

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 953 022**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **11 50401**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 33/569 (2006.01), G 01 N 33/68, C 12 Q 1/68**

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 19.01.11.

③0 Priorité : 08.06.04 FR 0406154.

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 27.05.11 Bulletin 11/21.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés : Division demandée le 19/01/11 bénéficiant de la date de dépôt du 28/04/05 de la demande initiale n° 05 04287.

⑦1 Demandeur(s) : *INGEN BIOSCIENCES Société anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : ARIE JEAN-PHILIPPE.

⑦3 Titulaire(s) : *INGEN BIOSCIENCES Société anonyme.*

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 **NOUVEAUX POLYPEPTIDES POUR LA MISE EN EVIDENCE IN VITRO ET LA PREVENTION DES INFECTIONS STAPHYLOCOCCIQUES SUR PROTHESES ARTICULAIRES ET AUTRES MATERIELS ETRANGERS IMPLANTES.**

⑤7 L'invention a pour objet l'utilisation de nouveaux polypeptides, ou des parties ou des variants desdits nouveaux polypeptides, l'utilisation des séquences codant pour lesdits polypeptides et l'utilisation d'anticorps dirigés contre lesdits polypeptides dans le domaine du diagnostic in vitro d'une infection à *Staphylococcus epidermidis* et/ou *Staphylococcus aureus* sur matériel étranger implanté dans le corps.

FR 2 953 022 - A1



La présente invention concerne un outil de diagnostic sérologique multiparamétrique des infections staphylococciques sur prothèses articulaires (par exemple : infection sur prothèse de hanche, coude, genou, cheville,...) et, plus généralement, des infections staphylococciques sur matériel étranger implanté dans le corps.

L'invention comprend, en particulier, l'identification de nouveaux polynucléotides et polypeptides, leur production, leur optimisation et leur utilisation, d'une part, dans le domaine du diagnostic des infections sur matériel étranger (prothèses articulaires par exemple) impliquant *Staphylococcus aureus* et/ou *Staphylococcus epidermidis* et, d'autre part, dans le domaine de la production de vaccins vis-à-vis de ces différents agents.

Les infections sur prothèses articulaires constituent un problème majeur de santé publique. Des centaines de milliers de prothèses articulaires sont posées annuellement dans le monde et des millions de personnes en portent une ou plusieurs (Lew et Waldvogel. 1997. *Osteomyelitis. N Engl J Med* 336:999-1007). Aux Etats-Unis, on estime qu'environ 430 000 prothèses totales de hanche (en abrégé, PTH) et de genou (en abrégé, PTG) sont posées chaque année (Berbari *et al.*, 1998, *Clin Infect. Dis.*, 27:1247-1254). En Norvège et en Suède, seuls pays où a été mis en place un registre des prothèses, 250 000 PTH ont été posées en 10 ans, entre 1987 et 1996 (Lidgren. 2001. *Joint prosthetic infections: a success story. Acta Othop Scand* 72:553-556). En France, d'après la Société Française d'Orthopédie, le nombre de prothèses posées par an avoisine 100 000 pour les PTH et 25 000 pour les PTG (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé, 2000). Ces chiffres devraient encore progresser dans le futur du fait du vieillissement des

populations (pose de PTH) et des problèmes de surpoids (pose de PTG) dans les pays industrialisés.

Malgré des progrès considérables enregistrés au cours de ces dernières années, les infections sur prothèses articulaires (en abrégé, IPA) restent une complication fréquente, avec des taux de 0,3 à 1,8% pour les PTH (Berbari et al., 1998 [déjà cité] ; Lidgren, 2001 [déjà cité]) et de 0,5 à 5% pour les PTG (Johnson et Bannister. 1986. The outcome of infected arthroplasty of the knee. *J Bone Joint Surg* 68:289-291 ; Bengtson et Knutson. 1991. The infected knee arthroplasty. A 6-year follow-up of 357 cases. *Acta Orthop Scand* 62:301-311 ; Eveillard *et al.* 2002. Risque infectieux après implantation de prothèses de genou. Etude des infections profondes pour une série continue de 210 prothèses totales de genou en première intention. *B E H* n°13). Les taux sont encore plus élevés lorsqu'il s'agit de reprises. L'infection peut survenir dans un délai très variable après la pose de la prothèse. Dans une grande étude américaine ayant porté sur plus de 25 000 patients porteurs d'une PTH ou d'une PTG, le délai moyen entre la pose de la prothèse et le diagnostic d'infection était de 512 jours, avec des délais extrêmes de 3 jours à près de 20 ans, et la distribution des délais était la suivante : 20% dans les 3 mois après la pose, 40% entre 3 mois et 2 ans, et 40% au-delà de 2 ans (Berbari et al., 1998 [déjà cité]).

L'IPA est une complication redoutable, ayant pour conséquences la nécessité d'une ou plusieurs ré-interventions associées à une antibiothérapie au long cours, mais aussi un handicap fonctionnel prolongé, un risque d'amputation, voire de décès (Segawa *et al.* 1999. Infection after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 81:1434-1445). L'impact socio-économique d'une IPA est également très important, avec un coût estimé de plus de 50 000 dollars par épisode (Sculco. 1995. The economic impact of infected joint arthroplasty. *Orthopedics* 18:871-873).

Les staphylocoques

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Observés par Pasteur en 1879

dans un pus de furoncle, les staphylocoques doivent leur nom à Ogston (1881) qui les a mis en évidence dans des abcès aigus et chroniques.

5 On distingue généralement *S. aureus* (plus communément appelé staphylocoque doré) des autres espèces de staphylocoques. A la différence de *S. aureus*, ces dernières espèces ne produisent pas d'enzyme de type coagulase et sont, pour cette raison, regroupées sous la dénomination "staphylocoques à coagulase négative" (en abrégé, SCN).

10 Habitat des staphylocoques

Le réservoir naturel de *S. aureus* est l'homme et les animaux à sang chaud. Le site de colonisation préférentielle de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale : jusqu'à 30% des adultes hébergent *S. aureus* de façon permanente dans leurs narines, et 50% de façon intermittente. A partir de ce site de portage, *S. aureus* colonise la peau et, en particulier, les zones humides (aisselles, périnée) et les mains. *S. aureus* est aussi retrouvé en petites quantités dans l'intestin. Enfin, l'environnement immédiat de l'homme est également une source de contamination potentielle, du fait de la persistance de *S. aureus* après son élimination dans le milieu extérieur.

25 Les SCN représentent les principaux commensaux de la peau avec les corynébactéries et les propionibactéries. La densité de colonisation est plus importante au niveau des zones humides comme la partie antérieure des narines, le périnée, les creux axillaires et les plis inguinaux. La transmission intra- ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Plus rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux).

35 Présents normalement et en grandes quantités au niveau de la peau et des muqueuses, *S. epidermidis* et les autres SCN sont susceptibles de contaminer les prélèvements superficiels ou les prélèvements obtenus par ponction transcutanée comme les hémocultures, voire les prélèvements

per-opératoires profonds réalisés au cours d'un geste chirurgical. De ce fait, on ne retient généralement la responsabilité d'un SCN au cours d'une infection que lorsque cette bactérie a été retrouvée à plusieurs reprises à partir de prélèvements réalisés de façon indépendante.

Rôle des staphylocoques en pathologie humaine

S. aureus est responsable d'infections très diverses. Les plus fréquentes sont les infections cutané-muqueuses telles que folliculites, impétigo, furoncles, anthrax, panaris, cellulites, sinusites ou otites. Ces infections peuvent se compliquer par extension loco-régionale ou par diffusion hémotogène des bactéries. *S. aureus* est ainsi à l'origine de septicémies, d'endocardites, de pneumopathies, d'ostéomyélites, d'arthrites et de méningites. Ces infections peuvent engager le pronostic vital par elles-mêmes (par exemple : atteinte d'une valve cardiaque) ou en cas de choc toxique associé.

S. aureus a longtemps été considéré comme le seul staphylocoque pathogène chez l'homme, tandis que les SCN étaient considérés comme de simples contaminants. Ce n'est que récemment qu'a été établi le rôle majeur des SCN en pathologie humaine, en particulier chez des patients porteurs de prothèses articulaires, de valves cardiaques artificielles ou de dispositifs implantables tels que cathéters vasculaires ou shunts de dérivation du liquide céphalo-rachidien.

S. epidermidis est, de loin, le SCN le plus fréquemment isolé dans les infections sur matériel étranger. Parmi les autres SCN en cause dans ce type d'infections, on peut citer *S. capitis*, *S. caprae*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. simulans* et *S. warneri*.

Les staphylocoques sont les principaux agents des IPA et des autres infections sur matériels étrangers.

Les staphylocoques sont les germes les plus fréquemment retrouvés dans les IPA et les autres infections sur matériels étrangers, puisqu'ils représentent jusqu'à

75% des bactéries isolées, *S. aureus* et *S. epidermidis* étant les espèces prévalentes (Lew et Waldvogel. 1997 [déjà cité]). Le groupe des SCN, au premier rang desquels figure *S. epidermidis*, est à lui seul responsable de 20 à 40% des cas et se range en 1^{ère} ou en 2^{ème} position derrière *S. aureus*, selon les études.

