dose plus élevée de $1,1.10^8$ CFU ou avec une dose plus faible de $4,4.10^7$ CFU. Cette observation est également faite lors de l'étude des charges bactériennes rénales 16h post infection, mettant en avant une différence significative uniquement pour une dose de 8.10^7 CFU. On peut donc supposer que 8.10^7 CFU est une dose idéale au-dessus de laquelle les souris résistantes deviennent à leur tour sensibles et au-dessous de laquelle les souris sensibles peuvent résister à l'infection.

Dans un second temps, l'étude des charges bactériennes à différents temps post infection nous ont permis de déterminer les tissus les plus révélateurs de la différence de sensibilité des deux lignées de souris au cours du temps. Ainsi, on observe que la bactériémie est un bon indicateur de la différence de résistance des souris dans les temps très précoces de l'infection (4h post inoculation). La nature des cellules recrutées témoigne de la mise en place d'une réponse immunitaire différente chez les deux lignées 16h post infection. De même, les charges bactériennes rénales plusieurs jours post infection témoignent particulièrement bien de la meilleure élimination des bactéries chez les souris résistantes. A l'inverse, les charges bactériennes de la rate et du foie ne sont pas apparues comme révélatrices des différences de sensibilité.

La comparaison des résultats de différentes études visant à caractériser les différences de sensibilité des lignées de souris C57Bl6 et DBA-2 n'est pas forcément aisée car les souches utilisées, les doses et les voies d'administrations diffèrent d'une étude à l'autre.

L'influence de la souche choisie est particulièrement importante car les souches de *S. aureus* peuvent avoir des virulences très différentes. Par exemple, la présence du gène *sar* est responsable de la capacité de *S. aureus* à provoquer le recrutement des neutrophiles, à y pénétrer et à survivre à l'intérieur des vacuoles de ces derniers. Les mutants ne possédant pas ce gène sont alors incapables de détourner la réponse immunitaire et présentent une virulence atténuée [Gresham 2000]. De même, il a été montré que certains polysaccharides de la capsule de *S. aureus*, CP8 et CP5, sont capables d'orienter la réponse immunitaire [Tzianabos 2001]. En effet, ils sont responsables de l'activation des LT4, eux-mêmes responsables du

recrutement des GNN par l'intermédiaire de cytokines CXCL [Mcloughlin 2006]. Cette interaction a pour conséquence la formation d'abcès favorisant la multiplication de la bactérie [Mcloughlin 2006].

Il apparaît donc que la nature de la souche, par son influence sur la réponse immunitaire, est directement liée à la virulence de la bactérie et donc à sa capacité à provoquer des infections plus ou moins graves chez un individu. La souche utilisée ici possède un gène *sar* fonctionnel. On peut donc supposer qu'elle est capable de coloniser les GNN et d'y survivre. Cette supposition est confirmée par l'obtention de bactéries vivantes après 2 heures de mise en culture des cellules de la cavité péritonéale en présence de gentamycine. De plus, grâce à la réparation du gène *Rsbu*, cette souche présente une virulence nettement supérieure à celle de la souche d'origine, NTC8325, ainsi qu'une régulation des exo-protéines proche de celle des souches sauvages. Elle apparaît donc comme un bon modèle pour l'étude de la virulence de *S. aureus* [Herbert 2010]. Les études avec lesquelles nous allons comparer nos résultats utilisent le plus souvent la souche SH1000 issue de la même lignée, NTC8325, et ayant également subi une réparation du gène *Rsbu*. [Herbert 2010]. On peut alors supposer que la virulence de ces souches est similaire. Cependant, le fait que la souche HG001 n'est pas été irradiée aux UV, la rend plus stable que SH1000.

