

Centre National de Référence des Staphylocoques Rapport d'activité annuel 2008

Pr François Vandenesch & Pr Jérôme Etienne

Faculté de Médecine Laennec

INSERM U851

Laboratoire de Bactériologie

7 rue Guillaume Paradin

69372 Lyon cedex 08

site internet : <http://dm3.univ-lyon1.fr/>

1- Introduction

1-1- Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en terme de santé publique, son organisation, le cas échéant, la répartition des missions avec son ou ses laboratoires associés et ses principaux partenaires

Le CNR des staphylocoques a pour principales missions de :

- développer et maintenir une collection de souches responsables d'infections nosocomiales et communautaires,
- identifier et typer les souches responsables de formes cliniques inhabituelles, les souches multi-résistantes de diffusion clonale et caractériser les toxines,
- rechercher et caractériser les toxines dans les prélèvements cliniques et alimentaires, dans le cadre de l'investigation de toxi-infections alimentaires ou d'autres cas groupés,
- développer des techniques de typage moléculaire,
- identifier de nouveaux génotypes de résistance aux anti-infectieux et caractériser les mécanismes de résistance en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques,
- évaluer et valider, en lien avec le CNR de la résistance aux antibiotiques, les techniques de détection de résistance aux glycopeptides chez les staphylocoques (méthodes standardisées et accessibles à tous les laboratoires), en assurer la diffusion et développer une procédure de contrôle qualité,
- contribuer à la surveillance épidémiologique des infections et toxémies staphylococciques en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire, en particulier :
 - * en renforçant les collaborations avec les réseaux des laboratoires hospitaliers de microbiologie, notamment pour les souches responsables d'infections nosocomiales,
 - * en développant un partenariat avec des réseaux de laboratoires d'analyses de biologie médicale pour la surveillance de l'émergence de clones responsables d'infections en ville,
 - * en collaborant aux enquêtes épidémiologiques visant à maîtriser les épidémies et cas groupés d'infections staphylococciques,
- collaborer avec les réseaux de surveillance européens et internationaux,
- contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire tout évènement inhabituel : émergence d'un nouveau phénotype de résistance aux antibiotiques, émergence de souches à la virulence particulière, détection de cas groupés.

1-2- Résumé des activités de l'année N : faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte

L'année 2008 a été marquée par :

- une expertise d'un nombre croissant de souches de staphylocoques. Plus de 2000 souches ont été analysées. Elles provenaient de plus de 100 hôpitaux français et de 14 pays étrangers ou territoire d'outre mer,
- une distribution de près de 400 souches en France et à 17 pays étrangers.

Les principales publications 2008 ont porté sur les points suivants :

- la description des grands clones de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) diffusant sur tout le territoire français et associés aux infections invasives. Ainsi, il a été démontré que lors des infections hospitalières, un clone prédominant dénommé le clone « Lyon » était commun à l'ensemble des hôpitaux ; ce clone était retrouvé dans 70% des infections invasives. Ce clone « Lyon » n'était pas décrit dans les pays limitrophes à la France. Quatre clones mineurs ont également été décrits dont le clone communautaire ST80-IV qui a diffusé dans toute l'Europe et représentait dans cette étude 3,6% des infections invasives à SARM. Un autre clone communautaire dénommé le clone « Géraldine » et contenant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique était quant à lui détecté dans 6,5% des infections invasives.
- la dispersion intrafamiliale du clone « Géraldine » a été rapportée au travers d'une observation, soulignant son caractère hautement épidémique,
- le développement de techniques quantifiant l'expression des facteurs de virulence dans les produits pathologiques. Ainsi par une technique Elisa, il est désormais possible de quantifier la production de leucocidine de Pantone Valentine (PVL) dans des pus et les produits du lavage broncho-alvéolaire. Cette technique contribue à démontrer le rôle spécifique de la PVL dans certains syndromes infectieux et peut être utilisée comme technique rétrospective de diagnostic des pneumonies nécrosantes dues à des souches productrices de PVL,
- la démonstration du rôle antigénique de la PVL par la mise en évidence de l'augmentation significative du titre des anticorps anti-PVL uniquement chez les patients ayant une infection due à une souche de *S. aureus* sécrétrice de PVL,

- l'étude du rôle des associations d'antibiotiques pour le traitement des infections graves à *S. aureus* producteur de PVL. Si l'oxacilline seul augmente l'expression de la PVL, les associations avec la clindamycine, le linézolide ou la rifampicine suppriment l'effet délétère de l'oxacilline.