En dehors de *S. epidermidis*, les SCN prévalents sont *S. capitis*, *S. caprae*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. simulans* et *S. warneri*. Parmi ces espèces, *S. capitis*, *S. caprae* et *S. lugdunensis*, sont les principaux SCN autres que *S. epidermidis* responsables d'infections sur prothèses articulaires et, plus généralement, d'infections ostéo-articulaires sur matériel étranger (prothèses articulaires, matériels d'ostéosynthèse) (Rupp et Archer. 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 19:231-243 ; Crichton *et al.* 1995. Subspecies discrimination of staphylococci from revision arthroplasties by ribotyping. *J Hosp Infect* 30:139-147 ; Blanc *et al.* 1999. Infection after total hip replacement by *Staphylococcus caprae*. Case report and review of the literature. *Pathol Biol* 47:409-413 ; Sampathkumar *et al.* 2000. Prosthetic joint infection due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Mayo Clinic Proc* 75:511-512 ; Weightman *et al.* 2000. Bone and prosthetic joint infection with *Staphylococcus lugdunensis*. *J Infect* 40:98-99).

D'une façon générale, les IPA et autres infections sur matériel étranger dues à *S. aureus* sont plus souvent aiguës et suppuratives, en rapport avec la production de nombreuses enzymes et toxines par cette espèce (Nair *et al.* 2000. Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. *Rheumatology* (Oxford) 39:821-834), tandis que les infections à SCN évoluent à bas bruit et sont plutôt chroniques (Von Eiff *et al.* 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2:677-685). Cependant, cette règle est loin d'être toujours respectée : les infections à *S. aureus* prennent souvent un aspect chronique, alors que les infections dues à des SCN tels que *S. lugdunensis* peuvent évoluer sur un mode aigu (Sampathkumar *et al.* 2000 [déjà cité]; Weightman *et al.* 2000 [déjà cité]).

Particularités des infections staphylococciques sur matériel étranger avec formation de biofilm

Les infections staphylococciques sur matériel étranger se distinguent des infections habituelles par l'organisation des bactéries sous forme de biofilm (Costerton, *et al.* 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-22). Ce processus a été décrit chez de nombreux staphylocoques incluant *S. aureus*, mais a surtout été étudié chez *S. epidermidis* (Von Eiff *et al.* 2002 [déjà cité]).

Le biofilm est un édifice tri-dimensionnel complexe associé au matériel étranger et où les cellules bactériennes sont enveloppées dans une matrice extracellulaire de nature polysaccharidique appelée *slime* ou glycocalyx (Davey et O'Toole, 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:847-867). Cette structure particulière peut être formée de bactéries provenant de la même espèce ou d'espèces différentes (Costerton *et al.* 1995. Microbial biofilms. *Ann Rev Med* 49:711-745 ; Watnick et Kolter, 2000. Biofilms, city of microbes. *J Bacteriol* 182:2675-2679). En comparaison de leurs congénères vivant sous forme libre (ou "planctonique"), ces bactéries sont dans un état de quiescence marqué par une faible activité métabolique (Yao *et al.* 2005. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* 191:289-298).

Les infections sur matériel étranger associées à la formation de biofilm présentent un certain nombre de caractéristiques qui les distinguent totalement des infections tissulaires classiques. Ces infections sont le plus souvent pauci-bactériennes (faible nombre de bactéries) et volontiers poly-microbiennes (association de plusieurs espèces ; par exemple : *S. aureus* et *S. epidermidis* ou *S. epidermidis* et un ou plusieurs autres SCN (Costerton *et al.* 1995 [déjà cité] ; Watnick et Kolter, 2000 [déjà cité]). Les bactéries ont un métabolisme très ralenti qui les maintient dans un état proche de la dormance, et les gènes qu'elles expriment sont différents de ceux mis en action chez les

formes planctoniques (Yao *et al.* 2005 [déjà cité]). L'état de dormance des bactéries et la présence du biofilm réduisent considérablement la réaction inflammatoire et l'attraction des cellules immunitaires au site de l'infection (Vuong *et al.* 2004. Crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 279, 52:54881-54886 ; Fux *et al.* 2003. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 1:667-83). Enfin, pour les mêmes raisons, les bactéries sont en grande partie protégées de l'action des antibiotiques (Costerton *et al.* 1995 [déjà cité]).

Méthodes actuelles de diagnostic des infections staphylococciques au laboratoire

Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique d'infection staphylococcique est, aujourd'hui, quasi exclusivement direct, par mise en évidence de la bactérie à partir de prélèvements pertinents.

Le diagnostic repose sur les principales étapes suivantes :

(1) Le prélèvement : aseptique (pour diminuer le risque de contamination par un simple staphylocoque commensal de la peau) et en dehors de toute antibiothérapie (après arrêt ou avant le début du traitement antibiotique).

(2) L'examen microscopique permet la recherche de cocci réguliers, à Gram positif, groupés en amas. Cet examen est très peu sensible et ne fournit aucune indication sur l'espèce en cause.

(3) La culture sur gélose ordinaire dans la majorité des cas ou sur milieu de culture sélectif, type milieu de CHAPMAN (qui contient 7 % de NaCl, du mannitol et un indicateur de pH) si le prélèvement est potentiellement contaminé par d'autres bactéries.

(4) L'identification de la bactérie repose sur la mise en évidence des caractères suivants :

- catalase (différence avec le streptocoque),
- fermentation du glucose en anaérobiose (différence avec le microcoque),

- coagulase (différence avec les SCN),
- DNase thermostable (qui signe l'espèce *S. aureus*),
- minigalerie d'identification (manuelle ou automatisée) (identification des SCN au rang d'espèce),
- 5 - éventuellement, identification moléculaire (par exemple : séquençage du gène *sodA*) (identification des SCN au rang d'espèce).

(5) Le diagnostic est complété par la mesure de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) étant donné la fréquence des résistances chez les staphylocoques, notamment chez les souches hospitalières. Le profil de sensibilité aux antibiotiques est également un élément intéressant, bien qu'imparfait, dans un but de comparaison de souches entre elles (pour un véritable typage, il est nécessaire de recourir à des techniques moléculaires de type électrophorèse en champs pulsés ou "multilocus sequence typing").

Le problème majeur concerne l'interprétation du résultat des cultures, puisque les staphylocoques sont des contaminants fréquents. La règle généralement appliquée est la suivante pour établir un diagnostic d'infection :

- *S. aureus* : au moins un prélèvement pertinent positif (par exemple : une hémoculture),
- SCN : au moins deux prélèvements pertinents et indépendants (par exemple : deux hémocultures prélevées à deux moments différents) positifs au même germe (c'est à dire, en pratique courante, une bactérie de même espèce et de même sensibilité aux antibiotiques).

Ce seuil de deux prélèvements positifs pour les SCN a été récemment remis en question dans le cadre des IPA car jugé trop peu spécifique, et certains auteurs retiennent désormais un seuil de trois prélèvements per-opératoires positifs pour faire un diagnostic d'IPA à SCN (Atkins *et al.* 1998. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. *J Clin Microbiol* 36:2932-2939).

Diagnostic sérologique

Le diagnostic indirect d'infection staphylococcique par recherche des anticorps circulants est aujourd'hui très peu développé et ne concerne que le diagnostic de certaines infections sévères à *S. aureus* hors matériel étranger :

5 endocardites, septicémies, infections ostéo-articulaires hémotogènes (Söderquist *et al.* 1993. Staphylococcal a-toxin in septicaemic patients; detection in serum, antibody response and production in isolated strains. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 5:139-144 ; Nordin *et al.* 1995. Antibody response in patients with osteomyelitis of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79:429-435 ; Kanclerski *et al.* 1996. Serum antibody response to *Staphylococcus aureus* enterotoxins and TSST-1 in patients with septicaemia. *J Med Microbiol* 44:171-177 ; Colque-Navarro *et al.* 1998. Antibody response in *Staphylococcus aureus* septicemia – a prospective study. *J Med Microbiol* 47:217-225 ; Colque-Navarro & Möllby. 1999. Usefulness of staphylococcal serology. *J Med Microbiol* 48:107-109 ; Ellis *et al.* 2003. Role of staphylococcal enterotoxin A in a fatal case of endocarditis. *J Med Microbiol* 52:109-112).

Les tests actuels reposent sur la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de *S. aureus* ou produits à partir de *S. aureus* : anticorps

20 anti- α -toxine (ou antistaphylolysines alpha), anti-acide β -ribitol téichoïque, anti-entérotoxines et anti-toxine 1 de choc toxique staphylococcique (anti-TSST1), et anticorps anti-capsulaires ; la détection des anticorps se fait par

25 inhibition d'hémolyse, électrosynérèse ou ELISA (Bornstein *et al.* 1992. Immune response to staphylococcal toxins and ribitol teichoic acid in *Staphylococcus aureus* infections. *Med Microbiol Lett* 1:111-119 ; Christensson *et al.* 1993. Diagnosing *Staphylococcus aureus* endocarditis by detecting antibodies against *S. aureus* capsular polysaccharides types 5 and 8. *J Infect Dis* 163:530-533 ; Kanclerski

30 *et al.* 1996 [déjà cité]). Ces tests sont globalement peu sensibles et peu spécifiques, et donnent des résultats variables selon les souches en cause, notamment en fonction des toxines qu'elles produisent (par exemple : réponse plus forte pour les souches entérotoxines B et/ou C positives que pour les

35 souches entérotoxine A et/ou TSST1 positives) (Kanclerski *et al.* 1996 [déjà cité]). Enfin, il n'existe pas de tests

permettant d'identifier la classe des anticorps produits, et notamment s'il s'agit d'IgG ou d'IgA.

