



# **Appel à manifestation d'intérêt**

---

**Réseau d'ESR du site Champardennais**

## **Dossier de candidature 2023**

## 1. Présentation synthétique du projet

---

|  |  |
|--|--|
| <b>Titre du projet</b>   | Membrane périprothétique à l'interface os-prothèse : étude <i>ex situ</i> de la colonisation bactérienne (MembranOS) |
| <b>Nom du porteur</b>  | Dr Marius COLIN  |
| <b>Etablissement porteur</b>   | Université de Reims Champagne-Ardenne  |
| <b>Nom des établissements partenaires<br/>(membres du regroupement champardennais)</b> | CHU-REIMS  |
| <b>Durée du projet</b>   | 24 mois  |

### Domaines

- ☐ Formation
- ☒ Recherche
- ☐ Innovation
- ☐ Autre : .....

### Thématiques

- ☐ Agro-Sciences, Environnement, Biotechnologies et Bioéconomie
- ☐ Sciences du Numérique et de l'Ingénieur
- ☒ Santé
- ☐ Sciences de l'Homme et de la Société
- ☐ Science avec et pour la Société

## Synthèse du projet

Présenter en 5 à 10 lignes maximum

(Ce résumé sera utilisé lors des différentes actions de promotion du projet)

Les infections ostéoarticulaires sur prothèses sont difficiles à traiter, avec un taux de rechutes extrêmement important (10 à 50% des cas). Les mécanismes de mise en place de l'infection et de persistance des pathogènes en site osseux restent à déterminer. Mal décrites au niveau microbiologique, les membranes formées à l'interface os-prothèse pourraient représenter le siège de la persistance de l'infection. Le but du projet est de caractériser cette membrane en identifiant, pour la première fois, sa colonisation par les pathogènes. La démarche s'appuiera essentiellement sur les techniques de microscopies électronique et confocale, d'histologie et de culture bactériologique, afin d'identifier la présence de bactéries, de cellules de l'hôte, et leurs interactions. Le projet permettra d'acquérir une meilleure connaissance des mécanismes de persistance bactérienne lors des infections osseuses et d'envisager des traitements préventifs ou curatifs adaptés.

## Durée du projet

|                    |                  |
|--------------------|------------------|
| Début : 15/01/2023 | Fin : 31/12/2024 |
|--------------------|------------------|

## Calendrier prévisionnel

Calendrier prévisionnel de réalisation du projet (dates de début et de fin, description des étapes de réalisation)

| Détails des actions   | Année...                    |
|---|-----------------------------|
| Collection des prélèvements de membranes à l'interface périprothétique, prétraitement des échantillons et analyse microbiologique | 01/2023 à 04/2024           |
| Analyses microscopiques des membranes à l'interface périprothétique   | 01/2024 à 06/2024           |
| Mise en perspective des informations cliniques, microbiologiques, et microscopiques   | 04/2024 à 12/2024           |
| Rapports et valorisations   | 01/2024 - 08/2024 – 12/2024 |