- la confirmation du rôle majeur de la PVL dans un modèle murin de pneumonie nécrosante et d'infection cutanée. L'efficacité d'un vaccin anti-PVL a également été décrite dans ce modèle,

- la démonstration de la signature V β spécifique signant l'expression de toxines superantigéniques a été réalisée dans une série de 14 patients ayant un choc toxique staphylococcique. Ainsi à partir des lymphocytes des patients ayant un tel choc et en utilisant une technique de cytométrie en flux, une expansion V β 2 impliquait la toxine du choc toxique staphylococcique comme associée à la pathogénie de ce choc ; une expansion V β 3-14-17 associait l'entérotoxine B. Finalement, si une multitude de toxines ayant une activité superantigénique a été décrite, si les gènes de ces toxines sont fréquemment détectés chez les souches de *S. aureus* associées au choc, seule la toxine du choc toxique staphylococcique et l'entérotoxine B ont été ainsi indirectement associées aux chocs toxiques. Lors des chocs septiques à *S. aureus*, aucune expansion V β n'a été mise en évidence, mais les patients avaient souvent une lymphopénie ou présentaient un déficit de l'immunité cellulaire,

- la description d'un cas de choc staphylococcique survenu chez un enfant de 12 ans pour lequel une signature V β 2 a pu être rapidement mise en évidence et ainsi poser le diagnostic avant les résultats bactériologiques.

1- 3- Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR

Personnel consacrant une part de leur activité au CNR	
Centre de Biologie Est Faculté de Médecine Laennec Faculté de Médecine Lyon Nord	Fax : 04 72 35 73 35 Fax : 04 78 77 86 58 Fax : 04 78 77 75 50
François Vandenesch – directeur Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Médecine Laennec	Tél : 04 72 35 72 52 ou 04 78 77 86 57 E-mail : denesch@univ-lyon1.fr
Jérôme Etienne – co-directeur Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon Nord	Tél : 04 72 12 96 24 ou 04 78 77 86 57 E-mail : jetienne@univ-lyon1.fr
Gérard Lina (virulence) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Maître de Conférence- Faculté de Médecine Laennec	Tél : 04 72 12 96 67 ou 04 78 77 86 42 E-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr
Yves Gillet (infectiologie pédiatrique) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	Tél : 04 27 85 56 07 E-mail : yves.gillet@chu-lyon.fr
Marie-Elisabeth Reverdy (antibiotique) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 66 E-mail : marie-elisabeth.reverdy@chu-lyon.fr
Michèle Bes (identification) Biologiste contractuel - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 62 E-mail : michele.bes@chu-lyon.fr
Frédéric Laurent Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Nord Maître de Conférence- Faculté de Médecine Grange Blanche	Tél : 04 72 07 18 39 E-mail : frederic.laurent@chu-lyon.fr
Anne Tristan Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Maître de Conférence- Faculté de Médecine Laennec	Tél : 04 72 35 76 39 E-mail : anne.tristan@chu-lyon.fr
Muriel Croze Praticien Attaché – Centre de Biologie Est	Tél. : 04 72 12 96 68 E-mail : muriel.croze@chu-lyon.fr
Anne-Marie Freydière Praticien Attaché – Centre de Biologie Est	Tél. : 04 72 12 96 59 E-mail : anne-marie.freydiere@chu-lyon.fr
Olivier Dauwalder Assistant hospitalo-universitaire – Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 69 E-mail : olivier.dauwalder@chu-lyon.fr
Oana Dumitrescu Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 25 E-mail : oana.dumitrescu@chu-lyon.fr
Hélène Meugnier (lien de clonalité) Ingénieur - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 95 80 E-mail : helene.meugnier@chu-lyon.fr
Sandrine Boisset (webmaster) Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 64 E-mail : sandrine.boisset@univ-lyon1.fr

