



# Inserm

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



## Mal perforant plantaire et pied diabétique

### infection vs colonisation

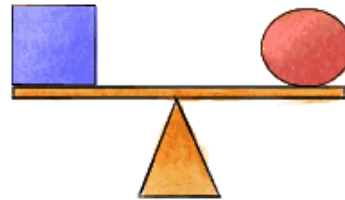
Albert Sotto et Jean Philippe Lavigne



## Déclaration d'intérêts de 2012 à 2015

- **Pas de liens d'intérêts**

# colonisation vs infection du revêtement cutané



## Contamination/ Colonisation

- ☞ Processus physiologique
- ☞ Présence de bactéries (avec/sans multipl.) sur le revêtement cutané sans provoquer de dommage pour l'hôte

## Infection

- ☞ Processus pathologique
- ☞ Modification de la flore cutanée
- ☞ Bactéries virulentes
- ☞ Manifestations cliniques +++  
Extension: os+++

# Pourquoi est-il important de distinguer colonisation vs infection ?

## Colonisation

Pas de traitement  
ATB

## Infection localisée

Traitement ATB

Traitement ATB  
Peau et Tss mous

## Ostéite

## Infection généralisée

Traitement ATB Os

**Surconsommation d'ATB = Émergence de BMR**

# La distinction colonisation *vs* infection peut-elle être basée sur la clinique ?

**Conférence du Consensus International sur le pied diabétique  
(IWGDF 2003, SPILF 2007, IDSA 2007) :**  
Critères diagnostiques et classification des  
pieds diabétiques infectés  
**4 GRADES**



**COLONIZING WOUND**  
**GRADE 1**



**INFECTING WOUND**

**GRADE 2**



**GRADE 3**



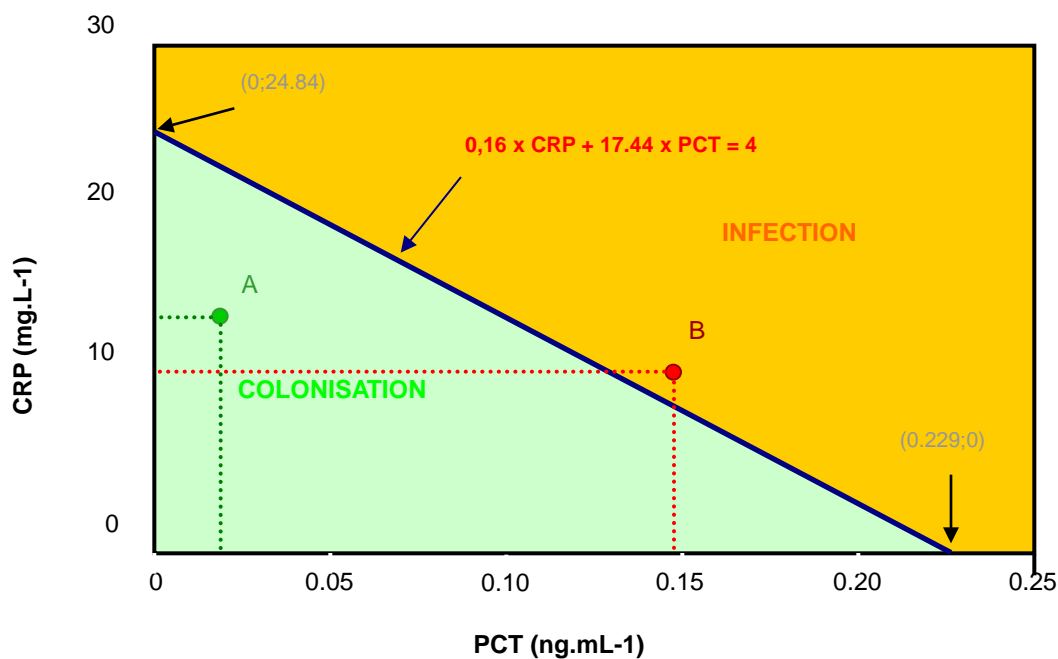
**GRADE 4**



Oui la distinction est actuellement clinique mais...

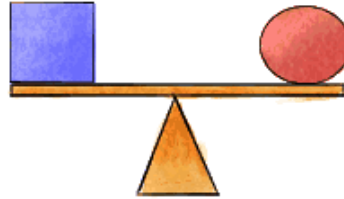
# La distinction colonisation vs infection peut-elle être basée sur les marqueurs biologiques?

- Hyperleucocytose, polynucléaires neutrophiles: pas de valeur diagnostique
- Marqueurs inflammatoires circulants
  - Classiquement: peu d'intérêt
  - Bonne valeur du couple PCT-CRP
  - CRP intéressante dans le suivi de l'évolution



Oui mais des études ultérieures doivent le confirmer

# La distinction colonisation *vs* infection peut-elle être basée sur la bactériologie ?



## Contamination/ Colonisation

Flore bactérienne résidente  
= Flore commensale

Flore bactérienne transitoire  
= Portage de bactéries pathogènes

## Infection

Pathogènes usuels impliqués

# Distinction colonisation vs infection: espèces bactériennes et degré de virulence

## Colonisation

**Bactéries de la flore commensale:**  
SCN  
Corynébactéries

## Infection

*S. aureus* +++  
Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques  
Anaérobies  
Entérobactéries: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp.

**Bactéries à potentiel de virulence peu connu:**  
Entérocoques  
*Pseudomonas aeruginosa*



# Rôle pathogène de *P. aeruginosa* et *Enterococcus* sp. ?

## Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): prospective, randomised, controlled, double-blinded, multicentre trial

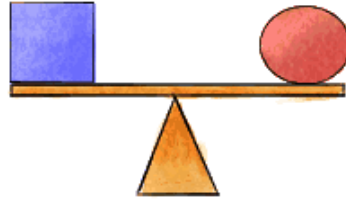
Benjamin A Lipsky, David G Armstrong, Diane M Citron, Alan D Tice, David E Morgenstern, Murray A Abramson *Lancet* 2005; 366: 1695–703

	Ertapenem (n=173)*	Piperacillin/tazobactam (n=151)*	Observed differences (95% CI)
Gram-positive aerobic cocci	149/176 (84.7%)	132/166 (79.5%)	5.1 (-3.1 to 13.6)
Enterococcus†	19/22 (86.4%)	8/9 (88.9%)	-2.5
Enterococcus faecalis	13/15 (86.7%)	12/16 (75.0%)	11.7 (-19.2 to 41.1)
Staphylococcus aureus	75/90 (83.3%)‡	62/79 (78.5%)	4.9 (-7.6 to 17.2)
Meticillin resistant	14/18 (77.8%)	10/15 (66.7%)	11.1 (-19.8 to 42.7)
Meticillin susceptible	60/71 (84.5%)	52/64 (81.3%)	3.3 (-9.9 to 17.1)
Streptococcus agalactiae	15/21 (71.4%)	22/26 (84.6%)	-13.2 (-38.3 to 10.9)
Gram-negative aerobic bacilli	64/73 (87.7%)	43/56 (76.8%)	10.9 (-2.3 to 25.2)
Enterobacteriaceae§	36/42 (85.7%)	26/33 (78.8%)	6.9 (-11.1 to 25.9)
Pseudomonas aeruginosa	15/18 (83.3%)	7/10 (70.0%)	13.3 (-18.2 to 48.7)
Gram-positive anaerobic cocci	66/74 (89.2%)	48/62 (77.4%)	11.8 (-0.8 to 25.2)
Peptostreptococcus magnus	34/38 (89.5%)	24/27 (88.9%)	0.6 (-15.4 to 20.6)
Peptostreptococcus asaccharolyticus	10/11 (90.9%)	7/11 (63.6%)	27.3 (-10.9 to 58.6)
Gram-positive anaerobic bacilli¶	23/26 (88.5%)	12/17 (70.6%)	17.9 (-6.9 to 45.1)
Gram-negative anaerobic bacilli	33/40 (82.5%)	28/40 (70.0%)	12.5 (-7.2 to 31.3)
Gram-negative anaerobic coccobacilli**	21/25 (84.0%)	11/16 (68.8%)	15.3 (-10.8 to 43.3)