La voie d'administration est également à prendre en compte lors de la comparaison des études. En effet, elle va être responsable d'une modification de la cinétique de dissémination de la bactérie. Dans notre étude, bien que la dissémination par voie sanguine soit retardée chez les C57BL/6, 16 heures post infection elle est équivalente chez les souris des deux lignées, ce qui nous permet de comparer nos résultats avec ceux obtenus lors de modèles expérimentaux étudiant l'inoculation par voie intraveineuse. Cependant, la dissémination dans les organes (par exemple les reins) sera retardée lors d'infection par voie périphérique (par voie intra-péritonéale et sous-cutanée) par rapport à une inoculation par voie intraveineuse. En effet, lors d'infection par voie intraveineuse, les différences apparaissent dans les 24 premières heures [Von Kockritz-Blickwede 2008] alors qu'elles n'apparaissent que plusieurs jours post infection dans le cas des infections sous-cutanées et intra-péritonéale [Nippe 2010].

Tout d'abord, notre modèle d'étude a mis en évidence une sensibilité plus importante des souris DBA/2 par rapport aux souris C57BL/6 lors d'infection par *S. aureus* par voie intra-péritonéale. Cette sensibilité est caractérisée principalement par une expression clinique et une atteinte rénale plus sévères et plus persistantes chez les souris DBA/2 que chez les souris

C57Bl6. Ces résultats sont en accord avec un modèle ayant étudié la sensibilité de ces deux lignées de souris suite à des infections par voie intraveineuse [Von Köckritz-Blickwede 2008]. Cependant, ils sont en contradiction avec ceux d'une étude utilisant le modèle d'infection sous-cutanée, où les souris C57Bl6 apparaissent comme significativement plus sensibles que les souris DBA-2 avec une expression clinique bien plus importante et plus longue [Nippe 2010]. Bien que les résultats de ces études soient sur la relative sensibilité des lignées C57Bl6 et DBA-2 soient contradictoires, tout comme dans notre étude, les reins apparaissent comme un organe cible particulièrement intéressant pour objectiver la dissémination de *S. aureus* dans l'organisme ainsi que les différences de sensibilité [Von Köckritz-Blickwede 2008, Nippe 2010]. En effet, les charges bactériennes rénales sont toujours en corrélation avec les observations cliniques et souvent avec une atteinte histopathologique et fonctionnelle de l'organe (présence d'abcès (dans notre étude), de zones de destruction tissulaire et augmentation des marqueurs d'insuffisance rénale [Von Köckritz-Blickwede 2008]). Les poumons et nœuds lymphatiques apparaissent également comme des organes intéressants pour déterminer les différences de dissémination de la bactérie au sein de l'organisme entre les différentes lignées [Von Köckritz-Blickwede 2008, Nippe 2010]. Dans notre étude, bien que les charges bactériennes pulmonaires ne soient pas étudiées, on note la présence d'abcès au sein de la cage thoracique des souris DBA-2, contrairement aux souris C57Bl6 qui ne présentent aucune atteinte des organes thoraciques.

Ensuite, notre étude du recrutement cellulaire nous indique que la différence entre les souris sensibles et résistantes ne réside pas dans le nombre de cellules recrutées au point d'injection 16 heures post infection, mais dans la nature des cellules recrutées.

Dans la littérature, il a été décrit un recrutement cellulaire plus important chez les souris sensibles que chez les souris résistantes 24 heures post infection lors d'infection en intra-péritonéale [Gresham 2000]. On peut alors supposer que l'absence de résultats significatifs dans notre étude est due à une récolte trop précoce des cellules, alors que le recrutement cellulaire est en cours.

Les proportions de macrophages et GNN ne deviennent significativement différentes que 16h post infection, ce qui suppose que les différences observées sont bien la conséquence d'un recrutement cellulaire différent entre les deux lignées. De plus, des modèles d'infection à *S. aureus* en sous-cutané ont mis en évidence un recrutement massif de neutrophiles au cours des 24 premières heures, contrairement aux monocytes qui n'arrivent sur les lieux de