Techniciens rattachés au Centre de Biologie et Pathologie Est	
Christine Gardon Christine Courtier Martine Rougier Annie Matra Caroline Bouveyron	
Techniciens et Ingénieur crédits InVS	
Florence Couzon (Ingénieur) Cécile Spinelli (Technicienne)	

Le laboratoire hospitalier où se réalisent la plupart des activités du CNR est inscrit dans une démarche qualité avec constitution d'un groupe qualité renforcé à l'occasion du rassemblement sur un même site des laboratoires de Bactériologie de l'hôpital Edouard Herriot, Neuro-Cardiologique et Debrousse. Le nouveau laboratoire qui a ouvert en mars 2007 est situé dans le Centre de Biologie Est. Le laboratoire universitaire (INSERM U851) où se réalise une partie des activités du CNR (en particulier certains aspects plus fondamentaux) et qui héberge une partie de la biothèque, est engagé dans une démarche qualité appuyée par les tutelles (INSERM et Université)

Locaux et équipements :

Le laboratoire hospitalier, localisé au Centre de Biologie et de Pathologie Est (surface d'environ 900 m²) dispose de locaux spécifiques à l'activité CNR et de locaux communs à l'ensemble du plateau de microbiologie (incluant la virologie).

Sur le site de la faculté Laennec, le laboratoire d'une surface de 400 m² ne comporte pas de secteur spécifique pour le CNR, car le laboratoire est entièrement consacré à l'étude de la physiopathologie des infections staphylococciques.

Les principaux équipements dont dispose le CNR qu'ils aient été acquis sur des crédits InVS ou qu'il en dispose du fait de la mutualisation, sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à un cytomètre de flux (utilisé pour étudier la réponse des cellules aux effets des toxines de staphylocoque), deux appareils PCR temps réels (Light Cycler), de nombreux thermocycleurs conventionnels, un extracteur d'ADN, des hottes à flux et PSM, des centrifugeuses de différentes capacités, un système de chromatographie liquide (utilisé pour la purification des toxines de staphylocoque) et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

2- Activités d'expertise

2-1- Capacités techniques du CNR

2-1-1- Liste des techniques de référence : diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

2-1-1-1- Techniques disponibles

Identification des souches

Les souches isolées peuvent être envoyées au CNR pour confirmation ou identification spécialisée.

Au cours de l'année 2008 une technique d'identification moléculaire a été mise au point (cf 2-1-1-2 et 2-1-1-3). Cette technique basée sur l'amplification et le séquençage du gène *tuf* permet d'identifier plus de 30 espèces décrites. L'identification de certaines sous espèces pouvant être, si nécessaire, déterminée en complétant l'analyse par des tests phénotypiques simples (pigmentation, coagulase, résistance à certaines substances inhibitrices, etc.).

Cette technique est maintenant utilisée au CNR pour toutes les identifications de souches.

Détection des gènes de toxines : la détermination des profils toxiques se fait par PCR multiplex.

Sont recherchés les gènes codant :

- les entérotoxines (SE*, SEI*) : SEA, SEB, SEC, SED, SEH, SEIK, SEIL, SEIM, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR,
- la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1),
- les exfoliatines A (ETA), B (ETB), D,
- les toxines synergohyménotropes : lukM, et la leucocidine de Panton Valentine (PVL),
- le facteur EDIN (Epidermal Cell Differentiation Inhibitor) (A-C),
- l'hémolysine bêta.

Il existe deux niveaux d'expertise :

- le niveau 1 qui permet de mettre en évidence les principaux facteurs de virulence (SEA, SEB, SEC, TSST1, ETA, ETB, PVL) pouvant être impliqués dans les principaux syndromes staphylococciques,
- le niveau 2 qui permet de compléter le profil toxique par la recherche de l'ensemble des gènes cités ci-dessus (demande spécifique).

De plus, pour toutes les souches de *S. aureus* expertisées, nous identifions l'allèle du gène régulateur *agr* « *accessory gene regulator* » et détectons systématiquement le gène de résistance à la méticilline (*mecA*).