Aussi bien *S. aureus* que *S. epidermidis* ou les autres SCN sont des bactéries commensales fréquentes de l'homme (membrane nasale pour *S. aureus* et peau pour *S. epidermidis* et les autres SCN) et, identifier des antigènes révélant un processus infectieux est difficile. Cette difficulté est attestée par des études dans le laboratoire de la Déposante où de nombreux antigènes staphylococciques ne sont pas des marqueurs d'infection, les témoins répondant dans les mêmes proportions que les malades avérés.

Diagnostic et suivi des IPA staphylococciques

Il est essentiel de pouvoir diagnostiquer une IPA avec certitude. En effet, le traitement d'une IPA, lourd et coûteux, est associé à un retentissement fonctionnel important et n'est pas dénué de risque vital. En général, le traitement consiste en un débridement chirurgical extensif et méticuleux associé à une antibiothérapie adaptée et prolongée ; les principales options chirurgicales sont l'échange en un temps de la prothèse, le débridement avec rétention de la prothèse et la réimplantation de la prothèse en deux temps, ce qui nécessite des temps d'hospitalisation plus longs (Garvin et Hanssen. 1995. Current concepts review. Infection after total hip arthroplasty. Past, present, and future. *J Bone Joint Surg* 77-A:1576-1588). La mortalité associée à l'intervention chirurgicale pour IPA est de 0,4 à 1,2% pour les patients de 65 ans et de 2 à 7% pour les patients de 80 ans (Lentino. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* 36:1157-1161).

Le risque d'échec infectieux est élevé après réintervention sur IPA, allant en moyenne de 10 à 40% selon la localisation, la gravité des lésions et le type de traitement chirurgical. L'échec n'est pas toujours infectieux et, d'autre part, peut impliquer un autre germe que celui à l'origine du premier épisode d'IPA (germe associé non retrouvé dans les prélèvements per-opératoires ou germe inoculé accidentellement au cours de la reprise).

Un test de suivi sérologique permettrait de faire un diagnostic précoce d'échec, en en précisant la nature infectieuse et le germe en cause.

5 En dehors du cas des IPA aigus ou suraigus, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de tests permettant de faire un diagnostic pré-opératoire fiable d'IPA et, en particulier, de différencier une IPA d'un descellement aseptique, qui est traité par un simple échange de prothèse en un seul temps et qui ne nécessite aucune
10 antibiothérapie. Les signes cliniques sont trompeurs : douleur et inflammation ne sont pas spécifiques d'infection, et la fièvre est le plus souvent absente. La radiographie simple est peu sensible et les anomalies signant l'infection d'apparition est tardive. Les marqueurs
15 biologiques d'inflammation, tels que vitesse de sédimentation (en abrégé, VS) ou protéine C réactive (en abrégé, CRP), sont peu sensibles et peu spécifiques.

Aujourd'hui, le diagnostic de certitude d'IPA ne peut donc être établi que par la culture de prélèvements per-
20 opératoires ou de liquide d'aspiration impliquant un geste chirurgical sous anesthésie générale (dans certaines situations, il est également possible de réaliser des prélèvements de type "true-cut" sans abord chirurgical, mais sous anesthésie générale).

25 Cette stratégie présente plusieurs défauts :

- il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de faire un diagnostic d'IPA pré-opératoire, et encore moins de connaître le ou les germes en cause,

30 - les techniques de mise en culture des prélèvements per-opératoires ne sont pas standardisées et des études récentes montrent que les techniques usuelles manquent de sensibilité (Tunney *et al.* 1999. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 37:3281-3290),

35 - les délais de culture sont particulièrement longs dans les formes chroniques,

- l'interprétation du résultat des cultures reste controversé : le seuil d'au moins trois prélèvements indépendants positifs proposé par le groupe OSIRIS d'Oxford offre une excellente spécificité (Atkins *et al.* 1998 [déjà cité]), mais
5 pourrait manquer de sensibilité, notamment en cas de préparation sub-optimale des échantillons.

Aucune des méthodes de diagnostic actuelles n'a recours à l'utilisation d'antigène purifié pour mettre en évidence une infection staphylococcique sur prothèse
10 articulaire et les méthodes sérologiques actuelles ne permettent ni de réaliser des suivis thérapeutiques ni de réaliser des diagnostics post-implantatoires.

Il existe donc, dans ce domaine, un très grand besoin en une technique de diagnostic sérologique afin de réaliser
15 des tests rapides, peu coûteux et non invasifs. Idéalement ces tests devraient permettre d'identifier le germe ou les germes en cause et, en particulier, devraient permettre de distinguer *S. aureus*, dont le pouvoir de destruction tissulaire est très important, des autres staphylocoques.

L'utilisation de ces tests pourrait également permettre un diagnostic précoce d'IPA et, donc, une prise
20 en charge chirurgicale moins délabrante à un stade d'infection débutante. Ceci pourrait être réalisé par un suivi sérologique longitudinal, c'est-à-dire un suivi sur une période de temps substantielle, des patients après pose
25 de prothèse (diagnostic post-implantatoire), notamment chez les patients présentant un risque élevé d'IPA.

Enfin, dans l'avenir, en cas de développement d'approches vaccinales visant à prévenir les IPA
30 staphylococciques notamment, mais non exclusivement, celles dues à *S. aureus*, de tels tests seront indispensables pour détecter les échecs de vaccination.

La présente invention a pour objectif de résoudre les problèmes posés par l'absence de tests sérologique
35 permettant la mise en évidence d'une infection à staphylocoques sur matériel étranger, notamment sur prothèse articulaire, par détection d'anticorps circulants.

Elle a, en outre, pour objectif de permettre la détection d'anticorps circulants vis-à-vis de bactéries qui se trouvent en état de dormance et protégées du système immunitaire par leur présence au sein d'un biofilm. Elle a, 5 de plus, pour objectif de permettre le diagnostic d'infections staphylococciques poly-microbiennes (c'est à dire impliquant plusieurs espèces différentes).

L'invention a, pour objectif supplémentaire, de permettre une analyse plus précise et plus complète grâce à 10 la détection des différents isotypes d'anticorps spécifiques des polypeptides.

Définitions

Les définitions suivantes sont données afin de faciliter la compréhension de certains termes utilisés dans 15 cette description.

On entend par "polynucléotide", un polyribonucléotide ou un polydésoxyribonucléotide qui peut être un ADN ou un ARN modifié ou non.

Le terme polynucléotide inclut, sans limitation, un 20 ADN simple brin ou double brin, un ADN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brin, un ADN qui est un mélange de régions simple brin, double brin et/ou triple brin, un ARN simple brin ou double brin, un ARN composé d'un mélange 25 d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brin et les molécules hybrides comprenant un ADN et un ARN qui peuvent comprendre des régions simple brin, double brin et/ou triple brin ou un mélange de régions simple brin et double brin. Le terme 30 polynucléotide peut aussi comprendre un ARN et/ou un ADN comprenant une ou plusieurs régions triple brin. Les brins dans de telles régions peuvent provenir de la même molécule ou de molécules différentes. Par conséquent, les ADN ou ARN avec des squelettes modifiés pour la stabilité ou d'autres 35 raisons sont inclus dans le terme polynucléotides. On entend également par polynucléotide, les ADN et ARN contenant une ou plusieurs bases modifiées. On entend par

base modifiée, par exemple, les bases inhabituelles telles que l'inosine. Le terme polynucléotide vise également les polynucléotides de forme modifiée chimiquement, enzymatiquement ou métaboliquement. Les polynucléotides
5 comprennent également les polynucléotides courts tels que les oligonucléotides.

On entend par "polypeptide", un peptide, un oligopeptide, un oligomère ou une protéine comprenant au moins deux acides aminés joints l'un à l'autre par une
10 liaison peptidique normale ou modifiée.

Le terme polypeptide comprend les chaînes courtes, appelées peptides, oligopeptides et oligomères, et les chaînes longues, appelées protéines.

Un polypeptide peut être composé d'acides aminés
15 autres que les 20 acides aminés codés par les gènes humains. Un polypeptide peut également être composé d'acides aminés modifiés par des processus naturels, tels que le processus de maturation post-traductionnel ou par des procédés chimiques, qui sont bien connus de l'homme du
20 métier. Le même type de modification peut être présent à plusieurs endroits du polypeptide et n'importe où dans le polypeptide : dans le squelette peptidique, dans la chaîne d'acides aminés ou encore aux extrémités carboxy- ou amino-terminales.

25 Un polypeptide peut être ramifié suite à une ubiquitination ou être cyclique avec ou sans ramification. Ce type de modifications peut être le résultat de processus de post-traduction naturel ou synthétique, qui sont bien connus de l'homme du métier.

30 On entend, par exemple, par modifications d'un polypeptide, l'acétylation, l'acylation, l'ADP-ribosylation, l'amidation, la fixation covalente de flavine, la fixation covalente d'un hème, la fixation covalente d'un nucléotide ou d'un dérivé nucléotidique, la
35 fixation covalente d'un lipide ou d'un dérivé lipidique, la fixation covalente d'un phosphatidylinositol, la réticulation covalente ou non-covalente, la cyclisation, la

formation de pont disulfure, la déméthylation, la formation de cystéine, la formation de pyroglutamate, la formylation, la gamma-carboxylation, la glycosylation, la formation d'ancre au GPI, l'hydroxylation, l'iodisation, la méthylation, la myristoylation, l'oxydation, le processus protéolytique, la phosphorylation, la prénylation, la racémisation, la sénéloylation, la sulfatation, l'addition d'acides aminés telles que l'arginylation ou l'ubiquitination (PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993) and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications : Perspectives and Prospects, pgs 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990) and Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

On entend par "pourcentage d'identité" entre deux séquences polynucléotidiques ou polypeptidiques le pourcentage de nucléotides ou d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons entre deux séquences polynucléotidiques ou polypeptidiques sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par "fenêtre de comparaison" pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. Cette comparaison peut être réalisée grâce à un programme, par exemple le programme EMBOSS-Needle (alignement global Needleman-Wunsch) à l'aide de la matrice BLOSUM62/Open Gap 10.0 et Extension Penalty de 0,5 (Needleman et Wunsch (1970). *J. Mol. Biol.* 48, 443-453 et Kruskal, J.B. (1983), An overview of sequence comparison, In D. Sankoff and J.B. Kruskal, (ed), Time warps, strind edits and macromolecules : the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley).

Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le

nucléotide ou l'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100.

5 Un polynucléotide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95% avec le polynucléotide ID SEQ N°1 est donc un polynucléotide comportant, au plus, 5 nucléotides modifiés sur 100 nucléotides, par rapport à ladite séquence. En d'autres termes jusqu'à 5% des nucléotides de
10 la séquence ID SEQ N°1 peuvent être délétés ou substitués par un autre nucléotide, ou jusqu'à 5% du nombre total de nucléotides de la séquence ID SEQ N°1 peuvent être insérés dans ladite séquence. Ces modifications peuvent être positionnées aux extrémités 3' et/ou 5', ou à un endroit
15 quelconque entre ces extrémités, en un seul ou plusieurs emplacements.

Par analogie, un polypeptide ayant une identité d'au moins 95% avec le polypeptide ID SEQ N°2 est un polypeptide comportant, au plus, 5 acides aminés modifiés sur 100
20 acides aminés, par rapport à ladite séquence. En d'autres termes jusqu'à 5% des acides aminés dans la séquence ID SEQ N°2 peuvent être délétés ou substitués par un autre acide aminé ou jusqu'à 5% du nombre total d'acides aminés de la séquence ID SEQ N°2 peuvent être insérés dans ladite
25 séquence. Ces altérations de la séquence peuvent être situées aux positions amino et/ou carboxy-terminales de la séquence d'acides aminés ou à un endroit quelconque entre ces positions terminales, en un ou plusieurs emplacements. (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford
30 University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987).

La "similarité" est, quant à elle, calculée de la
35 même façon que l'identité, excepté que les acides aminés non identiques, mais présentant des caractéristiques

physico-chimiques communes, sont considérés comme identiques.

On entend par "cellule hôte", une cellule qui a été transformée ou transfectée, ou est capable de transformation ou de transfection, par une séquence polynucléotidique exogène.

On entend par "milieu de culture", le milieu dans lequel on purifie le polypeptide de l'invention. Ce milieu peut être constitué par le milieu extracellulaire et/ou le lysat cellulaire. Des techniques bien connues de l'homme du métier permettent également à ce dernier de redonner la conformation active au polypeptide, si la conformation dudit polypeptide a été altérée lors de l'isolation ou de la purification.

On entend par "fonction", l'activité biologique d'un polypeptide ou d'un polynucléotide.

La fonction d'un polypeptide conforme à l'invention est celle d'un antigène de *Staphylococcus epidermidis* et/ou de *Staphylococcus aureus* et/ou de *Staphylococcus caprae*, et la fonction d'un polynucléotide conforme à l'invention est celle de coder ce polypeptide. La fonction d'une combinaison d'antigènes est de permettre d'établir un diagnostic d'une infection sur matériel étranger et, en particulier, sur prothèse ostéoarticulaire, mais aussi de réaliser des suivis post-implantatoire, des suivis thérapeutiques et, enfin, de préciser s'il s'agit d'une infection active ou aiguë par, par exemple, l'utilisation de la détection de différents isotopes d'anticorps.

On entend par "antigène", tout composé qui, seul ou en association avec un adjuvant ou porteur, est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique. Cette définition comprend également tout composé présentant une analogie structurale avec ledit antigène capable d'induire une réponse immunologique dirigée contre ledit antigène.

On entend par "analogie structurale" une analogie aussi bien de la structure primaire (séquence) que de la structure secondaire (éléments structuraux), de la

structure tertiaire (structure tridimensionnelle) ou de la structure quaternaire (association de plusieurs polypeptides dans un même complexe). (BIOCHEMISTRY, 4^{ème} Ed, L. Stryer, New York, 1995).

5 On entend par "variant" d'un polynucléotide dit initial ou d'un polypeptide dit initial, respectivement, un polynucléotide ou un polypeptide qui en diffère par au moins un nucléotide ou un acide aminé, mais qui garde les mêmes propriétés intrinsèques, c'est-à-dire la même
10 fonction.

Une différence dans la séquence polynucléotidique du variant peut altérer ou non la séquence d'acides aminés du polypeptide qu'il code, par rapport à un polypeptide initial. Néanmoins, par définition, ces variants doivent
15 conférer la même fonction que la séquence polynucléotidique initiale, par exemple, coder un polypeptide ayant une fonction antigénique.

Le polynucléotide ou le polypeptide variant diffère généralement du polynucléotide initial ou du polypeptide
20 initial par une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s), délétion(s), fusion(s) ou troncation(s) ou plusieurs de ces modifications, prises en combinaison. Un variant non-naturel d'un polynucléotide initial ou d'un polypeptide initial peut être obtenu, par exemple, par
25 mutagenèse dirigée ou par synthèse directe.

On définit comme "séquence polynucléotidique complémentaire à la séquence polynucléotidique", un polynucléotide qui peut être hybridé avec cette séquence polynucléotidique dans des conditions stringentes.

30 On entend généralement, mais pas nécessairement, par "conditions stringentes" les conditions chimiques qui permettent une hybridation lorsque les séquences polynucléotidiques ont une identité d'au moins 80%.

Ces conditions peuvent être obtenues selon les
35 méthodes bien connues de l'homme du métier.

On entend par "anticorps", les anticorps monoclonaux, polyclonaux, chimériques, simple chaîne, humanisés ainsi

que les fragments Fab, incluant les produits d'un Fab ou d'une banque d'expression d'immunoglobulines. Il est aussi possible d'utiliser à la place des anticorps d'autres molécules immunospécifiques par exemple des récepteurs de
5 cellules T (TCR) comme récemment décrit (Li *et al.* 2005. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. *Nat Biotechnol.* 23:349-54) ou des molécules sélectionnées pour leur fixation spécifique, par exemple par évolution dirigée. (voir par exemple Conrad et Scheller. 2005. Considerations on antibody-phage display
10 methodology. *Comb Chem High Throughput Screen.* 8:117-26).

Un anticorps immunospécifique peut être obtenu par administration à un animal d'un polypeptide donné suivie d'une récupération des anticorps produits par ledit animal par extraction depuis ses fluides corporels. On peut
15 également administrer à l'animal un variant dudit polypeptide, ou des cellules hôtes exprimant ce polypeptide.

Le terme "immunospécifique" appliqué au terme anticorps, vis-à-vis d'un polypeptide donné, signifie que
20 l'anticorps possède une meilleure affinité pour ce polypeptide que pour d'autres polypeptides connus de l'art antérieur.

Par sérum "positif", on entend un sérum contenant des anticorps, produits à la suite d'une infection à
25 *S. epidermidis* ou *S. aureus* sur prothèse articulaire, identifiés par leur liaison avec les polypeptides (antigènes) de l'invention.

On entend par "sensibilité" la proportion de malades infectés, diagnostiqués selon l'art antérieur et donnés
30 positifs par le diagnostic selon l'invention.

On entend par "spécificité" la proportion de donneurs de sang, testés comme témoins, soumis au diagnostic selon l'invention et donnés négatifs par le diagnostic selon
l'invention.

35

La présente invention répond aux objectifs qu'elle s'est fixés plus haut en apportant de nouveaux

polynucléotides et de nouveaux polypeptides, et ainsi que des fragments qui se sont révélés plus pertinents et/ou plus sensibles et/ou plus spécifiques que la protéine entière.

5 L'invention a pour objet l'utilisation, *in vitro*, de l'une au moins des protéines de séquence ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36, d'une partie ou de variants de cette protéine, de
10 cellules hôtes comprenant des vecteurs incluant un polynucléotide codant pour l'une au moins desdites protéines ou un variant desdites protéines, dans la production d'anticorps et le domaine du diagnostic *in vitro* de *Staphylococcus epidermidis* et/ou *S. aureus*. L'invention a également pour objet un kit de diagnostic et une
15 composition pharmaceutique.

Utilisation des polypeptides

Le laboratoire de la Déposante connaît des polypeptides issus de *S. epidermidis* ou *S. aureus* qui ne permettent pas de pronostiquer une infection sur matériel
20 étranger, notamment sur prothèse articulaire (par exemple : la protéine "Thimet oligopeptidase-like protein" (Q8CPS6) recombinante de *S. epidermidis*).

La Déposante a cependant identifié, de façon tout à fait inattendue, qu'un tel pronostic était possible en
25 utilisant d'autres polypeptides issus de *S. epidermidis* ou *S. aureus* qu'elle a spécifiquement identifiés et, même, des fragments de polypeptides issus de *S. epidermidis* ou *S. aureus* qui, complets, ne permettent pas ce pronostic.

L'identification des polypeptides selon l'invention
30 est le résultat d'un crible et d'études approfondies que les séquences issues des programmes de génomique de *S. epidermidis* ou *S. aureus* ne laissaient pas envisager.