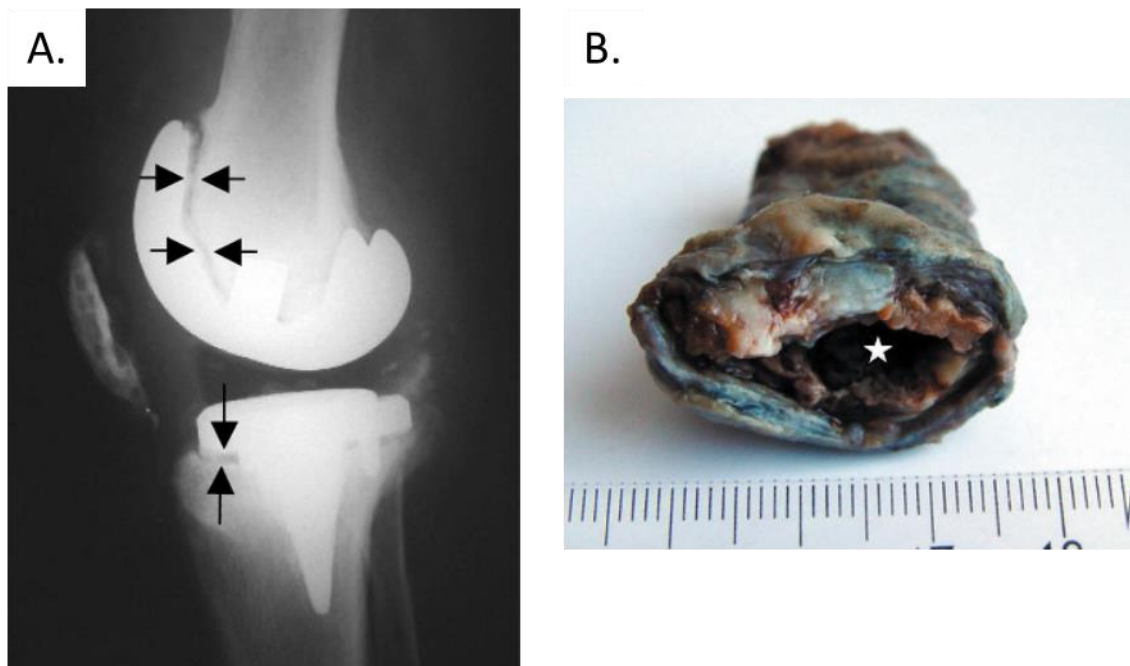
## 2. Description détaillée du projet

### Contexte / historique dans lequel s'insère le projet

Le vieillissement actuel de la population mène indubitablement à une augmentation du nombre de poses de prothèses. Malgré les avancées importantes en matière d'hygiène au cours des dernières décennies, 1 à 2% des arthroplasties continuent de se solder par la survenue d'une infection ostéoarticulaire prothétique (IOAP). Ces infections nécessitent une prise en charge complexe comprenant une reprise chirurgicale associée à des traitements antibiotiques lourds. Une nouvelle opération chirurgicale, incluant le débridement excision des tissus infectés et le changement de la prothèse, en un ou deux temps opératoires. Malgré cela, le taux de rechute est extrêmement élevé, près de 33% en moyenne (Master *et al.*, 2019).

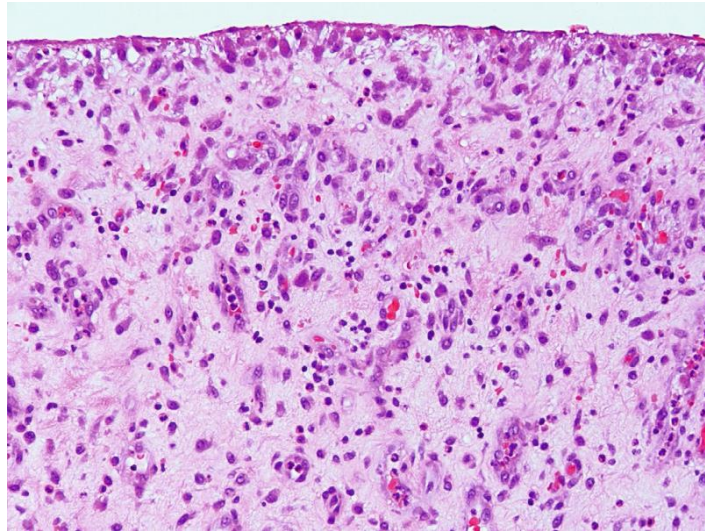
Ces chiffres impressionnants peuvent s'expliquer par la capacité des pathogènes de l'os, essentiellement des bactéries, à persister au niveau du site infectieux par différentes stratégies. *Staphylococcus aureus* est le premier pathogène impliqué dans les IOAP (entre 10 et 40% des cas selon les études). Il présenterait de nombreux mécanismes de persistance présumés : formation d'abcès, adhérence à la surface prothétique et/ou osseuse, formation de biofilm, internalisation dans les cellules de l'hôte et colonisation des réseaux lacuno-caniculaires des ostéocytes sont le plus souvent évoqués (Muthukrishnan *et al.*, 2019). Bien que ces mécanismes représentent différentes pistes pour expliquer la persistance, et donc les récurrences infectieuses, l'organisation structurelle et spatiale du site infectieux osseux, et la répartition des bactéries restent mal comprises.