l'infection qu'à partir du 2^{ème} jour [Mcloughlin 2006]. Ces données suggèrent que les différences observées sont majoritairement dues à un recrutement de neutrophiles plus important chez les souris DBA-2 par rapport aux souris C57BL6. Donc dans notre étude, la sensibilité des souris DBA-2 est associée à un recrutement massif de GNN. Cette corrélation a déjà été mise en évidence lors d'infection par *S. aureus* par voie intra-péritonéale [Gresham 2000]. A l'inverse, dans le cadre d'infections cutanées, les résultats concernant les conséquences du recrutement massif de neutrophiles sont controversés. Certaines études relient le recrutement rapide de neutrophiles à la capacité de résistance à l'infection [Nippe 2010] et d'autres l'identifient comme un mécanisme délétère pour l'organisme, à l'origine d'une multiplication bactérienne importante et de la formation d'abcès [Mcloughlin 2006].

Enfin, notre étude met en évidence un nombre de bactéries vivantes au sein des cellules plus élevé chez les souris DBA-2 que chez les souris C57BL6. Cette différence peut être attribuée à deux phénomènes : soit à une différence de bactéricidie des cellules des souris C57BL6 et des souris DBA-2, à l'origine d'une élimination des bactéries plus importante chez les souris C57BL6 au cours des deux heures de mise en culture ; soit à une différence de répartition des bactéries, avec un plus grand nombre en position intracellulaire et donc protégées du traitement à la gentamycine chez les souris DBA-2. La première hypothèse semble peu probable car la capacité intrinsèque des neutrophiles à détruire les bactéries *in vitro* n'a jamais été démontrée comme significativement différente entre deux lignées de souris [Von Köckritz-Blickwede 2008, Gresham 2000]. De plus, l'activité bactéricide des GNN est loin d'être optimale *in vitro* en l'absence d'anticorps et de mécanismes d'opsonisation [Gresham 2000]. La seconde hypothèse, quant à elle, a déjà été confirmée par une étude montrant que les souris sensibles à *S. aureus* ont plus de bactéries vivantes au sein des neutrophiles récoltés dans la cavité abdominale lors d'infection à *S. aureus* par voie intra-péritonéale [Gresham 2000]. Il apparaît d'ailleurs que la capacité de certaines souches de *S. aureus* à s'abriter au sein même des cellules de l'immunité soit en partie responsable de la sensibilité des souris à cette infection [Gresham 2000].

Les cellules récupérées lors du lavage péritonéal sont à plus de 70% des phagocytes (macrophages et des GNN) qui constituent les premières lignes de défense de l'organisme face aux infections bactériennes. Pendant longtemps, les rôles des neutrophiles et des

monocytes ont été partiellement confondus lors d'études de la pathogenèse de l'infection, et ce à cause de leurs récepteurs de surface relativement semblables [Dunay 2010]. C'est pourquoi les marqueurs que nous avons utilisés sont spécifiques de ces deux populations cellulaires : Ly6G [Nagendra 2004, Daley 2008] et F4/80 [Austyn 1981].