Ainsi, la présente invention a pour objet l'utilisation, dans la production d'anticorps et dans le
35 domaine du diagnostic *in vitro* d'infections à *Staphylococcus epidermidis* et/ou *S. aureus*, d'au moins un polypeptide comprenant :

- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 (appelée protéine E4), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1 ; ou
- 5 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°4 (appelée protéine 2B6), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°3 ; ou
- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°6 (appelée protéine F2), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°5 ; ou
- 10 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°8 (appelée protéine 3F7), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°7 ; ou
- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°10 (appelée protéine 2D6B1), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°9 ; ou
- 15 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°12 (appelée protéine JR7), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°11 ; ou
- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°14 (appelée protéine JR12), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°13 ; ou
- 20 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°16 (appelée protéine JR5), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°15 ; ou
- 25 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°18 (appelée protéine 3A7), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°17 ; ou
- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°20 (appelée protéine 3B6), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°19 ; ou
- 30 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°22 (appelée protéine 3D5), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°21 ; ou
- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°24 (appelée protéine 3E5), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°23 ; ou
- 35

- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°26 (appelée protéine 3F3), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°25 ; ou

5 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°28 (appelée protéine 3G3), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°27 ; ou

- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°30 (appelée protéine 3H3), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°29 ; ou

10 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°32 (appelée protéine 3H4), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°31 ; ou

- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°34 (appelée protéine 3D7), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°33 ; ou

15 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°36 (appelée protéine 3C7), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°35.

20 La présente invention vise également l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant :

a) une partie de la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36 ayant la même fonction que ladite séquence, ou

25 b) une séquence d'acides aminés ayant au moins 60% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité, et mieux au moins 90% d'identité, avec l'une des séquences d'acides aminés ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36, ou avec la partie de séquence
30 définie sous a), et ayant la même fonction que ladite séquence.

Ainsi, des polypeptides conformes à l'invention peuvent comprendre des variants des séquences d'acides aminés ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24,
35 26, 28, 30, 32, 34 ou 36.

La séquence polypeptidique ID SEQ N°4, appelée protéine 2B6, codée par la séquence ID SEQ N°3, comprend

les acides aminés 1 à 184 de la séquence ID SEQ N°2 et a la même fonction que la séquence ID SEQ N°2.

La séquence polypeptidique ID SEQ N°6 (appelée protéine F2), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°5, présente 60% d'identité et 78% de similarité avec la séquence ID SEQ N°2.

D'autres variants des séquences ID SEQ N°2, 4 et 6 sont, par exemple, une partie de la protéine AtlC (3F7 (ID SEQ N°8) par exemple) codée par la bactérie *Staphylococcus caprae*.

Grâce aux polypeptides définis ci-dessus, l'invention permet la détection d'anticorps naturellement produits lors d'infections à staphylocoques sur prothèse articulaire.

L'invention vise, en outre, l'utilisation des polypeptides selon l'invention, pour détecter, périodiquement, *in vitro*, les anticorps dirigés contre *S. epidermidis* et/ou *S. aureus* et ainsi suivre l'évolution de la pathologie et de l'effet d'un traitement appliqué à un patient.

Les échantillons biologiques testés peuvent être du sang, de l'urine, de la salive, du liquide de ponction de sérologie (par exemple liquide céphalo-rachidien, liquide pleural ou liquide articulaire) ou l'un de leurs constituants (par exemple, le sérum).

Le diagnostic *in vitro* d'une infection à *Staphylococcus epidermidis* et/ou *S. aureus* est effectué, par exemple, par des tests classiques de réactions immunologiques, tels que ELISA ou Western Blot. Ces tests utilisent l'un des polypeptides selon l'invention qui vient se fixer, de manière spécifique, aux anticorps sériques contre *Staphylococcus epidermidis* et/ou *aureus* présents dans les échantillons biologiques.

Utilisation de vecteurs d'expression et de cellules hôtes

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'un polypeptide préparé par culture d'une

cellule hôte comprenant un vecteur recombinant ayant, inséré, un polynucléotide codant pour ledit polypeptide.

De nombreux systèmes d'expression peuvent être utilisés comme, par exemple, les chromosomes, les épisomes, 5 les virus dérivés. Plus particulièrement, les vecteurs recombinants utilisés peuvent être dérivés de plasmides bactériens, de transposons, d'épisome de levure, d'éléments d'insertion, d'éléments chromosomiques de levures, de virus tels que les baculovirus, les *papillonna virus* comme SV40, 10 les *vaccinia virus*, les adénovirus, les *fox pox virus*, les *pseudorabies virus*, les rétrovirus.

Ces vecteurs recombinants peuvent également être des dérivés de cosmides ou de phagemides. La séquence polynucléotidique peut être insérée dans le vecteur 15 recombinant d'expression par les méthodes bien connues de l'homme du métier.

Le vecteur recombinant peut comprendre des séquences polynucléotidiques de contrôle de la régulation de l'expression du polynucléotide ainsi que des séquences 20 polynucléotidiques permettant l'expression et la transcription d'un polynucléotide selon l'invention et la traduction d'un polypeptide selon l'invention, ces séquences étant choisies en fonction des cellules hôtes mises en oeuvre.

L'introduction du vecteur recombinant dans une 25 cellule hôte peut être effectuée selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la transfection par phosphate de calcium, la transfection par lipides cationiques, l'électroporation, la transduction ou 30 l'infection.

Les cellules hôtes peuvent être, par exemple, des cellules bactériennes, telles que des cellules de streptocoques, de staphylocoques, d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis* ; des cellules de champignons, telles que 35 des cellules de levure et des cellules d'*Aspergillus* ; des cellules de *Streptomyces* ; des cellules d'insectes, telles que des cellules de *Drosophila S2* et de *Spodoptera Sf9* ;

des cellules animales, telles que les cellules CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 ou encore des cellules végétales.

Le polypeptide peut être purifié à partir des cellules hôtes, selon les méthodes bien connues de l'homme
5 du métier, telles que la précipitation à l'aide d'agents chaotropiques comme les sels, en particulier le sulfate d'ammonium, l'éthanol, l'acétone ou l'acide trichloroacétique, ou de moyens tels que l'extraction à l'acide, la chromatographie échangeuse d'ions, la
10 chromatographie sur phosphocellulose, la chromatographie par interaction hydrophobe, la chromatographie d'affinité, la chromatographie sur hydroxylapatite ou les chromatographies d'exclusion.

Utilisation des polynucléotides

15 La présente invention a également pour objet l'utilisation, dans la production d'anticorps et dans le diagnostic d'une infection à *Staphylococcus epidermidis* et/ou *aureus*, d'au moins un polynucléotide comprenant la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1, 3, 5, 7, 9 11, 13,
20 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35, codant, respectivement, pour la protéine 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36.

L'invention vise également l'utilisation d'au moins un polynucléotide comprenant :

25 a) une partie de la séquence ID SEQ N°1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35 et ayant la même fonction que ladite séquence, ou

b) une séquence polynucléotidique ayant au moins 60% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité, et mieux
30 au moins 90% d'identité, avec la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35, ou avec la partie de séquence telle que définie sous a), et ayant la même fonction que ladite séquence, ou

35 c) une séquence polynucléotidique complémentaire à la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35 ou à la

partie de séquence définie sous a) ou à la séquence définie sous b).

La séquence polynucléotidique ID SEQ N°3 comprend les nucléotides 1 à 552 de la séquence ID SEQ N°1 et a la même
5 fonction que ladite séquence.

La séquence polynucléotidique ID SEQ N°5 (appelée F2 et extraite à partir du génome de *Staphylococcus aureus*) est un variant de la séquence ID SEQ N°1.

D'autres variants sont, par exemple, des séquences
10 polynucléotidiques codant pour des protéines de la famille des autolysines (par exemple, la séquence ID SEQ N°7, variant de la séquence ID SEQ n°1, codant pour une partie de la protéine AtlC, appelée 3F7 et présente dans la bactérie *Staphylococcus caprae*). Ainsi, des polynucléotides
15 conformes à l'invention peuvent comprendre des variants de l'une des séquences polynucléotidiques ID SEQ N°1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35.

Les polynucléotides de l'invention peuvent être obtenus par les méthodes standard de synthèse d'ADN ou
20 d'ARN.

Les polynucléotides conformes à l'invention peuvent également comprendre des séquences polynucléotidiques comme les séquences 5' et/ou 3' non-codantes, telles que, par exemple, des séquences transcrites, des séquences non-traduites, des séquences signal d'épissage, des séquences polyadénylées, des séquences de liaison avec des ribosomes ou encore des séquences qui stabilisent l'ARNm.

Utilisations des anticorps selon l'invention

L'invention vise également l'utilisation d'anticorps,
30 selon l'invention, pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques la présence d'antigènes de *S. epidermidis* et/ou *S. aureus*.

L'invention vise, en outre, l'utilisation d'anticorps selon l'invention, pour détecter, périodiquement, *in vitro*,
35 les antigènes de *S. epidermidis* et/ou *S. aureus* et ainsi suivre l'évolution de la pathologie et de l'effet d'un traitement appliqué à un patient.

Les anticorps immunospécifiques peuvent être obtenus par administration d'un polypeptide selon l'invention, d'un de ses fragments, d'un analogue ou d'un fragment épitopique ou d'une cellule exprimant ce polypeptide, à un mammifère, de préférence non humain, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, on peut utiliser des méthodes usuelles de production d'anticorps, à partir de lignées cellulaires, telles que la technique des hybridomes, la technique des triomes, la technique des hybridomes de cellules B humaines et la technique des hybridomes EBV.