Data are number of pathogens with associated favourable assessment/number of pathogens assessed (observed response) unless otherwise indicated. \*Number observed calculated by pooling across baseline severity. †No species identified. ‡Oxacillin susceptibility not provided for one isolate. §Includes Enterobacter spp, Escherichia spp, Klebsiella spp, Morganella spp, Proteus spp, Providencia spp, and Serratia spp. ¶Includes Clostridium spp, Eubacterium spp, and Propionibacterium spp. ||Includes Porphyromonas spp and Prevotella spp. \*\*Includes Bacteroides spp.

**Table 5: Favourable clinical response rates, for species with at least 20 isolates at FUA, by baseline pathogen**

# La distinction colonisation *vs* infection peut-elle être basée sur la bactériologie ?



## Contamination/ Colonisation

Flore bactérienne résidente  
= Flore commensale

Flore bactérienne transitoire  
= Portage de bactéries pathogènes

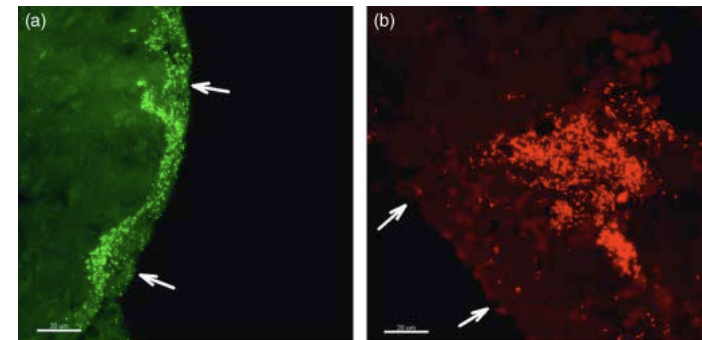
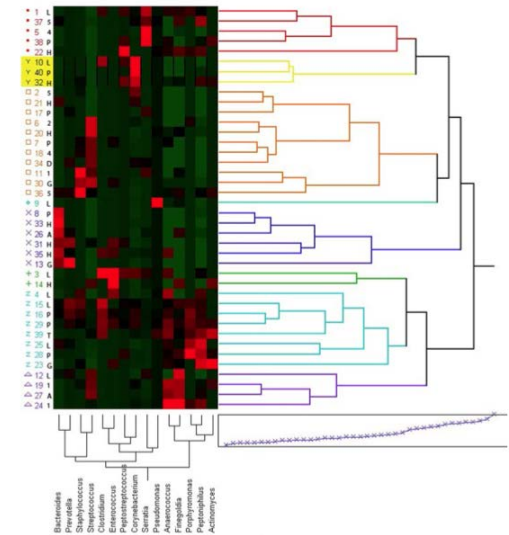
## Infection

Pathogènes usuels impliqués

**Non le diagnostic ne peut pas être bactériologique mais...**

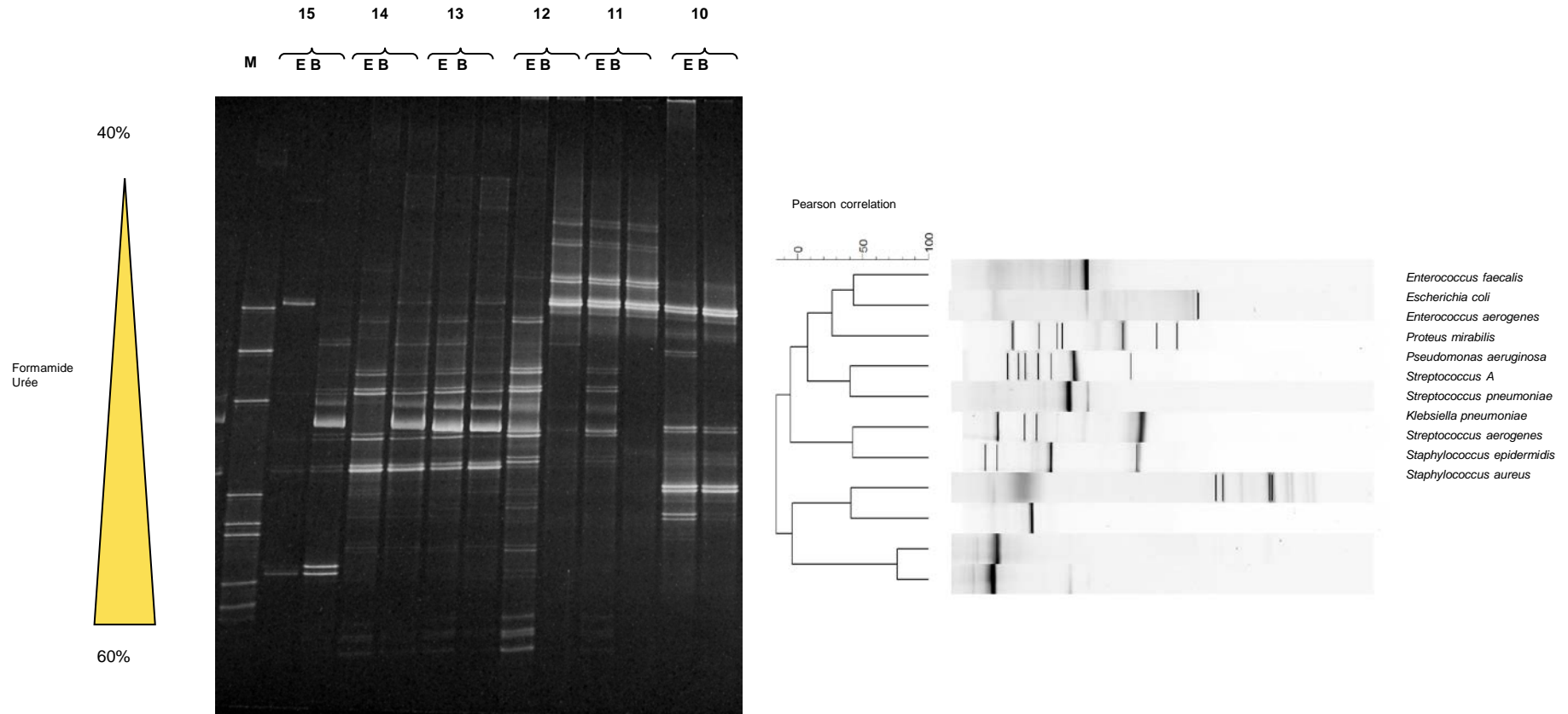
# Etude du microbiote cutané: Notion de FEPs – Organisation en biofilm