NB : signification des abréviations.

*SE : "Staphylococcal enterotoxin"

*SEI : "Staphylococcal enterotoxin-like", toxine pour laquelle le pouvoir émétisant n'est pas démontré.

La détection des gènes codant SEIM et SEIO signale aussi habituellement la présence des gènes codant SEG, SEI et SEIN car ces gènes sont sur un même élément génétique (locus *egc*). De même, la détection du gène codant SED signale habituellement la présence du gène codant SEJ (même plasmide).

Test du CD69

La recherche d'activation lymphocytaire T, caractéristique des superantigènes bactériens, est réalisée notamment lorsqu'une souche de patient isolée dans le cadre de manifestations toxiques ne possède aucun des gènes connus d'entérotoxine. Le test du CD69 permet de détecter la présence de superantigènes dans le surnageant de culture de la souche étudiée et donc de suspecter que la souche produit une nouvelle entérotoxine.

Recherche de lien de clonalité

Le lien de clonalité est recherché par détermination du profil de restriction de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé. En cas de besoin, peuvent être réalisés en plus la détermination du « Sequence type » par multilocus sequence typing (MLST), et la recherche du type de répétition du gène codant la protéine A (*spa* typing).

L'ensemble des résultats analysés à l'aide d'outils informatiques permet de grouper les populations bactériennes selon leurs caractéristiques et de les rattacher aux grands groupes évolutifs notamment pour les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline.

Recherche des entérotoxines A-E

En cas d'intoxication alimentaire, les entérotoxines A-E sont recherchées dans les vomissements des patients par une méthode immuno-enzymatique ELISA, RIDASCREEN®.

Recherche de résistance aux antibiotiques

- Détection du gène *mecA*. Le gène de résistance à la méticilline (*mecA*) est recherché par PCR pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative.

- Détection de la résistance aux glycopeptides. Elle est effectuée seulement pour *S. aureus*.

Sont réalisées :

* une CMI vancomycine et teicoplanine par E-test,

* un criblage par E-test avec un inoculum lourd (2 McFarland) sur gélose cœur-cervelle.

En cas de criblage positif, une analyse de population est réalisée avec et sans induction sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.

La détection du gène *vanA* par PCR n'est effectuée qu'après avis des responsables du CNR.

Caractérisation de la cassette *SCCmec*

Le gène de résistance à la méticilline *mecA* est présent sur une cassette dénommée *SCCmec* pour "staphylococcal chromosomal cassette" dont la taille est variable. Il existe 7 grands types de cassette, *SCCmec* I-VII. Le type de cassette d'une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline peut être recherché par PCR en utilisant un jeu d'amorces.

Détermination du répertoire $V\beta$ du TCR des lymphocytes T

Ce test a pour objectif de mettre en évidence *in vivo* la cicatrice immunologique d'un contact entre des toxines superantigéniques de *S. aureus* et les lymphocytes T du patient. Les toxines superantigéniques que sont la TSST-1 et les entérotoxines, sont capables d'induire une activation polyclonale de lymphocytes T spécifique en fonction de leur type $V\beta$. Comme ces toxines s'attachent de façon spécifique à certaines régions $V\beta$ des récepteurs des lymphocytes T, il existe une spécificité entre le type de toxine superantigénique et le type $V\beta$ des récepteurs des lymphocytes qui sont activés et qui prolifèrent. Il est ainsi possible d'identifier indirectement la toxine responsable du choc toxique par déduction à partir du profil d'amplification des récepteurs $V\beta$ d'un patient. Par exemple, une expansion des lymphocytes T $V\beta$ 2 évoque une intoxication par la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1).

2-1-1-2- Techniques développées durant l'année 2008 : brève description (principes, validation) : cf. chapitre 2-1-1-3 ci-dessous

2-1-1-3- Techniques en développement : principes et état d'avancement

Développement d'une technique d'identification des Staphylocoques par PCR-séquençage du gène *tuf*.