Isotypes d'anticorps et affinité

Les immunoglobulines (ou anticorps) sont constituées de deux chaînes polypeptidiques différentes : deux chaînes légères (L) d'isotypes [kappa] ou [lambda], et de deux chaînes lourdes (H) d'isotypes [gamma], [alpha], [mu], [delta] ou [epsilon]. Ces quatre chaînes sont liées covalamment par des ponts disulfures. Les deux types de chaînes H ou L possèdent des régions qui contribuent à la fixation des antigènes et sont très variables d'une immunoglobuline à une autre. Ces régions déterminent l'affinité des anticorps pour leur ligand.

Les isotypes des chaînes lourdes permettent de définir la classe de l'immunoglobuline ; il existe donc 5 isotypes d'anticorps (IgA, IgM, IgD, IgE et IgG). Des sous-classes, par exemple IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 sont définies par des différences de séquence de la chaîne lourde. Les différentes classes d'immunoglobulines ont des propriétés physicochimiques propres et leur synthèse dépend directement des phases et des niveaux d'activation de la réponse immunitaire.

Chez l'homme, les IgG représentent la principale classe d'immunoglobulines : leur concentration sérique chez l'adulte varie de 8 à 16 g/l. Leur demi-vie plasmatique est d'environ 3 semaines.

Les IgA constituent la deuxième classe d'immunoglobulines sériques, après les IgG, en terme de concentration (2 à 4 g/l). En revanche, elles représentent la classe prépondérante des immunoglobulines dans les
5 sécrétions (sécrétions respiratoires, salivaires, digestives..., lait, colostrum, larmes). Sur le plan structural, les IgA ont la particularité de se présenter sous plusieurs formes moléculaires :

- dans le sérum, les IgA peuvent se présenter sous
10 forme de monomères (forme prépondérante) ou sous forme de dimères associés à une chaîne J (chaîne de jonction). La chaîne J est un peptide riche en cystéine de 137 acides aminés (poids moléculaire : 15 000 Da), d'origine plasmocytaire ; la sous-classe IgA1 est prépondérante dans
15 le sérum.

- dans les sécrétions, les IgA, appelées IgA sécrétoires, sont sous forme de dimères ; elles sont donc associées à une chaîne J, mais elles comportent également un composant sécrétoire. Les IgA produites par les
20 lymphocytes B sont captées par les cellules épithéliales, par un récepteur (polyIgR) situé au pôle basal de la cellule. C'est pendant le transfert de l'IgA à travers la cellule épithéliale, vers le pôle apical de la cellule, que le composant sécrétoire (poids moléculaire : 70 000 Da), ou
25 pièce sécrétoire, est ajouté. Le rôle de la pièce sécrétoire est de protéger les IgA sécrétoires vis-à-vis des enzymes protéolytiques présents dans les sécrétions.

Comme les IgA, les IgM peuvent se présenter sous 2 formes moléculaires distinctes :

30 - une forme monomérique : c'est la forme sous laquelle les IgM sont synthétisées et insérées dans la membrane du lymphocytes B ;

- une forme pentamérique : c'est la forme sous laquelle les IgM sont sécrétées. Les 5 monomères de bases
35 sont reliés par des ponts disulfures. De plus, une chaîne J relie l'extrémité de 2 monomères.

Les IgD représentent moins de 1 % des immunoglobulines sériques. Elles sont habituellement coexprimées avec les IgM à la surface des lymphocytes B où elles semblent jouer un rôle de récepteur pour les antigènes.

Les IgE ne sont présentes, chez un sujet normal, qu'à l'état de traces.

Cinétique d'apparition des anticorps et affinité

La cinétique d'apparition d'anticorps spécifiques et d'un isotype donné est aujourd'hui encore mal comprise. D'une façon générale les cellules B dites naïves synthétisent différents IgM qui constituent un large répertoire de molécules capables de fixer des antigènes (Steven A. Frank., Immunology and Evolution of Infectious Disease. (2002), Princeton University Press, Princeton, USA). Ainsi lors de la première exposition à un antigène, celui-ci va se fixer avec une faible affinité à différents IgM du système immunitaire. Cette interaction va néanmoins stimuler la division de la cellule B naïve correspondante. La division est d'autant plus rapide que l'affinité de l'IgM est forte ce qui permet une sélection initiale des meilleurs clones. De plus, lors de la division les réarrangements génétiques permettent l'augmentation de l'affinité des anticorps. La région constante des immunoglobulines change également afin de produire des IgG dans le système circulatoire et des IgA à la surface des muqueuses (Steven et Frank 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton University Press, Princeton, USA).

Il peut donc être déduit par l'homme de l'art que la présence d'une ou plusieurs classes d'anticorps et l'affinité particulière des anticorps ont différentes implications d'un point de vue du diagnostic médical dans la différenciation des infections récurrentes ou non, d'une infection active, aiguë, chronique, latente, et récente.

Les kits

L'invention a également pour objet des kits de diagnostic *in vitro* comprenant au moins l'un des polypeptides conformes à l'invention, ou au moins l'un des

polynucléotides codant pour lesdits polypeptides, ainsi que des kits de diagnostic *in vitro* comprenant au moins l'un des anticorps conformes à l'invention.

Les vaccins

5 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, utilisable comme vaccin, renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'invention ou un polynucléotide ou un vecteur recombinant ou une cellule hôte selon l'invention.

10

Partie expérimentale

A) Protocoles d'obtention des antigènes

A.1. Clonage de la séquence codant pour les polypeptides ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36

15 Les gènes codant pour les séquences des polypeptides, qui sont des antigènes, sont obtenus par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique des bactéries *Staphylococcus epidermidis* (souche WHO 12, ATCC 12228),
20 *Staphylococcus caprae* (ATCC 35538) ou *Staphylococcus aureus* (souche MU50, ATCC 700699 ou MW2) en utilisant, respectivement, des amorces spécifiques des séquences ID SEQ N°1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35. On entend par amorces spécifiques de
25 courtes séquences nucléotidiques capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire ; ces amorces sont choisies par l'homme de l'art de façon à encadrer la séquence d'ADN et à l'amplifier spécifiquement (par exemple
30 ID SEQ N°1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35).

Le fragment correspondant, ainsi amplifié, est cloné dans un vecteur selon des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. Ce vecteur permet la
35 production des protéines clonées sous contrôle d'un promoteur inductible par l'isopropyl-thiogalactoside (IPTG). Les protéines clonées correspondent aux

polypeptides ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36.

A.2. Expression des protéines

Une souche d'*Escherichia coli* est transformée par les
5 vecteurs d'expression précédemment décrits. Les bactéries
sélectionnées sont mises à cultiver une nuit à 30°C sous
agitation dans 30 ml de milieu Luria Bertani (LB, J. Miller, "A
short Course in Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)
contenant de l'ampicilline à une concentration finale de
10 100 µg/ml. Le lendemain, la culture est diluée au 1/50^{ème}
dans un volume final de 1 litre de milieu LB additionné
d'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml qui
est incubée à 30°C sous agitation. Lorsque la turbidité de
15 la culture atteint une valeur d'absorbance à 600 nm (en
abrégé, A600) d'environ 0,7, la production de la protéine
est induite par l'isopropyl-thiogalactoside (en abrégé,
IPTG) à une concentration finale de 0,1 mM. Les bactéries
sont récoltées par centrifugation (10 minutes à 1400xg et à
4°C) lorsque la turbidité de la culture atteint une A600
20 d'environ 1,5.

A.3. Purification des protéines

Après centrifugation, les cellules sont remises en
suspension dans un tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8,0 contenant
du saccharose à 0,5 mM, puis traitées par du lysozyme
25 (0,2 g/l) en présence d'acide éthylènediaminotétraacétique
(EDTA) 12,5 mM, de DNase, RNase et PMSF. La suspension est
incubée 30 minutes à 4°C puis centrifugée 10 minutes à 4°C
à 15500xg. Le culot est congelé à -20°C pendant au moins
une nuit.

A.4. Exemple : purification de 3C7 (ID SEQ N°36)

Après décongélation, les bactéries sont reprises dans
un tampon Mes 25 mM à pH 6,0, puis soniquées 4 fois
20 secondes dans la glace. Après centrifugation à 15500xg à
4°C pendant 30 minutes, le surnageant est filtré sur
35 membrane de porosité 0,22 µm. Le filtrat est alors déposé
sur une colonne échangeuse de cation (par exemple, SP-
Sépharose 12 ml, Amersham Biosciences). Après lavage de la

colonne, la protéine est éluée par un gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl dans du tampon Mes 25 mM à pH 6,0 en 20 volumes de colonne. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées et les protéines sont précipitées par du sulfate d'ammonium à une concentration finale de 0,6 g/l. La solution est laissée au moins une nuit à 4°C puis centrifugée 30 minutes à 20800xg. Le culot est alors repris dans un volume le plus faible possible (en général 300 µl de tampon Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0 contenant du NaCl 100 mM puis déposé sur une colonne de gel filtration, par exemple Superdex HR75-10/30, Amersham). Les fractions éluées contenant la protéine sont rassemblées et du glycérol est ajouté jusqu'à une concentration finale de 20%. Les protéines purifiées sont alors stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation dans les tests.