- ❑ **Biofilms "pathologiques" (≠ Biofilm naturel)**  
= organisation non aléatoire bactérienne en agrégats enfermés dans une matrice EPS
- ❑ Très nombreuses espèces: 5,4 espèces / plaie
- ❑ Organisation des agrégats en **Pathogroupes: FEP (Functionally Equivalent Pathogroups)**
- ❑ **Caractéristiques des FEP:**
  - Relations symbiotiques/synergiques des groupes de bactéries
  - Partage de nutriments (catabolisme/anabolisme)
  - Distribution non aléatoire des bactéries
  - Résistance aux ATB
  - Plaies polymicrobiennes mais seules quelques espèces peuvent s'organiser en FEP



Dowd SE et al., PLoS ONE, 2008; Smith DK et al., BMC Med Genomics, 2010; Thomsen et al., Wound Repair Regen. 2010

# Etude du microbiote cutané: Profils de migration obtenus par DGGE



Oates A et al., J Clin Microbiol. 2012 ; Dunyach-Rémy et al. Diabetes Metab 2014

# Etude du microbiote cutané: Profils de migration obtenus par DGGE

## ■ 20 patients étudiés

Dans 7 cas :  
aucune espèce n'a été détectée  
par culture alors que la DGGE  
a identifié au moins 2 espèces  
pathogènes

Nombre moyen d'espèces identifiées par:

DGGE: 3 esp.  $\pm 2,5$   
Culture: 0,8 esp.  $\pm 1,2$

Dans 5 cas :  
Au moins une espèce pathogène  
supplémentaire a été détectée par  
DGGE et non par culture

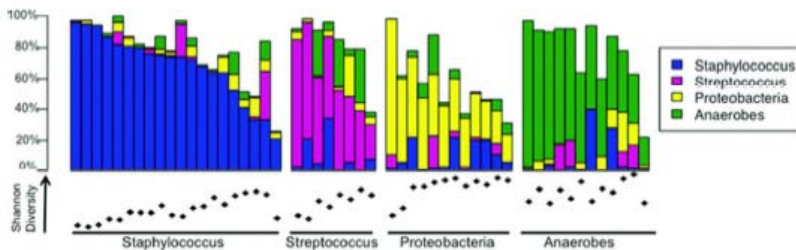
Dans 8 cas :  
-L' (les) espèces pathogènes  
ont été détectées par DGGE et  
culture;  
- l'(les) espèce(s)  
supplémentaire(s) n'étai(en)t  
pas pathogène(s)

# Etude du microbiote cutané: Profils de migration obtenus par DGGE

- ❑ 12 cas sur 20: Identification d'espèces pathogènes ou potentiellement pathogènes par DGGE non isolées par culture classique
- ❑ Erreur dans le spectre de prescription antibiotique. En effet, dans ces cas, l'antibiothérapie ciblée soit du *S. aureus* alors qu'un bacille à Gram négatif était identifié par DGGE en plus, soit l'inverse.

# Etude du microbiote cutané: Pyroséquençage

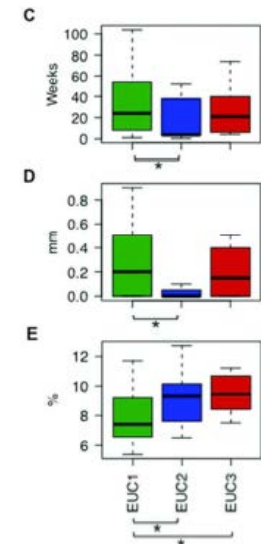
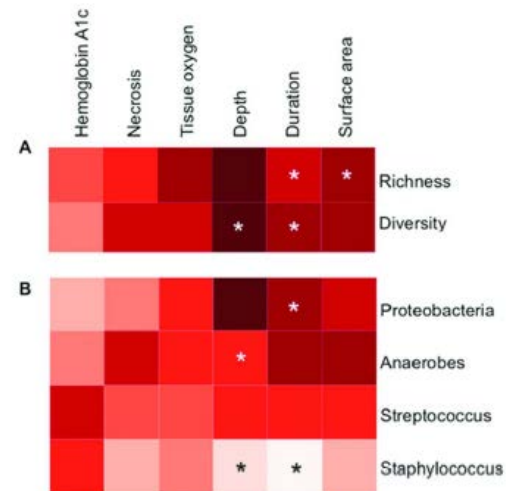
- 13 phyla
- Firmicutes (Gram +) +++  
dont *Staphylococcus* species
- 4 clusters



- Durée de l'ulcère corrélée avec diversité et Proteobactéries
- Profondeur de l'ulcère corrélée avec anaérobies
- HbA1c élevée corrélée avec colonisation par *Staphylococcus* et *Streptococcus*

Bacteria	Cultures	16S sequencing
<i>Staphylococcus</i>	40%	94%
Anaerobes	27%	100%
Proteobacteria	35%	100%
<i>Streptococcus</i>	37%	83%

Mauvaise concordance culture/pyroséquençage



# Comment faire la distinction infection vs colonisation?

- Classification clinique ...
- Plaie chronique = Organisation complexe des bactéries en Pathogroupes formant un biofilm pathologique
- Toutes les bactéries peuvent participer à la pathogénicité
- Toutes les bactéries participent à la chronicité de la lésion expliquant la difficulté de guérison
- Existence d'autres bactéries non cultivables, de virus, de parasites ?



# Distinction colonisation vs infection: espèces bactériennes et degré de virulence

## Colonisation

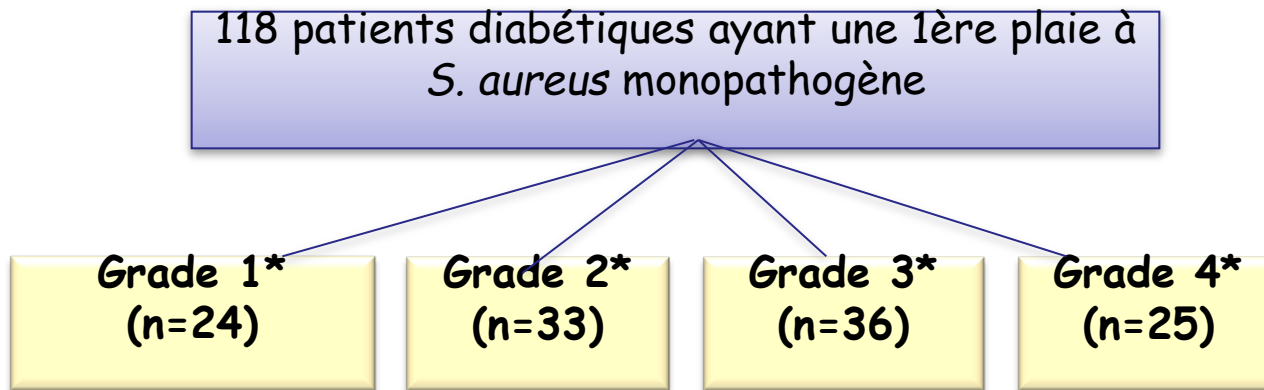
**Bactéries de la flore commen-sale:**  
SCN  
Corynébactéries

## Infection

**S. aureus +++**  
Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques  
Anaérobies  
Entérobactéries: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp.