Les souches isolées peuvent être envoyées au CNR pour identification spécialisée. Elles étaient jusqu'à présent identifiées sur des caractères morphologiques, biochimiques voire sur des caractères génotypiques par PCR de la région intergénique ribosomale 16S – 23S (ITS PCR).

L'objectif du CNR était de développer un outil moléculaire permettant l'identification rapide et si possible exhaustive de toutes les espèces de staphylocoques. En effet, l'identification de toutes les espèces est une donnée pré-requise pour lutter contre ces pathogènes opportunistes, pour adapter la prise en charge thérapeutique, obtenir des données épidémiologiques telles que la prévalence et la fréquence d'isolement.

Le faible pouvoir discriminant des méthodes d'identification biochimique a conduit à développer de nouvelles approches moléculaires comme l'amplification et le séquençage de gènes tels que l'ADNr16S, *hsp60*, *sodA*, *rpoB*, *tuf* ou *gap*. Tous ces gènes n'ayant pas un pouvoir discriminant totalement satisfaisant, nous avons comparé et évalué la capacité d'identification par séquençage des gènes *tuf* (facteur d'élongation) et *gap* (glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase) présentant le polymorphisme de séquence le plus important chez 47 souches type. Le séquençage du gène *tuf* a été retenu comme méthode d'identification pour son bon pouvoir discriminant et pour des raisons techniques (échecs d'amplification et longueur de séquence du gène *gap*). Son utilisation a été validée à partir d'une collection de 186 souches de staphylocoques du CNR.

Le séquençage du gène *tuf* de 47 souches type a permis de constituer une base de données de séquences pour l'identification des staphylocoques. Cette base actuellement utilisée « en interne » dans notre laboratoire sera prochainement disponible dans Genbank.

L'amplification-séquençage du gène *tuf* se substitue aux multiples techniques conventionnelles (tests biochimiques) et moléculaires longues, fastidieuses, et d'interprétation délicate (comparaison de profils pour l'ITS-PCR) pour l'identification des staphylocoques.

Sérologie PVL

La détection d'anticorps anti-LukS-PV est réalisée par immunodosage spécifique ELISA. L'antigène de capture est la protéine recombinante purifiée LukS-PV utilisée à une concentration de 5 µg/ml. Les échantillons de sérum sont déposés à plusieurs dilutions décimales de 1 : 1000 à 1 : 100 000) ; la gamme est constituée de dilutions sériées de la préparation d'Ig polyclonales commercialisée (Tégéline®). La révélation est réalisée avec un anticorps anti Ig humaine couplé à la peroxydase (Sigma®).

Les résultats s'expriment en UA/L, 1000 UA/L correspondent au taux d'anticorps antiPVL contenu en 12,5 g/L de Tégéline® ce qui représente le taux physiologique d'anticorps antiPVL plasmatique. Cette technique a été validée lors d'une étude prospective menée au Centre National de Référence (Croze et al, CMI 2008).

Développement d'une technique de dosage immunologique de la leucocidine de Panton Valentine (PVL). Ce test a pour objectif de déterminer de façon quantitative la production de PVL dans un échantillon biologique ou dans le surnageant d'une culture bactérienne. L'objectif médical est de déterminer si certaines souches de *S. aureus* contenant les gènes de la PVL, et notamment les souches à potentiel épidémique comme les SARM-C (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et d'origine communautaire), sont productrices ou non de quantités élevées de PVL. L'hypothèse est l'existence d'un lien entre virulence et quantité de PVL exprimée. Cette donnée sera particulièrement utile pour les décideurs à qui l'on demande aujourd'hui de se prononcer sur les mesures préventives à adopter devant la diffusion de certains clones de SARM-C associée dans certains cas à des cas groupés de décès. Nous émettons l'hypothèse que certaines souches sont potentiellement plus virulentes que d'autres et la mise au point de ce dosage devrait nous permettre de le confirmer. Le test est développé sur un principe ELISA en utilisant un anticorps polyclonal de lapin et un anticorps monoclonal produit en collaboration avec bioMérieux. Ce test a fait l'objet d'un dépôt de brevet conjoint avec bioMérieux. Le test a été en phase de validation durant l'année 2006 et d'ores et déjà nous confirmons la présence de la PVL dans les échantillons biologiques de patients atteints d'infections par des souches contenant les gènes de la PVL. Le test est utilisé actuellement à visée recherche en attendant l'utilisation systématique sur des séries de prélèvements de patients.