En parallèle, les prises en charges chirurgicales des IOAP démontrent très souvent la présence d'une membrane à l'interface périprothétique (MIP) (Krenn *et al.*, 2017). La présence de ce type de membrane chez un patient traduit la non-implantation (descellement) de la prothèse et peut être le résultat de différents facteurs, infectieux ou non (Figure 1).



**Figure 1 :** Aspects des membranes périprothétiques. (A) Aspect radiologique d'une prothèse totale de genou descellée avec ostéolyses des régions antérieures, fémorale et tibiale (flèches). Les membranes périprothétiques à l'interface os-prothèse sont indiquées par les flèches noires. (B) Aspect macroscopique d'une membrane périprothétique après extraction (\* espace de l'ancienne tige prothétique). (Morawiets, *et al.*, 2011).

Les caractéristiques histologiques de ces membranes peuvent orienter le diagnostic si des cellules immunitaires particulières sont détectées (polynucléaires neutrophiles) (Figure 2) mais ne permettent pas d'affirmer la présence d'une infection, qui se fait nécessairement par analyse microbiologique.



**Figure 2** : Membrane périprothétique caractéristique d'un site infectieux, présentant notamment une infiltration de polynucléaires neutrophiles (coloration HE, grossissement x200). (Krenn *et al.*, 2017).

De surcroît, les interactions entre ces MIP et les pathogènes, notamment l'infiltration potentielle et la répartition des bactéries au sein de la membrane, restent inconnus. Dans le cas d'infections, ces MIP pourraient donc présenter un rôle immunitaire mais aussi potentiellement abriter des foyers infectieux, notamment via la formation d'abcès, connus pour leur rôle dans la persistance bactérienne. La compréhension du microenvironnement que représentent les MIP est donc essentielle pour la recherche de thérapeutiques préventives influençant la formation de la MIP.

### Description des objectifs et des activités qui seront réalisées

L'objectif du projet MembranOS est de caractériser la colonisation bactérienne des MIP par différentes méthodes de microscopie et de microbiologie. Les travaux seront réalisés via une collaboration entre les deux partenaires faisant partie du réseau ESR.

#### Action 1 : Collection des prélèvements de MIP, prétraitement des échantillons et analyse microbiologique

Les critères d'inclusion des patients seront : patients de plus de 18 ans présentant une IOAP sur prothèse. Parmi les caractéristiques des patients, seront colligées les données démographiques (l'âge du patient au moment de la ponction, le sexe), les antécédents de traitements antibiotiques et immunosuppresseurs et l'état immunitaire du patient au moment de l'opération.

Les MIP représentent des déchets opératoires, extraits lors de l'intervention. Une déclaration de collection sera effectuée auprès du ministère de l'enseignement et de la recherche selon la procédure CODECOH parallèlement à une déclaration simplifiée selon la méthodologie de référence MR004 auprès de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (la recherche entreprise n'étant pas une recherche impliquant la personne humaine au sens de la loi Jardé).

Afin d'inclure un nombre suffisant de patients, l'action s'étalera sur un total de 16 mois. Ainsi, il est attendu qu'entre 10 et 18 MIP soient collectées entre janvier 2023 et avril 2024.

Les MIP identifiées par les chirurgiens orthopédiques lors la dépose de prothèse ostéoarticulaire seront prélevées aseptiquement, avant un éventuel traitement antibiotique local *per* opératoire, et transférées au laboratoire BIOS dans l'heure suivant le prélèvement.

La MIP sera conservée à 4°C et prétraitée au laboratoire BIOS extemporanément. La MIP sera lavée au tampon phosphate salin stérile. Des photographies de la MIP seront effectuées afin d'en apprécier l'aspect, puis la MIP sera découpée de manière aseptique en quatre échantillons de tailles similaires. La face supérieure de la membrane sera identifiée par un point de suture effectué sur chacun des trois échantillons destinés à l'imagerie. Trois de ces échantillons seront prétraités (fixation) différenciellement en fonction des trois analyses microscopiques à effectuer :

- Analyse histologique.
- Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB).
- Analyse par microscopie confocale à balayage laser (CLSM).