**Bactéries à potentiel de virulence peu connu:**  
Entérocoques  
*Pseudomonas aeruginosa*

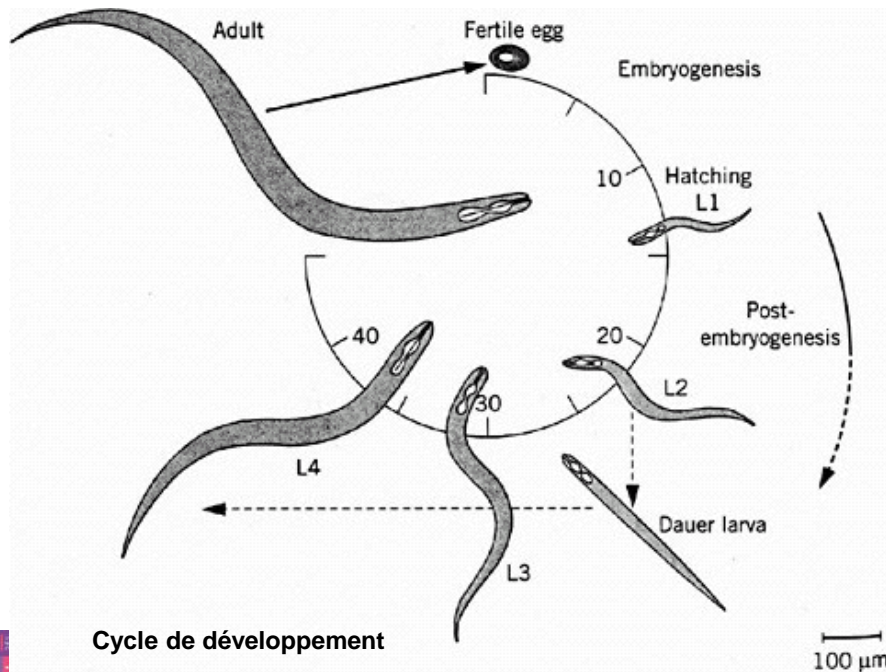
# Etude pilote sur les populations de *Staphylococcus aureus*



\*Grades selon le Consensus International sur le pied diabétique

# Evaluation de la virulence de *S. aureus* par le modèle *C. elegans*

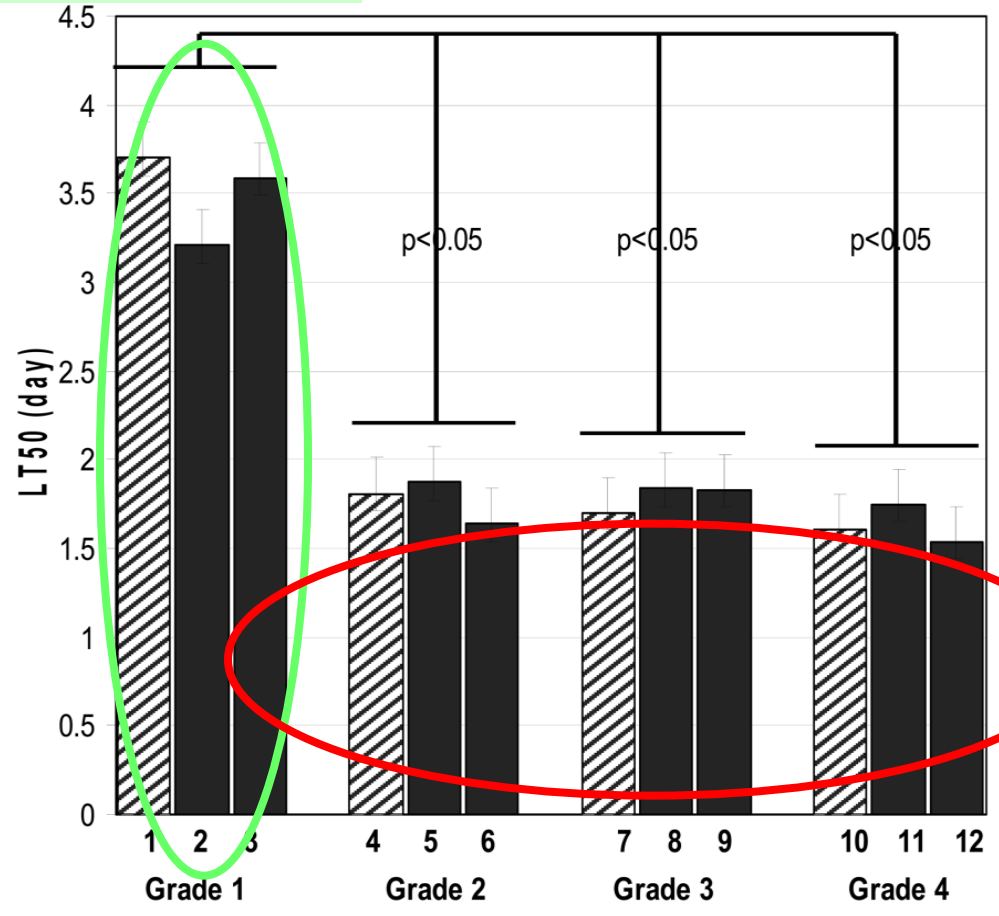
- ⊙ Nématode hermaphrodite
- ⊙ Taille: 1mm de Long (adulte)
- ⊙ Génome: 100 Mb
- ⊙ Nb de gènes: 19100
- ⊙ Habitat: sols



- ⊙ Cycle: 3 jours à 25° C
- ⊙ 1 adulte: 300 – 350 oeufs
- ⊙ Durée de vie: 3 semaines à 25° C
- ⊙ Nourriture de base: OP50

# Comparaison de la virulence de *S. aureus* isolées à différents Grades

Souches colonisantes



L' étude démontre la co-existence de deux populations de *S. aureus* :

- 1/ souches colonisantes (Grade 1) avec une faible virulence
- 2/ souches infectantes (Grade 2-4) avec une virulence importante indépendamment à la résistance à la métilcilline

Souches Infectantes

Noir: MSSA  
Rayé: MRSA

# Utilisation du modèle zebrafish pour confirmer la faible virulence de *S. aureus* isolé de plaies de Grade 1

- ⊙ *Dario rerio*, petit poisson tropical
- ⊙ Haute fertilité: 1 femelle donne 100 oeufs
- ⊙ Génome séquencé : 1700 Mb
- ⊙ Temps de génération court pour les embryons: 50 h (Adulte 3 mois)



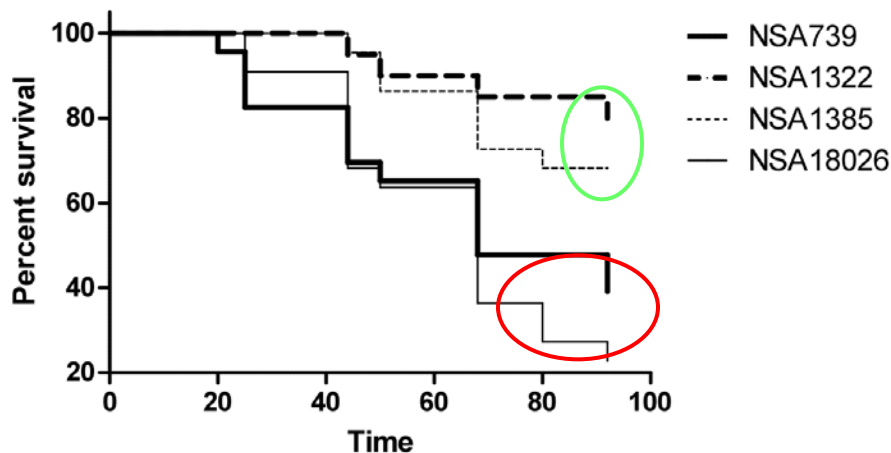
- ⊙ Système immunitaire adaptatif: Ly T, Ly B, MG, PN, Ig, CK, Cpmt, CMH
- ⊙ Dvpmt de l'embryon dans le milieu extérieur
- ⊙ Peu coûteux
- ⊙ Entretien facile, espace réduit, Tre 28° C
- ⊙ Facilement manipulable
- ⊙ Petite taille suivi progression bactéries (gfp)