Les neutrophiles font partie de la première ligne de défense de l'organisme lors d'une infection bactérienne. Il a souvent été montré que la conséquence de leur absence est une sensibilité accrue de l'individu par son incapacité à enrayer l'infection bactérienne [Von Köckritz-Blickwede 2008, Gresham 2000, Borregaard 2010]. Bien que certaines études mettent en avant une augmentation de sensibilité à *S. aureus* en l'absence d'un recrutement suffisant de GNN sur le lieu de l'infection [Von Köckritz-Blickwede 2008, Nippe 2010], d'autres mettent en avant le caractère potentiellement délétère de ces GNN dans ce même cadre [Gresham 2000]. Il a été montré que le recrutement trop important de GNN lors d'infections à *S. aureus* est délétère pour l'organisme et qu'une limitation de ce recrutement permet une diminution de la sensibilité de l'individu à cette infection, grâce à une élimination plus rapide du pathogène [Gresham 2000]. Certaines souches de *S. aureus* ont la capacité de survivre au sein des GNN. Cette capacité semble être due à des facteurs de virulence exprimés par la bactérie et dépendrait du mécanisme de sa prise en charge par les GNN. En effet, il existe deux types de compartiments au sein des GNN, l'un permettant la destruction des *S. aureus* et l'autre permettant la survie de la bactérie. Cette dichotomie semble être à l'origine des rôles opposés des neutrophiles : soit limiter l'infection, soit permettre son expansion. De plus, il semblerait que le recrutement des GNN et la prise en charge de la bactérie par ces derniers soient régulés en partie par certaines chimiokines CKC (KC et MIP2) [Gresham 2000, Mcloughlin 2006] dont la sécrétion est induite en partie par des facteurs de virulence de la bactérie [Gresham 2000]. L'augmentation du nombre de neutrophiles est alors responsable de l'augmentation du nombre de cachettes pour les bactéries qui sont alors à l'abri de la réponse immunitaire. Cet échappement à la réponse immunitaire de *S. aureus* a également été mis en évidence avec les cellules épithéliales au sein desquelles *S. aureus* est, de plus, capable de se multiplier [Gresham 2000]. En dehors de leur rôle de cellules phagocytaires, les GNN produisent un certain nombre de chimiokines et cytokines, responsables de l'activation d'autres cellules immunitaires. Ces inductions sont en partie responsables de la mise en place de réponses plus ou moins efficaces entraînant des différences de sensibilité entre les individus. Par exemple, les GNN peuvent influencer l'activation des lymphocytes T en agissant sur les cellules dendritiques ou les monocytes

inflammatoires [Dunay 2010] et les orienter vers une réponse de type Th1 ou Th2 [Dardalhon 2010].

Les macrophages sont des cellules résidentes de la cavité abdominale et font partie des premières cellules entrant en contact avec le pathogène lors d'infection péritonéale. Les macrophages activés ont été identifiés comme des effecteurs majeurs de l'immunité innée antibactérienne [Asai 2010]. De plus, il a été mis en évidence que lors de l'intervention de l'immunité innée, les monocytes inflammatoires sont aussi importants que les neutrophiles, sinon plus, lors de certaines infections, où leur absence semble bien plus préjudiciable que celle des neutrophiles [Dunay 2010]. Dans le cas d'infection cutanée à *S. aureus* ils semblent être responsables de la capacité de l'hôte à former des abcès. La formation d'abcès est un mécanisme de défense particulièrement important lors d'infection cutanée. La structure de l'abcès lui permet de confiner la bactérie et ainsi de limiter sa dissémination, ce qui augmente considérablement les chances de survie de l'individu [Asai 2010]. Dans ce mécanisme, le rôle de médiateur des macrophages apparaît comme crucial. Une modification de leur production d'interleukines peut être la cause d'une augmentation de sensibilité de l'individu provoquée par l'absence de formation d'abcès et une dissémination de la bactérie [Asai 2010].

Les souris C57BL6, qui apparaissent comme résistantes dans notre modèle d'infection, possèdent une plus grande population de macrophages que les souris DBA-2 qui apparaissent comme sensibles. Cependant, nous ne savons pas si cette différence est due à un recrutement de monocytes au cours de l'infection ou à la population cellulaire résidente de la cavité abdominale. Pour cela, il faudrait utiliser d'autres marqueurs, permettant de faire la différence entre les monocytes résidents et les monocytes inflammatoires [Dunay 2010] ou étudier la population cellulaire normale de la cavité péritonéale en l'absence d'infection.

Les réactions immunitaires et les résistances observées dans la littérature sont étroitement dépendantes du lieu d'infection et de la voie de contamination. Comme nous venons de le voir, des résultats radicalement opposés sont observés entre des modèles utilisant des modes d'infection différents. Ainsi, les souris C57BL6 apparaissent comme résistantes dans notre modèle d'infection intra péritonéale ainsi que dans un modèle d'infection par voie intraveineuse [Von Köckritz-Blickwede 2008], mais apparaissent comme particulièrement sensibles dans un modèle d'infection en sous-cutanée [Nippe 2010]. Les causes de ces différences ne sont pas totalement élucidées, mais les cellules présentes au site d'infection et la nature de la réponse mise en place semblent déterminantes.