Le dernier échantillon sera destiné à l'analyse microbiologique : l'échantillon sera découpé finement et transféré dans un tube contenant 5 mL de milieu de culture bactérienne liquide. Afin de resuspendre les bactéries de l'échantillon, le tube sera passé au bain à ultrason pendant 5 minutes puis vortexé pendant 30 secondes. Des ensemencements sur géloses au sang seront réalisés et les géloses seront incubées en atmosphères oxygénée et anoxique, afin de permettre la croissance des bactéries aérobies et anaérobies. Les géloses et le tube contenant l'échantillon de MIP seront incubées à 37°C pendant 7 jours, et la présence d'un développement bactérien sera évalué quotidiennement. Si aucune croissance n'est observée après 7 jours, un nouvel ensemencement sur géloses sera effectué à partir du milieu de culture contenant l'échantillon de MIP, suivi d'une nouvelle incubation de 7 jours. Les colonies identifiées sur géloses seront identifiées par spectrométrie de masse et/ou génotypage de l'ADNr 16S.

#### Action 2 : Analyses microscopiques des MIP

Les échantillons de MIP prétraités en Action 1 seront préparés afin d'être analysés.

- Analyse histologique : l'analyse histologique de la MIP permettra essentiellement de déterminer la présence de cellules immunitaires particulières (macrophages, basophiles, neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes) sur la base de colorations de routines de type Hématoxyline Eosine ou Trichrome de Masson. Les résultats obtenus seront comparés aux types de MIP définis par Krenn *et al.* (2017) afin de confirmer ou d'infirmer les caractéristiques typiques de la MIP lors d'une infection (présence de polynucléaires neutrophiles), et complétés par des analyses immunohistochimiques (cf ci-dessous). Les résultats seront également analysés en regard des types de microorganismes identifiés en Action 1 afin de déterminer d'éventuels effets différentiels selon la nature du pathogène impliqué dans l'IOAP.
- Analyse par CLSM : un marquage fluorescent dirigé vers les bactéries (live/dead ou immunomarquage spécifique) sera appliqué sur l'échantillon pour les identifier et leur répartition au sein de l'échantillon sera appréciée par microscopie confocale notamment grâce aux techniques d'imagerie sans marquage (génération de seconde harmonique, autofluorescence) permettant la mise en évidence des structures collagéniques et élastiques notamment, disponibles sur le plateau PICT. L'analyse de la présence de structures caractéristiques du biofilm bactérien (exoprotéines, exopolysaccharides, ADN extracellulaire) pourront également être envisagées (Lamret *et al.*, 2021).
- Analyse par MEB : l'analyse des échantillons de MIP par MEB permettra d'observer la présence de bactéries et leur répartition en surface de la MIP mais également de caractériser la structure des MIP et les éventuelles interactions avec des cellules immunes.

Le développement actuel de microscopie corrélative au sein de la plateforme PICT, avec l'appui du laboratoire BIOS, devrait permettre durant le projet de coupler l'imagerie en fluorescence à la microscopie électronique à balayage afin de pouvoir obtenir tout le corpus de données sur un même échantillon.

### Action 3 : Mise en perspective des informations cliniques, microbiologiques, et microscopiques

La confrontation des données cliniques avec les résultats obtenus en microbiologie et en microscopie sera effectuée afin de permettre d'identifier des points d'intérêt pour le diagnostic et de futures adaptations thérapeutiques. Pour cela, les corrélations entre facteurs seront recherchées, comme par exemple la relation entre la répartition des caractéristiques des bactéries (profondeur de pénétration, internalisation...) au sein de la MIP et l'espèce bactérienne identifiée (*S. aureus*, *Cutibacterium acnes*...), ou une éventuelle antibiothérapie administrée au patient antérieure à la rechute.

#### **Références bibliographiques :**

Masters, E. A., Trombetta, R. P., de Mesy Bentley, K. L., Boyce, B. F., Gill, A. L., Gill, S. R., ... & Muthukrishnan, G. (2019). Evolving concepts in bone infection: redefining "biofilm", "acute vs. chronic osteomyelitis", "the immune proteome" and "local antibiotic therapy". *Bone research*, 7(1), 1-18.