# Utilisation du modèle zebrafish pour confirmer la faible virulence de *S. aureus* isolé de plaies de Grade 1

NSA1385, NSA 1322: Grade 1  
NSA739, NSA18026: Grade 2-4

LWT embryos injected with 1200 CFU at 30 hpf  
01/07/10

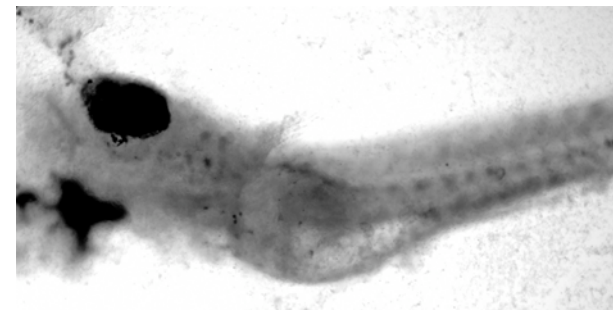
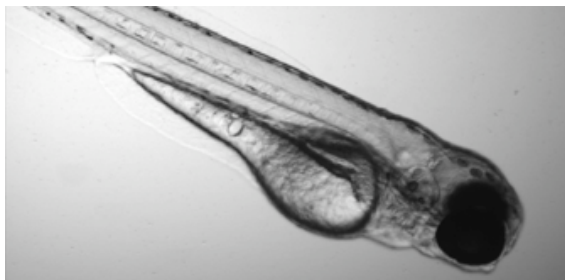


NSA1385, NSA 1322: p=NS  
NSA739, NSA18026: p=NS  
NSA1385, NSA 1322 vs NSA739, NSA18026: p < 0.001

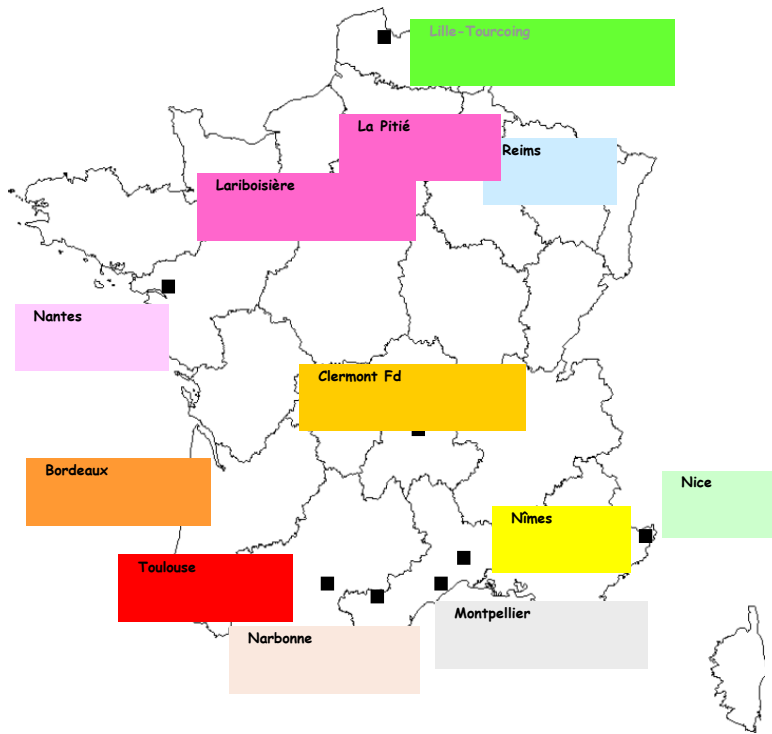
NSA 1385 (Grade 1)

NSA 739 (Grade 2-4)

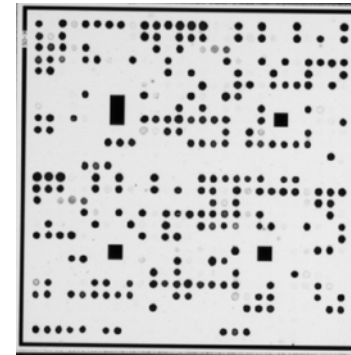
After 48h



# Existe-t-il une population colonisante de *S. aureus*?



Recrutement: Avril 2008-Juin 2010  
12 Cliniques du Pied



Biopuce à ADN  
**StaphyType (Clondiag/Alere)**

Inclusion: 195 patients

CC8/CC5 clones=  
44/75  
n=59%

Grade 1\*  
(n=75)

Grade 2\*  
(n=38)

Grade 3\*  
(n=70)

Grade 4\*  
(n=12)