Les concentrations des protéines sont déterminées spectrophotométriquement à partir des coefficients d'absorption calculés par la méthode de Pace (Pace *et al.* 1995. *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Science* 4, 2411-2423). La pureté des protéines est vérifiée par analyse par électrophorèse SDS-PAGE et par spectrométrie de masse.

B) Test de diagnostic *in vitro*

Il a été utilisé des sérums provenant de patients ayant eu une infection ostéoarticulaire documentée (collection du laboratoire) :

- à *Staphylococcus epidermidis* (au moins trois prélèvements per-opératoires positifs) ;
- à *Staphylococcus aureus* (au moins un prélèvement per-opératoire positif) ;
- à des bactéries autres que des staphylocoques (au moins trois prélèvements per-opératoires positifs).

Les sérums témoins correspondaient à des sérums de donneurs de sang (collection du laboratoire).

Exemple B1 : Protocole du test pour les polypeptides de séquence ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 et 34 (ELISA)

La fixation des anticorps présents dans les sérums a été évaluée par des tests ELISA. Les plaques ELISA sont laissées pendant une nuit à 4°C en présence de 0,5 µg d'antigène purifié (protéine recombinante E4) dans du "tampon salin phosphate" (PBS). Après quatre lavages par du PBS contenant du polyoxyéthylène sorbitan (Tween) à 0,05%, les plaques sont saturées une heure à 37°C par du PBS-Tween contenant 5% de lait demi-écrémé (250 µl par puits). Quatre nouveaux lavages sont réalisés, puis 100 µl de chaque sérum positif, à la dilution adéquate (soit 1/3000^{ème} pour E4) dans du tampon PBS-Tween contenant 5% de lait demi-écrémé, sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite laissée à 25°C pendant 30 minutes. Après quatre nouveaux lavages, des anticorps (secondaires) anti-immunoglobulines G, M, ou A ou simultanément anti-immunoglobulines G et/ou A et/ou M, humaines de chèvre marqués à la phosphatase alcaline (par exemple 170-6462, Biorad) sont ajoutés pendant 30 minutes à 25°C après avoir été dilués selon le protocole du fournisseur dans du tampon PBS-Tween contenant 5% de lait demi écrémé. Quatre nouveaux lavages sont réalisés puis 100 µl de substrat (phosphate de p-nitrophényle), pNPP, par exemple A-3469, Sigma) sont ajoutés. L'absorbance à 405 nm de chacun des puits est mesurée après une incubation de 30 minutes à 37°C.

Résultats et interprétation

Les essais ont été réalisés sur des protéines recombinantes issues de purifications indépendantes.

Des résultats types sont présentés dans le tableau 1 (résultats selon l'invention pour les polypeptides E4, F2 et 2D6-B1 avec des anticorps secondaires reconnaissant les immunoglobulines totales (Ig G, A et M) présentes dans les sérums des patients).

Tableau 1 : Résultats (ELISA) obtenus en utilisant des anti-IgGAM comme anticorps secondaires

	Polypeptide testé		
	E4	F2	2D6B1
Proportion de sérums "positifs" parmi les 15 sérums de malades infectés par <i>S. epidermidis</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	47,0%	50,0%	40,0%
Proportion de sérums "positifs" parmi les 16 sérums de malades infectés par <i>S. aureus</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	26,0%	25,0%	25,0%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 96 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	95,0%	98,0%	96,8%

5

D'après le tableau 1, on constate que les polypeptides de l'invention peuvent être utilisés pour la mise en évidence d'infections à staphylocoques sur prothèses articulaires.

10

Exemple B2 : Résultats obtenus par l'utilisation de la détection d'isotype d'anticorps dans les sérums (ELISA)

L'utilisation de certains polypeptides, par exemple 2D6-B1 (tableau 2), pour la détection d'immunoglobulines d'un isotype particulier est particulièrement pertinente.

15

Tableau 2 : Exemples de résultats (ELISA) en utilisant des anti-IgA comme anticorps secondaires

Polypeptide testé	2D6B1
Proportion de sérums "positifs" parmi les 15 sérums de malades infectés par <i>S. epidermidis</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	47,0%
Proportion de sérums "positifs" parmi les 16 sérums de malades infectés par <i>S. aureus</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	31,0%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 96 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	97,0%

5 Il en découle que les polypeptides peuvent être utilisés pour mettre en évidence la présence de certains isotypes d'anticorps lors d'infections à staphylocoques sur des prothèses articulaires.

10 Exemple B3 : combinaison de polypeptides pour le diagnostic in vitro d'IPA

L'utilisation conjointe de plusieurs antigènes et/ou la détection de plusieurs isotypes d'anticorps permet d'augmenter la sensibilité de la méthode (Tableaux 3 et 4).

15 Le polypeptide 2B6 est très spécifique des infections à *S. epidermidis*. Le polypeptide 2D6-B1, au contraire de 2B6, est peu spécifique d'une espèce et des résultats "positifs" peuvent être observés avec des sérums de patients ayant une IPA à d'autres espèces de Staphylocoque (par exemple *S. lugdunensis*). Ce polypeptide est donc
20 "spécifique" du genre staphylocoques et non d'une espèce particulière. Il est donc possible, par l'utilisation de différents polypeptides (ou par la détection de différents isotypes d'anticorps), de réaliser des distinction d'espèces.

25

Tableau 3 : Résultats (ELISA) obtenus en utilisant des combinaisons de différents polypeptides selon l'invention, pour la détection d'immunoglobulines IgG, A ou M

Polypeptide testé	2B6	2D6B1	2B6 ou 2D6B1
Proportion de sérums "positifs" parmi les 15 sérums de malades infectés par <i>S. epidermidis</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	67,0%	40,0%	87,0%
Proportion de sérums "positifs" parmi les 16 sérums de malades infectés par <i>S. aureus</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	11,0%	25,0%	37,5%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 96 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	99,0%	96,8%	96,0%

Tableau 4 : Résultats (ELISA) obtenus en utilisant 2D6B1 comme polypeptide et en détectant les anticorps grâce à différents anticorps secondaires

5

Anticorps secondaire utilisé	IgA	IgG	IgG ou A
Proportion de sérums "positifs" parmi les 15 sérums de malades infectés par <i>S. epidermidis</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	47,0%	40,0%	67,0%
Proportion de sérums "positifs" parmi les 16 sérums de malades infectés par <i>S. aureus</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	31,0%	25,0%	37,0%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 96 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	97,0%	96,0%	96,0%

Exemple B4 : Identification d'IPA non diagnostiquées par culture de prélèvements per-opératoires

10 Ces essais ont été réalisés en utilisant des sérums provenant de patients opérés pour suspicion d'infection staphylococcique sur prothèse ostéoarticulaire, mais considérés comme bactériologiquement non infectés d'après les résultats de culture des échantillons profonds per-opératoires réalisés au cours de la révision de la prothèse

(seulement 1 ou 2 prélèvements per-opératoires positifs à SCN).

Le tableau 5 présente un exemple de résultats types obtenus par détection des immunoglobulines totales anti-
 5 2D6B1 chez 7 patients ayant eu 1 ou 2 prélèvements per-opératoires positifs à *S. epidermidis* (collection du laboratoire). Les sérums témoins correspondaient à des sérums de donneurs de sang (collection du laboratoire).

10

Tableau 5

	Type de prothèse	Valeur ELISA	
	Patient 1	PTG	2,026
	Patient 2	PTH	0,151
	Patient 3	PTG	0,302
15	Patient 4	PTH	0,970
	Patient 5	PTG	2,237
	Patient 6	PTH	0,369
	Patient 7	PTH	0,465

20

Au cours de la même analyse, 3 des 89 sérums témoins (donneurs de sang) avaient une valeur ELISA $\geq 0,900$ (seuil donnant une spécificité de 96,6%) et aucun n'avait une valeur ELISA $\geq 1,600$ (seuil donnant une spécificité de 100,0%). La réponse observée était donc significative chez
 25 le patient 4 et hautement significative chez les patients 1 et 5.

Il est donc démontré qu'il est possible de détecter une réponse anticorps significative vis-à-vis des polypeptides selon l'invention au cours d'infections
 30 ostéoarticulaires sur prothèses, non diagnostiquées par culture d'échantillons per-opératoires.

Exemple B5 : Protocole du test pour les polypeptides ID SEQ N°12, 14 et 16 (Western Blot)

Pour ces Western Blot, des sérums provenant de
 35 patients ayant eu une infection documentée à *S. aureus* ou *S. epidermidis* (collection du laboratoire) ont été utilisés.

Les sérums témoins correspondaient à des sérums de donneurs de sang (collection du laboratoire) et de patients porteurs d'autres infections (collection du laboratoire). La fixation éventuelle des anticorps présents dans ces sérums a été évaluée par des tests en Western Blot sur des extraits totaux de bactéries produisant les polypeptides ID SEQ N°12, 14 et 16.

La membrane de nitrocellulose sur laquelle les protéines de l'extrait sont transférées est saturée pendant 30 minutes à l'aide d'une solution de "tampon salin phosphate" (PBS) contenant 3% de lait demi écrémé. Après trois lavages par du PBS contenant du polyoxyéthylène sorbitan (Tween) à 0,05%, la membrane est mise en présence du sérum testé à la dilution adéquate (soit 1/300^{ème}) dans du tampon PBS contenant 3% de lait demi-écrémé, pendant 45 minutes. Après trois nouveaux lavages, des anticorps (secondaires) anti-immunoglobulines G, M ou A ou simultanément anti-immunoglobulines G et/ou A et/ou M humaines de chèvre, marqués à la phosphatase alcaline (par exemple 170-6462, Biorad), sont ajoutés, pendant une période de 30 minutes après avoir été dilués, selon le protocole du fournisseur, dans du tampon PBS contenant 3% de lait demi écrémé. Trois nouveaux lavages sont réalisés puis du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate et du nitrobleu tetrazolium sont ajoutés selon les indications du fournisseur jusqu'à l'obtention du résultat. Un résultat "positif" correspond à une précipitation du substrat sur la membrane à la position des polypeptides ID SEQ N°12, 14 ou 16.