Développement d'une technique de détection de l'expression de la leucocidine de Panton Valentine (PVL) par qRT-PCR en temps réel

Ce test représente un complément du test précédent, ayant pour objectif de déterminer de façon quantitative la transcription des gènes de la PVL d'une culture bactérienne, l'utilisation dans les échantillons biologiques étant en cours d'étude. L'objectif médical est de déterminer si certaines souches de *S. aureus* contenant les gènes de la PVL, et notamment les souches à potentiel épidémique comme les SARM-C (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et d'origine communautaire), transcrivent ou non abondamment la PVL. L'hypothèse est l'existence d'un lien entre virulence et quantité de PVL transcrite et exprimée. Comme précédemment nous émettons l'hypothèse que certaines souches sont potentiellement plus virulentes que d'autres et la mesure du taux de transcription de la PVL devrait nous permettre de le confirmer. Ce test est actuellement en développement sur des cultures bactériennes, son utilisation directement sur les prélèvements biologiques est à l'étude.

Implantations de la technologie des puces à ADN ou microarray pour la caractérisation moléculaire des clones de *S. aureus*, des facteurs de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques.

Les puces à ADN sont des multicateurs permettant de caractériser un acide nucléique dans un échantillon. Longtemps réservée aux domaines de recherches, cette technique a connu un essor important et la société Clondiag propose depuis peu de temps une version simplifiée adaptée à l'étude des souches de *S. aureus*. Le principe de la technologie repose sur l'amplification de 185 gènes grâce à une réaction d'amplification linéaire multiplex dans un unique tube de plus de 180 gènes de *S. aureus*. Ces derniers codent des facteurs de virulence, des déterminants des mécanismes de résistance aux antibiotiques ainsi que des marqueurs épidémiologiques permettant de rattacher les souches testées aux clones épidémiques et endémiques de MSSA et MRSA. Après amplification/marquage, les fragments amplifiés sont hybridés sur une puce à ADN de quelques mm² placées à la base d'un tube conique de type Eppendorf ou au fond des cupules au format d'une barrette de type ELISA. Après lavage, l'hybridation spécifique entre les sondes immobilisées de la puce et les fragments amplifiés marqués est détectée par un automate. L'ensemble du protocole permet de disposer en moins de 3 heures d'une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée.

L'implantation de cette technologie devrait permettre de remplacer l'ensemble des techniques de PCR simplex, duplex ou triplex jusque là utilisées par le CNR, d'élargir le panel d'informations recueillies et de faciliter l'analyse des données. Elle devrait permettre de mieux caractériser les facteurs de virulence des différents clones isolés et des différentes formes cliniques d'infections staphylococciques observées. Elle apporte une solution innovante et peu coûteuse au problème ancien de la détection, de l'identification et du typage de souches de *Staphylococcus aureus*.

2-1-2- Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

L'antibiotype, la toxinotypie, le typage *agr*, la caractérisation du type de cassette *SSCmec*, le *spa* typing, le MLST et l'analyse des profils de restriction en champ pulsé sont les principaux marqueurs épidémiologiques disponibles (cf. chapitre 2-1-1-1-Techniques disponibles).

2-1-3- Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Le CNR conserve la totalité des souches (congélation à -20 °C) qui lui sont adressées. Il est à même de fournir des souches représentatives des différents clones de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline SARM diffusant actuellement en milieu hospitalier (SARM-H) et dans la communauté (SARM-C) (France et Pays étrangers), ainsi que des souches représentatives des différentes pathologies (SARM ou SASM) : pneumonies nécrosantes, choc toxique staphylococcique, impétigo bulleux, scarlatine staphylococcique, etc. (cf. tableau 1 et paragraphe 3.1).

Le CNR conserve également des souches de référence représentant les différents clones et les souches types représentant les différentes espèces de staphylocoques.