CC8/CC5 clone=  
6/120  
n=5%

Suivi durant 1 mois

Bonne évolution

CC8/CC5 clones=  
22/33  
n=66%

CC8/CC5 clones=0/18  
n=0%

Evolution favorable  
n=33

mauvaise évolution n=18  
Median 14,5 j

Cicatrisation  
n=24

*S. aureus* n=33

*S. aureus* n=18  
Grade 2 n=3  
Grade 3 n=14  
Grade 4 n=1

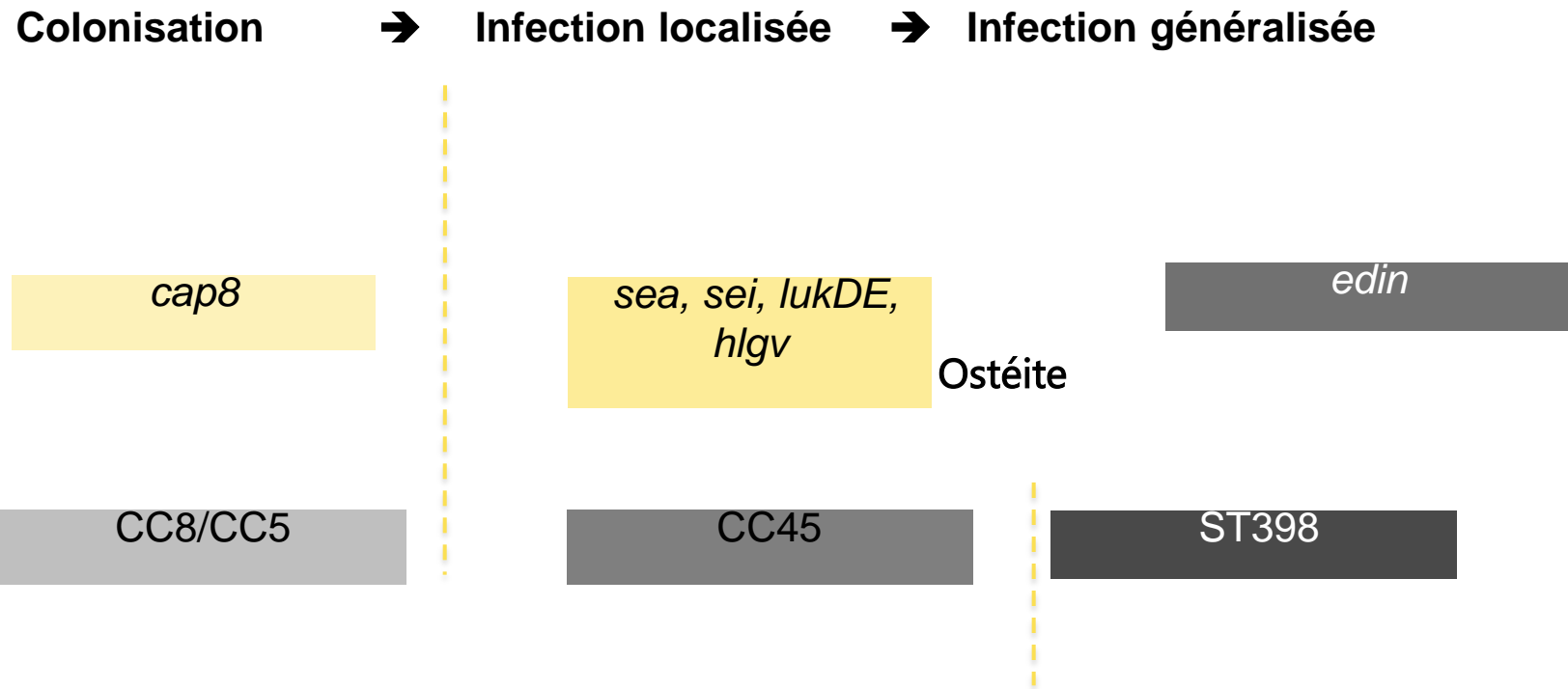
CC8/CC5 clones=  
19/24  
n=79%

CC8/CC5 clones=  
30/33  
n=91%

CC8/CC5 clones=0/18  
n=0%

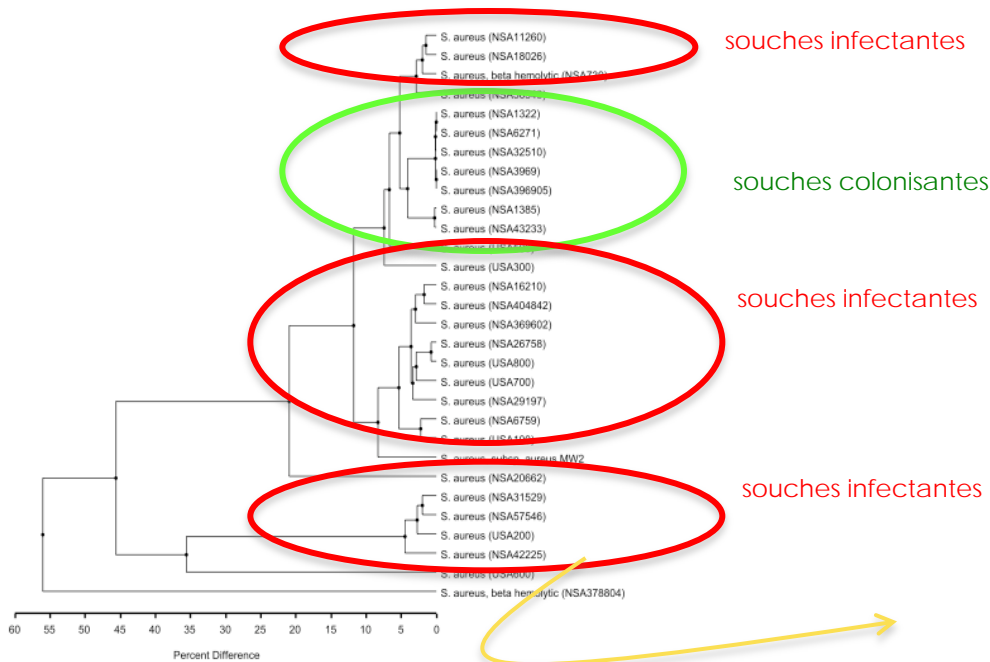


# Existe-t-il des marqueurs des souches colonisantes de SA ?

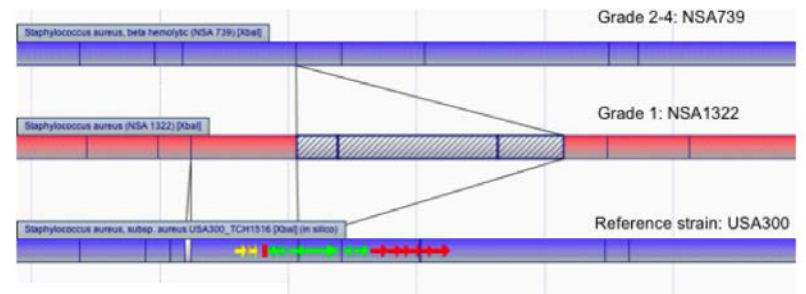


Sotto et al., Diabetes Care, 2012; Messad et al., Clin Microbiol Infect 2013; Senneville et al., Clin Microbiol Infect 2014

# La population de souches de *S. aureus* colonisante est-elle clonale?



Identification d'une insertion génétique d'ADN présente uniquement chez les souches isolées de plaies de Grade 1



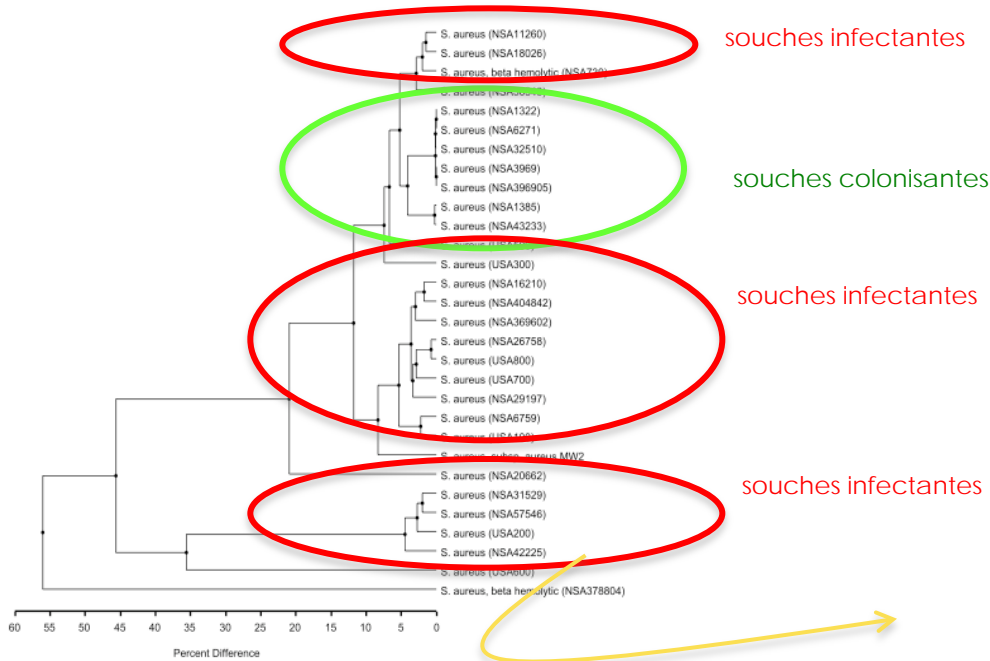
Optical maps

SEQUENCAGE

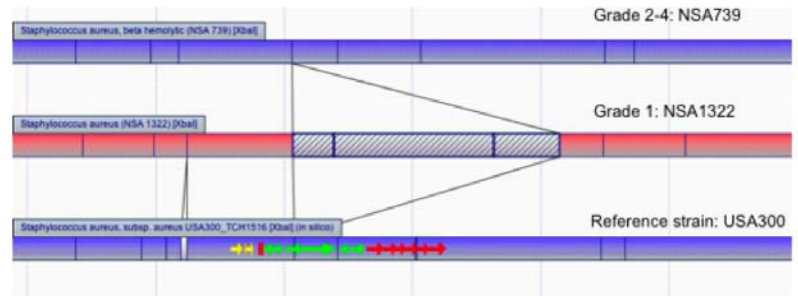
Messad et al., Diabetes 2015



# Identification d'un clone de *S. aureus* colonisant

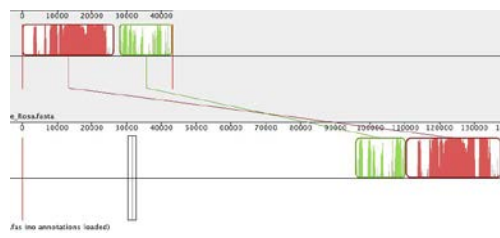


Identification d'une insertion génétique d'ADN présente uniquement chez les souches isolées de plaies de Grade 1