Tout d'abord il a été mis en évidence l'importance de certaines cellules sur le lieu d'infection dans l'évolution de l'infection. Par exemple, la présence et l'activation des cellules dendritiques lors d'infections cutanées sont directement corrélées à une diminution de la gravité de l'infection et ce, grâce à leur interaction avec les cellules de l'immunité innée telles que les granulocytes. Les cellules dendritiques sont responsables d'une activation des GNN qui sont alors à l'origine d'une meilleure élimination des bactéries [Bohannon 2010]. De même, la présence de GNN (CD11b+, Ly6G+ F4/80-) en grand nombre sur le lieu d'infection a été montrée comme limitant la mise en place d'une immunité de type Th1 en inhibant l'activation des LT [Dardalhon 2010]. La nature des cellules présentes sur le site d'infection semble intervenir dans la mise en place de la réponse immunitaire et sa régulation

Ensuite, nous avons vu que la nature de la souche bactérienne par son interaction avec les cellules immunitaires influe considérablement la mise en place et l'efficacité de la réponse immunitaire.

Enfin, les mécanismes immunitaires identifiés comme responsables de la résistance ou de la sensibilité des souris ne sont pas les mêmes selon le mode et le lieu d'infection. Lors d'infection par voie intraveineuse, seule l'immunité innée apparaît comme importante. Les souris restent résistantes même en l'absence d'effecteurs de l'immunité acquise [Von Köckritz-Blickwede 2008]. A l'inverse, lors d'infection en sous-cutanée, le rôle des lymphocytes T apparaît comme déterminant et tout particulièrement, l'orientation de la réponse immunitaire acquise (Th1 ou Th2) et sa régulation (nature des interleukines sécrétées dans les deux cas) [Nippe 2010]. Alors que la formation d'abcès induite par les macrophages lors d'infection cutanée apparaît comme protectrice en limitant la dissémination de la bactérie dans l'organisme [Asai 2010], la formation d'abcès dépendante des LT CD4 et du recrutement des GNN apparaît comme délétère en permettant une prolifération bactérienne et ce, qu'il s'agisse d'un modèle d'infection cutanée, sous-cutanée ou intra-abdominale [Mcloughlin 2006].

Il apparaît donc que l'efficacité de la réponse immunitaire est intimement liée à la nature des cellules effectrices présentes originellement sur le lieu d'infection, à la nature de la souche bactérienne mise en jeu et à son interaction avec les cellules de l'immunité ainsi qu'aux mécanismes de régulation mis en place.

Les cytokines sont des molécules sécrétées par les cellules immunitaires, tels que les phagocytes. Elles sont responsables de la mise en place et de la régulation de la réponse immunitaire. Dans le cadre des infections à *S. aureus*, de nombreuses cytokines ont été

décrites comme influençant la sensibilité et la résistance des souris. Par exemple, les cytokines KC, MIP2 [Von Köckritz-Blickwede 2008, Gresham 2000] et CXCL-2 [Nippe 2010] ont été identifiées comme jouant un rôle déterminant dans la mise en place de la réponse immunitaire lors d'infection à *S. aureus*. C'est pourquoi, la suite de ce travail consiste en la détermination des cytokines sécrétées et de leur concentration afin d'élucider les mécanismes responsables du recrutement et de l'activation cellulaire à l'origine des différences de sensibilité observées entre les deux lignées de souris.

CONCLUSION

Notre étude nous a donc permis d'identifier des différences de sensibilité de deux lignées de souris ayant un système immunitaire compétent, lors d'infection par *S. aureus* par voie intra-péritonéale.

D'une part nous avons montré une plus grande sensibilité des souris DBA-2 par rapport aux souris C57Bl6 lors d'infection par *S. aureus* par voie intra-péritonéale. Les souris DBA-2 présentent une atteinte clinique plus sévère et une dissémination systémique plus précoce que les souris C57Bl6, ainsi qu'un défaut d'élimination des bactéries qui se traduit par une atteinte clinique persistante. Nous avons également confirmé le fait que le rein est un organe cible de *S. aureus* lors de la dissémination par voie sanguine et que l'évolution des charges bactériennes rénales est révélatrice des différences de sensibilité observées cliniquement.