Les résultats à ces tests démontrent l'existence d'une réponse anticorps significative au cours des infections ostéoarticulaires sur matériel étranger vis-à-vis des polypeptides ID SEQ N°12, 14 ou 16 et la pertinence de ces polypeptides et de leurs associations/combinaisons pour le diagnostic sérologique de ce type d'infection. De fait, la combinaison des polypeptides ID SEQ N°12, 14 ou 16 est, elle aussi, pertinente.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'ensemble des polypeptides selon l'invention (polypeptides ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 et 34).

Il est donc démontré, d'une part, l'existence d'une réponse anticorps (IgG et/ou IgA) significative au cours des infections ostéoarticulaires sur matériel étranger et, d'autre part, que les polypeptides selon l'invention et leurs associations/combinaisons sont pertinents pour le diagnostic sérologique de ce type d'infection. De fait, la combinaison d'au moins deux des polypeptides ID SEQ N°2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 et 34 est, elle aussi, pertinente. De même, la combinaison des résultats obtenus par la détection des différents isotypes d'anticorps dans les sérums, pour chacun des polypeptides, est elle aussi pertinente.

C) Utilisation des polypeptides selon l'invention pour le suivi thérapeutique (tableau 6)

Chez des patients en convalescence, la constatation de la diminution, au cours du temps, des valeurs ELISA, obtenues en détectant les immunoglobulines (anticorps) présents dans les sérums, par leur fixation aux antigènes 2B6 ou 2D6-B1 selon l'invention, indique leur guérison.

Tableau 6 : Evolution en fonction de l'anticorps secondaire utilisé

Valeur ELISA

Patient 1			Patient 1 +1an		
	2D6B1	2B6		2D6B1	2B6
anti-IgGAM	0,99	2,3 (+)	anti-IgGAM	0,44	0,74
anti-IgG	0,4	0,51 (+)	anti-IgG	0,27	0,24
anti-IgA	0,66	0,34	anti-IgA	0,31	0,31

Patient 2			Patient 2 +3mois		
	2D6B1	2B6		2D6B1	2B6
anti-IgGAM	1,03	1,43 (+)	anti-IgGAM	0,44	0,74
anti-IgG	0,5	0,46 (+)	anti-IgG	0,27	0,24
anti-IgA	1,06 (+)	0,2	anti-IgA	0,31	0,31

Patient 3			Patient 3 +6mois		
	2D6B1	2B6		2D6B1	2B6
anti-IgGAM	2,27 (+)	1,6 (+)	anti-IgGAM	2,41 (+)	0,86
anti-IgG	0,94 (+)	0,5 (+)	anti-IgG	0,87 (+)	0,22
anti-IgA	0,14	0,19	anti-IgA	0,15	0,19

Les valeurs ELISA notées (+) sont considérées positives

Dans le tableau 6, les individus initialement positifs selon l'invention deviennent négatifs.

5 L'utilisation des polypeptides selon l'invention permet donc de réaliser des suivis thérapeutiques, c'est-à-dire (i) d'évaluer l'effet d'un traitement et (ii) de suivre l'évolution post-opératoire (ou post-implantatoire) d'un patient.

10 D) Optimisation des antigènes et des tests de diagnostic *in vitro*

La recherche de fragments afin d'améliorer, d'une part, les performances des antigènes et, d'autre part, la production des polypeptides est particulièrement utile pour
15 leur utilisation industrielle et la pertinence des tests.

Exemple D1 : augmentation de sensibilité et spécificité

Le tableau 7 présente les performances de 2B6, qui est un fragment de E4, par rapport au polypeptide E4.

Tableau 7 : optimisation de la sensibilité et de la spécificité de E4, 2B6 ; résultats ELISA à l'aide d'un anticorps secondaire IgGAM.

10

Polypeptide testé	E4	2B6
Proportion de sérum "positifs" parmi les 15 sérums de malades infectés par <i>S. epidermidis</i> diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	47,0%	67,0%
Proportion de sérums "négatifs" parmi les 96 sérums de donneurs de sang testés comme témoins	95,0%	99,0%

Il existe une différence importante selon les fragments de polypeptides utilisés. Cette différence n'était pas prévisible sur la base des séquences. Ainsi la sensibilité et la spécificité de 2B6 (fragment de E4) sont augmentées par rapport à la protéine entière ou E4 (tableau 7).

L'utilisation de l'antigène 2B6 pour la détection des immunoglobulines A, G et M (totales) permet l'identification de 67 % des IPA à *S. epidermidis* (10 des 15 sérums testés) avec 99 % de spécificité (1 sur 96 sérums de donneurs de sang testés).

Exemple D2 : augmentation de stabilité et du niveau de production

De plus, la protéine 2B6 ne se dégrade pas lors de sa production dans la cellule hôte ou lors de sa purification.

E) Combinaison multiparamétrique et évaluation par syndrome.

L'utilisation conjointe de plusieurs des polypeptides selon l'invention permet en outre :

- 5 (i) d'augmenter la sensibilité de la détection ;
- (ii) d'évaluer la possibilité de la présence de plusieurs germes (par exemple par l'utilisation d'antigène spécifique d'un germe ou d'une famille de germes) ;
- 10 (iii) de préciser le génotype de la souche ;
- (iv) de déterminer l'évolution de la pathologie (par l'utilisation de certains antigènes et d'isotypes d'anticorps) ;
- (v) de réaliser des suivis thérapeutiques à
15 moindre coût ; et
- (vi) de réaliser des diagnostics par syndrome.

En conclusion, la présente invention décrit des polypeptides optimisés quant à leur sensibilité et à leur
20 spécificité, permettant de les utiliser comme sonde (antigène) dans des tests. Elle permet, sans intervention chirurgicale, le diagnostic d'infections staphylococciques, sur matériel étranger, tel que prothèses ostéo-articulaires, notamment d'infections non diagnostiquées par
25 culture de prélèvements per-opératoires profonds.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la
5 présence d'anticorps produits à la suite d'une infection à *Staphylococcus epidermidis*
et/ou *aureus*, d'au moins un polypeptide de séquence d'acides aminés ID SEQ N°
24, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36.

2. Utilisation selon la revendication 1, où ledit au-moins-un polypeptide est un
10 polypeptide de séquence d'acides aminés ID SEQ N° 24.

3. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la
présence d'anticorps produits à la suite d'une infection à *Staphylococcus epidermidis*
et/ou *aureus*, d'au moins un polypeptide comprenant :

15 a) une partie d'une des séquences d'acides aminés telles que définies selon la
revendication 1 ou 2 et ayant la même fonction que ladite séquence, ou

a) une séquence d'acides aminés ayant au moins 60% d'identité avec l'une
des séquences d'acides aminés telles que définies selon la revendication 1 ou 2, ou
avec une partie d'une des séquences telles que définies sous a), et ayant la même
20 fonction que ladite séquence.

4. Utilisation selon quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce
que ledit au-moins-un polypeptide est préparé par culture d'une cellule hôte
comportant un vecteur recombinant ayant, inséré, un polynucléotide codant pour
25 ledit polypeptide et par isolement dudit polypeptide du milieu de culture.

5. Utilisation selon la revendication 4, quand elle dépend de la revendication 1,
caractérisée en ce que le polynucléotide est de séquence ID DEQ N° 23, 1, 3, 5, 7,
9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35.

30

6. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la
présence d'anticorps produits à la suite d'une infection à *Staphylococcus epidermidis*
et/ou *aureus*, d'au moins un polynucléotide de séquence ID DEQ N° 23, 1, 3, 5, 7, 9,
11, 13, 15, 17, 19, 21, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35.

7. Utilisation pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la présence d'anticorps produits à la suite d'une infection à *Staphylococcus epidermidis* et/ou *aureus*, d'au moins un polynucléotide comprenant :

5 a) une partie d'une des séquences telles que définies selon la revendication 6 et ayant la même fonction que ladite séquence, ou

a) une séquence polynucléotidique ayant au moins 60% d'identité avec l'une des séquences polynucléotidique telles que définies selon la revendication 6 ou avec une partie d'une des séquences telles que définies sous a), et ayant la même
10 fonction que ladite séquence, ou

c) une séquence polynucléotidique complémentaire à une des séquences polynucléotidiques telles que définies selon la revendication 6 ou selon la revendication 7a) ou 7 b).

15 8. Utilisation d'anticorps pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques, la présence d'antigènes issus d'une infection à *Staphylococcus epidermidis* et/ou *aureus*, caractérisée en ce que lesdits anticorps sont immunospécifiques pour un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 4.

20 9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, où ladite infection à *Staphylococcus epidermidis* et/ou *aureus* est une infection sur matériel étranger implanté dans le corps.

25 10. Kit pour l'utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou selon la revendication 9, quand elle dépend de l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un desdits polypeptides ou l'un desdits polynucléotides codant pour l'un desdits polypeptides.

30 11. Kit pour l'utilisation selon la revendication 8 ou selon la revendication 9, quand elle dépend de la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un desdits anticorps.