Séquençage du génome souche colonisante:

Optical maps



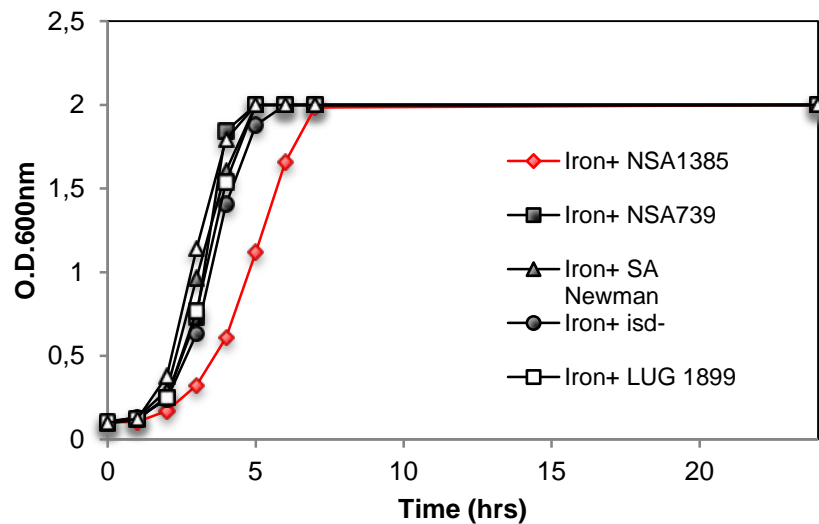
## Insertion d'un Phage

- 43155 bp
- 73 genes
- within unclassified dsDNA phages

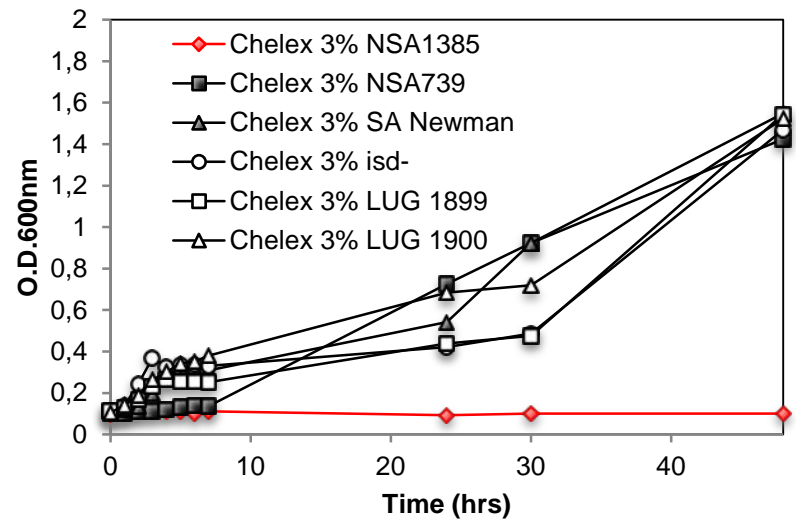
Messad et al., Diabetes 2015



# Impact de l'insertion génétique au niveau des souches de *S. aureus* colonisantes



Excès de Fer

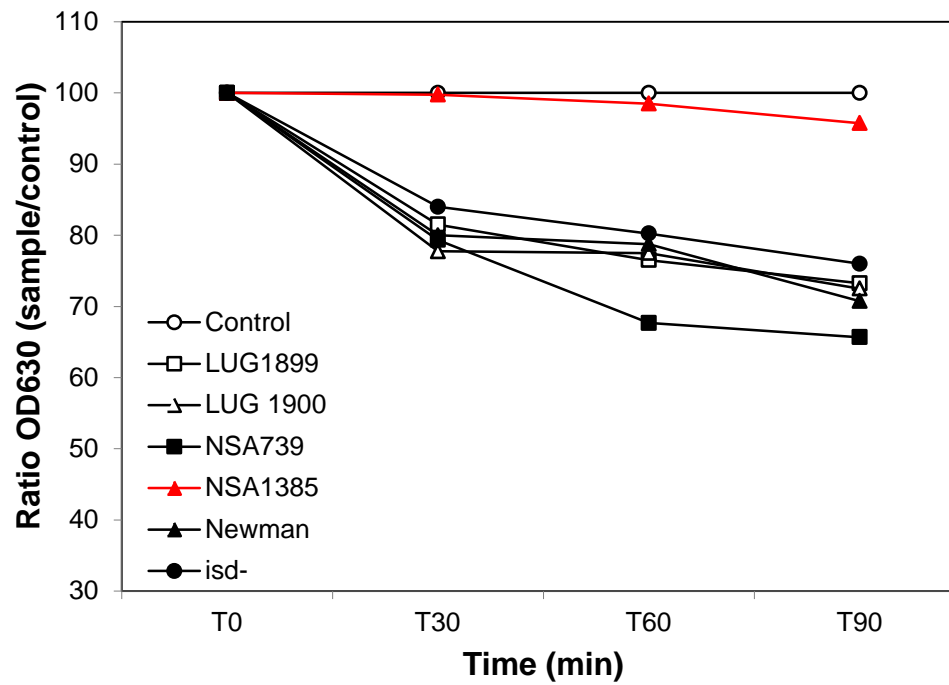


Déplétion du Fer

Impact direct de l'insertion sur le métabolisme du fer

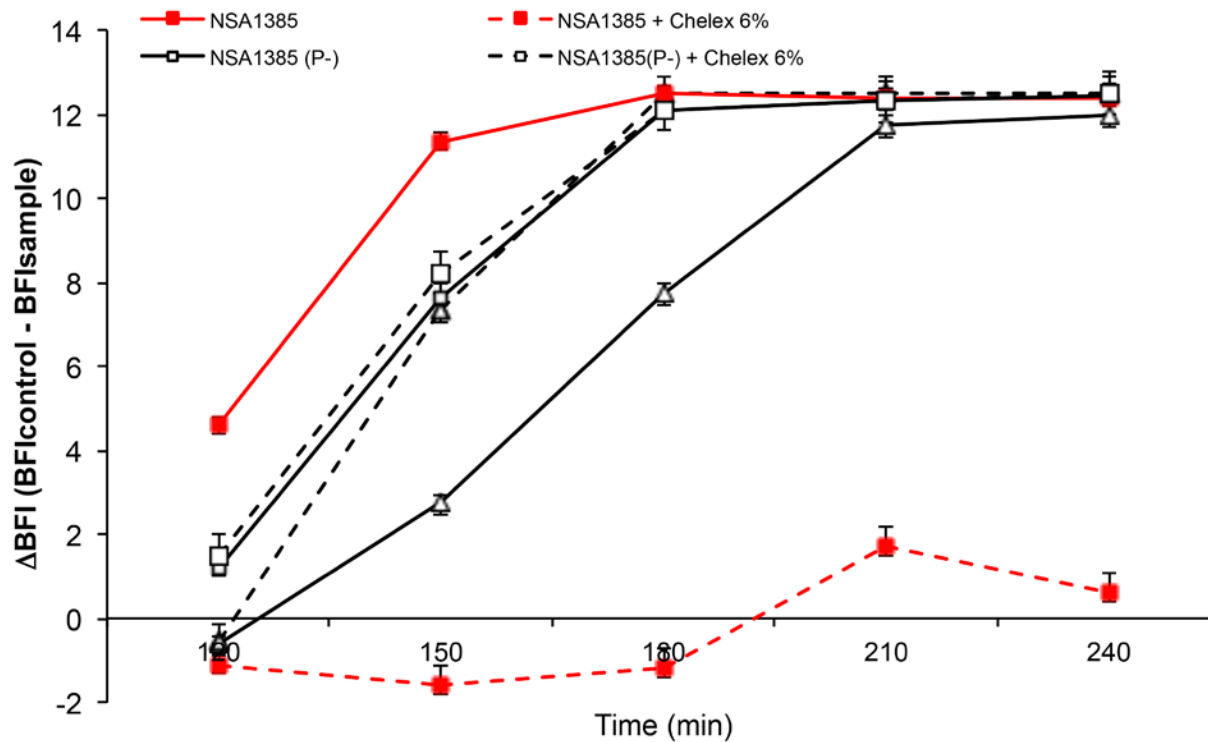
# Impact de l'insertion génétique au niveau des souches de *S. aureus* colonisantes

Chromazurol Test : Détection des sidérophores secrétés dans le milieu extérieur



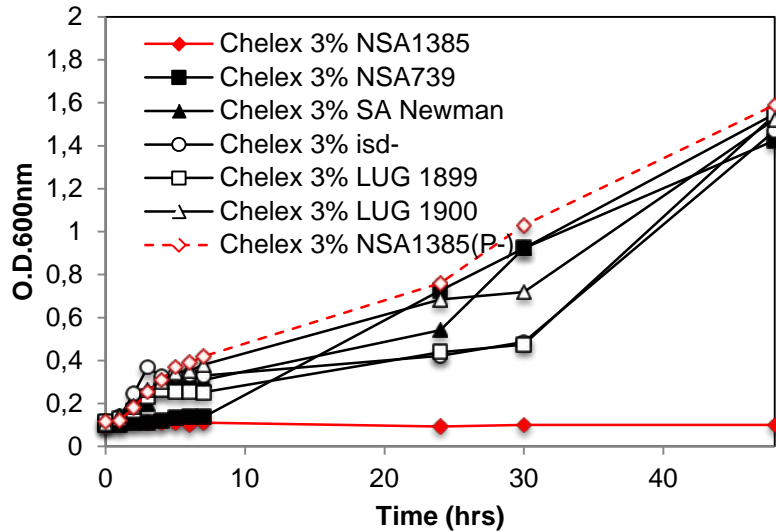
**Impact sur la régulation de la production de sidérophores**

# Impact de l'insertion génétique au niveau des souches de *S. aureus* colonisantes



Stimulation de la formation en biofilm

# L'excision du phage restaure le phénotype sauvage



Après expulsion du phage **NSA1385(P-)** retrouve sa capacité à croître dans un milieu sans fer

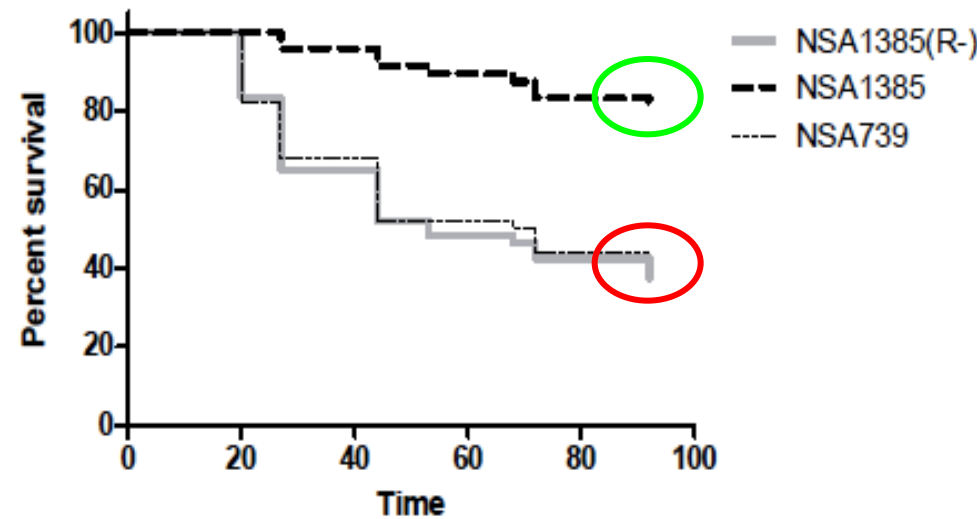
# L'excision du phage restaure le phénotype sauvage

## *C. elegans* model

Strains		LT50	L100
OP50	Ref	8.4 ± 0.1	12.6 ± 0.6
SA Newman	Ref	4.6 ± 0.3	8.3 ± 0.7