D'autre part, nous avons montré que le profil de recrutement cellulaire précoce dans la cavité péritonéale est différent pour les 2 lignées de souris. On observe un recrutement majoritaire de neutrophiles chez les souris sensibles, alors que les souris résistantes présentent un recrutement polymorphe, avec une population de macrophages importante.

Ces résultats suggèrent que les cellules de l'immunité innée jouent un rôle majeur dans le contrôle précoce de l'infection par *S. aureus*. De plus, des facteurs génétiques sont probablement à l'origine des différences observées dans la mise en place de l'immunité innée et donc, dans les différences de sensibilité à l'infection des deux lignées. Des études supplémentaires sur les fonctions des cellules recrutées lors de l'infection devraient aider à déterminer les mécanismes à l'origine des différences de sensibilité.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Séverine BOULLIER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **COLLOMB Aurélia** intitulée « *Caractérisation de la différence de sensibilité à l'infections par S.aureus de deux lignées de souris* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

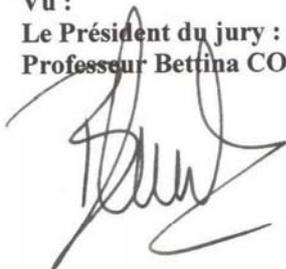
Fait à Toulouse, le 8 novembre 2011
Docteur Séverine BOULLIER
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Bettina COUDERC



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

BIBLIOGRAPHIE

ASAI A., TSUDA Y., KOBAYASHI M., HANAFUSA T., HERNDON D.N. and SUZUKI F.: **Pathogenic role of macrophages in intradermal infection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Thermally Injured Mice.** *Infection and immunity*, 2010, **78**: 4311–4319

AUSTYN J.M. and GORDON S.: **F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage.** *Eur J Immun.*, 1981, **10**: 805-815.

BEST N., FRASER J.D., RAINEY P.B., ROBERTS S.A., THOMAS M.G. and RITCHIE S.R.: **Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy Aucklanders,** *N Z Med J.* 2011, **124(1332)**:31-39.

BOHANNON J., CUI W., SHERWOOD E. and TOLIVER-KINSKY T.: **Dendritic cell modification of neutrophil responses to infection after burn injury.** *The Journal of Immunology*, 2010, **185**: 2847–2853.

BORREGAARD N.: **Neutrophils, from marrow to microbes.** *Immunity*, 2010 **33**: 657-670

BOUCHER H.W. and COREY G.R.: **Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** *Clinical Infectious Diseases*, 2008, **46**: 344–349

CAMERON D.R., HOWDEN B.P. AND PELEG A.Y.: **The interface between antibiotic resistance and virulence in *staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes.** *Clinical Infectious Diseases*, 2011, **53(6)**: 576–582.

DALEY J.M. THOMAY A.A, CONNOLLY M.D, REICHNER J.S. and ALBINA J.E.: **Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice.** *Journal of Leukocyte Biology*, 2008, **83**: 64-70

DARDALHON V., ANDERSON A.C, KARMAN J., APETOH L., CHANDWASKAR R., LEE D.H., CORNEJO M., NISHI N., YAMAUCHI A., QUINTANA F.J., SOBEL R.A., HIRASHIMA M., and KUCHROO V.K. : **Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of th1 immunity through promotion of cd11b+ly-6g+ myeloid cells.** *The Journal of Immunology*, 2010, **185**: 1383–1392.