Muthukrishnan, G., Masters, E. A., Daiss, J. L., & Schwarz, E. M. (2019). Mechanisms of immune evasion and bone tissue colonization that make *Staphylococcus aureus* the primary pathogen in osteomyelitis. *Current osteoporosis reports*, 17(6), 395-404.

Krenn, V., & Perino, G. (2017). Histological diagnosis of implant-associated pathologies. In *Histological diagnosis of implant-associated pathologies* (pp. 1-44). Springer, Berlin, Heidelberg.

Morawietz, L., Classen, R. A., Schröder, J. H., Dynybil, C., Perka, C., Skwara, A., ... & Krenn, V. (2006). Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *Journal of clinical pathology*, 59(6), 591-597.

Lamret, F., Varin-Simon, J., Velard, F., Terryn, C., Mongaret, C., Colin, M., ... & Reffuveille, F. (2021). *Staphylococcus aureus* strain-dependent biofilm formation in bone-like environment. *Frontiers in microbiology*, 12, 714994.

### Plus-value apportée au réseau des établissements d'ESR champardennais

D'une part, les recherches menées au sein du laboratoire BIOS se concentrent essentiellement sur les thématiques des pathologies osseuses humaines et des biomatériaux implantables, et reposent essentiellement sur des expérimentations *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, les praticiens du service de chirurgie orthopédique et traumatologie du CHU de Reims sont confrontés à la réalité clinique de la difficulté à prévenir et traiter les IOAP.

Le projet MembranOS vise à renforcer considérablement les liens entre ces deux acteurs afin de renforcer la transversalité des futurs projets de recherches portant sur les pathologies osseuses. Cette collaboration permettra au laboratoire BIOS de proposer des recherches « au plus près du patient » et de proposer des pistes de solutions entièrement adaptées aux besoins des praticiens dans la prise en charge des patients.

En renforçant les interactions entre des acteurs locaux œuvrant dans le domaine de la santé, le projet servira à initier des recherches transversales s'intégrant parfaitement dans l'objectif d'excellence du réseau ESR Champardennais. A terme, ces interactions amèneront au développement d'une expertise reconnue dans la prévention et le traitement des IOAP, au sein du réseau ESR.

## Résultats et impacts attendus

- Impact quantitatif :

Le projet se cristallisera notamment autour de l'encadrement un stagiaire de Master 2, de janvier 2024 à juillet 2024, qui aura pour tâche la réalisation de l'essentiel de l'action 2, à savoir l'analyse microscopique des MIP, ainsi qu'une partie de l'action 3.

Deux rapports concrétiseront les « milestones » du projet : le premier rapport en janvier 2024 permettra de faire un bilan des MIP récoltées et de l'analyse microbiologique, le deuxième rapportera les travaux effectués dans le cadre du stage de Master 2, et le dernier sera le rapport final rédigé en décembre 2024.

Les résultats générés lors de l'étude seront valorisés par des productions scientifiques soumise à comité de relecture dans des journaux à haut facteur d'impact et en accès ouvert, participant ainsi au rayonnement de l'URCA, du CHU et de l'ESR à l'international. La valorisation des travaux et l'ouverture des connaissances scientifiques se fera également par la participation à des congrès scientifiques d'envergure nationale et internationale.

- Impact qualitatif :

L'objectif principal du projet est d'amener à une compréhension fine de la structuration des IOAP. Concrètement, les retombées court et moyen termes de l'étude se traduiront par :

- Côté URCA / BIOS : une meilleure vision des problématiques infectieuses s'établissant chez les patients permettant d'orienter de futurs projets en connaissance de ces problématiques cliniques, afin de proposer des recherches expérimentales « au plus proche du patient ».

- Côté CHU / Service de chirurgie orthopédique et traumatologie : une identification des acteurs de la persistance bactérienne dans les IOAP qui permettra de déterminer de potentiels marqueurs prédictifs et/ou des facteurs influençant la persistance bactérienne au sein des MIP.