$\Delta isdD$		7.1 ± 0.2	11.1 ± 0.9
$\Delta isdD$ without <i>psidD</i>		6.8 ± 0.2	11.3 ± 0.7
$\Delta isdD/psidD$		4.6 ± 0.4	8.0 ± 0.5
NSA739		2.5 ± 0.3	5.1 ± 0.9
NSA1385	strain with phage	4.3 ± 0.2	8.1 ± 0.9
NSA1385(P-)	strain without phage	1.8 ± 0.1	4.5 ± 0.5

## Zebrafish model

LWT embryos injected with ~1200 CFU at 30 hpf combined





# Conclusion

Il n' existe à ce jour aucun moyen formel permettant de différencier une colonisation d' une infection !!!

## **Pour aider à cette distinction:**

la clinique

le débridement

la qualité des prélèvements microbiologiques

le nombre de prélèvements où la même bactérie est isolée

les espèces bactériennes identifiées

## **L'avenir ?**

Développer la culturomique

Développer des outils de diagnostic rapide de la virulence

# Remerciements

## Inserm Unité 1047

Pr Jean Philippe Lavigne  
Dr Catherine DUNYACH-REMY  
Nourredine MESSAD (Doctorant InfectioPôle)  
Christelle NGBA (Doctorante InfectioPôle)

## Diabétologues CHU Nîmes:

Dr Jean-Louis RICHARD (PH)  
Dr Nathalie JOURDAN (PH)  
Dr Sophie SCHULDINER (PH)



Pr D. RAOULT  
Pr B. LA SCOLA

Pr G. LINA  
Pr F. VANDENESCH  
Dr F. LAURENT

Dr E. LEMICHEZ (DR)  
Dr L. LANDRAUD

E. SKAAR

T. PRASJNAR  
S. RENSHAW

C. MALPICA  
F. CORDONER

CW. DYKES  
G. SKORSKI