DECOSTER A. **Cours de bactériologie**

Adresse URL: <http://anne.decoستر.free.fr/bindex.html>

DUNAY I.R., FUCHS A. and SIBLEY L.D.: **Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *toxoplasma gondii* in mice.** *Infection and immunity*, 2010, **78**: 1564–1570

EUZEBY J.P. **Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.**

Adresse URL : <http://www.bacteriologie.net/generale/resistanceantibiotiques.html>

GORAK E.J., STEPHEN M. YAMADA S.M. and BROWN J.D.: **Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors.** *Clinical Infectious Diseases*, 1999, **29**: 797–800

GRESHAM H.D., LOWRANCE J.H., CAVER T.E., WILSON B.S., CHEUNG A.L. and LINDBERG F.P.: **Survival of *staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection.** *The Journal of Immunology*, 2000, **164**: 3713–3722.

HERBERT S., ZIEBANDT A.K., OHLSEN K., SCHÄFER T., HECKER M., ALBRECHT D., NOVICK R. and GÖTZ F.: **Repair of global regulators in *staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates.** *Infection and immunity*, 2010: 2877–2889

JOSIEN R. **Cours « immunité innée », d'après Immunobiologie de Janeway, Travers Walport et Schlomchik chapitre 2.**

Adresse URL : <http://ticem.sante.univ-nantes.fr/ressources/154.pdf>

LOWY F.D.: **Staphylococcus aureus infections** *The new england journal of medicine* 1998, **339**: 520–32

LOWY F.D.: Antimicrobial **resistance: the example of Staphylococcus aureus** *J. Clin. Invest.*, 2003, **111**: 1265–1273.

MALTEZOU H.C., GIAMARELLOU H. : **Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006, **27**: 87–96

MCLOUGHLIN R.M., SOLINGA R.M., RICH J., ZALESKI K.J., COCCHIARO J.L., RISLEY A., TZIANABOS A.O. and LEE J.C. **CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of Staphylococcus aureus wound infections.** *PNAS*, 2006, **103**(27): 10408-10413.

MILLER L.S., O'CONNELL R.M., GUTIERREZ M.A ET AL. **Myd88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against staphylococcus aureus.** 2006, *Immunity*, **24**: 79–91

NAGENDRA S. and SCHLUETER A.J. : **Absence of cross-reactivity between murine Ly-6c and Ly-6g.** *Cytometry Part A* , 2004, **58A**: 195–200

NIPPE N., VARGA G., HOLZINGER D., LÖFFLER B., MEDINA E., BECKER K., ROTH J., EHRCHEN J.M. and SUNDERKÖTTER C.: **Subcutaneous infection with s. aureus in mice reveals association of resistance with influx of neutrophils and th2 response.** *Journal of Investigative Dermatology advance*, 2011, **131**(1):125-32

PANHOTRA B.R., SAXENA A.K. and AL MULHIM A.S.: **Prevalence of methicilline-resistant an methicillin-sensitive Staphylococcus aureus nasal colonization among patients at the time of admission to the hospital.** *Ann Saudi Med*, 2005, **25**(4): 304-308.

SIMON M. **Cours de pharmacie.com : immunologie**
Adresse URL : <http://www.cours-pharmacie.com/immunologie>

SIVARAMAN K., VENKATARAMAN N. and COLE A.M.: ***Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors.** *Future Microbiol*, 2009, **4**: 999–1008.

TARKOWSKI A. AND WAGNER H.: **Arthritis and sepsis caused by *Staphylococcus aureus* : can the tissue injury be reduced by modulating the host's immune system?** *Molecular medicine today*, 1998: 15-18

TSUDA Y., TAKAHASHI H., KOBAYASHI M., HANAFUSA T., HERNDON D.N., and SUZUKI F.: **Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *staphylococcus aureus*.** *Immunity*, 2004, **21**: 215–226.

TZIANABOS A.O., WANG J.Y., LEE J.C.: **Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides .** *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 2001, **98**: 9365-9370

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE M., ROHDE M., OEHMCKE S., MILLER L.S, CHEUNG A.L., HERWALD H., FOSTER S. and MEDINA E.: **Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe *staphylococcus aureus* infection in the mouse model.** *The American Journal of Pathology*, 2008, **173**: 1657-1668.

WYLLIE D.H., CROOK D.W. and PETO T.E.A.: **Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997-2003: cohort study.** *BMJ*, 2006, **333(7562)**:281.