De plus, l'étude MembranOS fera office de tremplin dans la collaboration entre les deux acteurs que sont BIOS (URCA) et le service de chirurgie orthopédique et traumatologie (CHU). Cette collaboration pourra ensuite être poursuivie par des études étendues aux autres facteurs du site infectieux (os, prothèse) et nourrira la conception de thérapeutiques adaptées, notamment de biomatériaux antibactériens innovants. A long terme, l'étude s'inscrit dans l'amélioration continue de la qualité de prise en charge des patients souffrant d'IOAP, et notamment dans la stratégie de prévention de ces infections.



### 3. Identification du porteur et des partenaires

**1) Le porteur de projet :** les propositions peuvent être soumises par des porteurs de projet appartenant aux établissements membres du réseau ESR-ca et ses associés, par des structures différentes telles que des unités de recherche, des pôles de développement, les écoles doctorales, les composantes, les directions, etc...

*Préciser impérativement le contact administratif qui sera contacté pour toutes les questions relatives au projet.*

|   |  |
|---|--|
| Nom, prénom du responsable scientifique du projet : | COLIN Marius   |
| Fonction  | Maître de Conférences des Universités  |
| Service / unité de rattachement                     | EA 4691 BIOS   |
| Adresse   | 1, Avenue du Maréchal Juin   |
| Téléphone   | 03 26 91 86 42   |
| Mail  | <a href="mailto:marius.colin@univ-reims.fr">marius.colin@univ-reims.fr</a>       |
| Nom, prénom du contact administratif                | MASCRET Karelle  |
| Téléphone   | 03 26 91 86 99   |
| Mail  | <a href="mailto:karelle.mascret@univ-reims.fr">karelle.mascret@univ-reims.fr</a> |

**2) Les partenaires :** pour communiquer avec les partenaires des établissements, nous avons besoin d'identifier clairement chaque personne impliquée dans ce projet.

#### Partenaire n° 1

|   |  |
|---|--|
| Nom, prénom du responsable scientifique du projet | DIALLO Saïdou  |
| Fonction  | Chirurgien orthopédiste  |
| Service / unité de rattachement                   | Service de chirurgie orthopédique et traumatologie                     |
| Adresse   | 45 rue Cognac Jay  |
| Téléphone   | 03 26 78 76 72   |
| Mail  | <a href="mailto:sdiallo@chu-reims.fr">sdiallo@chu-reims.fr</a>         |
| Nom, prénom du contact administratif              | MANDEVILLE Milena  |
| Téléphone   | 03 26 78 80 56   |
| Mail  | <a href="mailto:mmandeville@chu-reims.fr">mmandeville@chu-reims.fr</a> |

#### 4. Éléments financiers : montant maximum demandé = 15 000 €

*Rappel : La subvention du réseau ESR-ca pour les projets relatifs à l'organisation de manifestations (ex : colloques, journées thématiques, workshop, etc.) est plafonnée à 3 000 €.*

Coût total du projet (en €) : 32 000

**ATTENTION** : l'apport financier de l'ensemble des partenaires pour le projet doit être au moins égal à 50% du coût total du projet.

Si votre projet est pluriannuel, il ne pourra être subventionné qu'à hauteur des pourcentages suivants :

- 70 % de la subvention demandée sur le budget 2023.
- 30 % de la subvention demandée sur le budget 2024.

Montant de la subvention demandée au titre de l'année 2023 (en €) : 10 500

Si le projet est pluriannuel, montant de la subvention demandée au titre de l'année 2024 (en €) : 4 500

#### Identification du référent financier

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Nom du référent financier du projet | TRAORE Marie   |
| Fonction                            | Secrétaire, responsable SIFAC  |
| Service / unité de rattachement     | EA 4691 BIOS   |
| Adresse                             | 1, Avenue du Maréchal Juin   |
| Téléphone                           | 03 26 91 85 51   |
| Mail                                | <a href="mailto:marie.traore@univ-reims.fr">marie.traore@univ-reims.fr</a> |

**Envoi du dossier de candidature par email à :**

**[reseaesr.siteca@univ-reims.fr](mailto:reseaesr.siteca@univ-reims.fr)**

**Date limite d'envoi : le 15 novembre 2022 inclus.**