2-2- Activités d'expertise de l'année 2008

Au cours de l'année 2008, le CNR a reçu 2 050 souches de staphylocoques pour expertise. Mille sept cents souches provenaient d'une centaine de villes françaises (environ 120 hôpitaux, 17 LAM) et 350 souches provenaient de 14 pays étrangers ou territoires d'outre-mer (Guyane, Nouvelle Calédonie, Tahiti, Mayotte, Danemark, Suède, Tchéquie, Irlande, Suisse, Grèce, Algérie, Sénégal, Indonésie, Australie).

Le CNR a distribué 390 souches de ses collections, 40 en France et 350 à l'étranger (Allemagne, Belgique, Hollande, Danemark, Suède, Italie, Espagne, Inde, Serbie, Slovénie, Suisse, Malaisie, Colombie, Liban, Maroc, Jordanie, USA).

3- Activités de surveillance

3-1- Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Le nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines rapportées en France est en diminution avec 66 cas en 2008 pour 80 cas en 2007 (Tableau 1).

Tableau 1. Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines recensées par le CNR des Staphylocoques de Lyon entre 1994 et 2008 en France.

Année	Syndrome d'exfoliation généralisée	Impétigo bulleux	Choc staphylococcique	toxique Scarlatine staphylococcique	Total Syndromes/an
1994	6	5	7	7	25
1995	4	8	14	10	36
1996	6	7	7	12	32
1997	6	7	11	11	35
1998	19	10	20	17	66
1999	20	14	29	15	78
2000	12	23	43	19	97
2001	12	16	25	16	69
2002	25	19	35	29	108
2003	27	18	48	21	114
2004	22	8	32	13	75
2005	21	28	32	11	92
2006	32	20	32	11	95
2007	18	16	27	19	80
2008	11	18	26	11	66
Total	188	169	324	200	1068

L'étude des corrélations clinico-biologiques entre le profil toxinique et la présentation clinique a permis de dégager des informations importantes pour les différents syndromes toxiques :

Chocs toxiques staphylococciques (TSS) et formes incomplètes

- 26 cas de TSS ont été rapportés, dont 8 cas de TSS menstruels ; ces chiffres sont similaires à ceux de 2007 (11 cas de TSS menstruels) signant ainsi une stabilisation après l'augmentation observée en 2006 où 12 cas avaient été recensés par rapport aux 11 cas recensés entre 2002 et 2004. L'âge des patientes s'étend de 15 à 22 ans avec une médiane de 19 ans. Les cas ne semblent pas reliés à l'utilisation d'une marque particulière de protection périodique. Sept souches possédaient le gène codant la TSST-1, le gène codant SEA et un allèle de type *agr3* appartenant au clone majoritaire associé au TTS menstruel diffusant actuellement dans la communauté. Une souche possédait le gène codant la TSST-1 mais un allèle de type *agr1*. Aucune des souches responsables des cas menstruels n'était résistante à la méticilline. Dans les 18 cas non menstruels, les chocs sont survenus dans les suites de suppurations diverses à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit d'infections communautaires.

L'âge des patients s'étend de 3 à 86 ans avec une médiane d'âge de 49 ans tandis que le *sex ratio* de ces patients est 9/18. Huit souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 10 autres souches possédaient au moins un gène codant une entérotoxine. Ces souches étaient le plus souvent sensibles à la méticilline avec uniquement 5 souches résistantes aux pénicillines M.

- 11 cas de scarlatine staphylococcique (SS) ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 1 à 46 ans avec une médiane d'âge de 10 ans tandis que le *sex ratio* est de 6/11. Ces manifestations sont survenues au décours d'infections diverses (infections cutanées, pneumonie, ostéite, arthrite), communautaires ou nosocomiales. Neuf souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 2 autres possédaient au moins un gène codant une entérotoxine. Toutes les souches étaient sensibles à la méticilline.

Intoxications alimentaires individuelles et collectives

Le CNR a été contacté pour deux cas de possible intoxication alimentaire collective en 2008. La recherche des entérotoxines dans les prélèvements (liquide gastrique) étant négative, nous n'avons pas pu impliquer un staphylocoque doré dans ces intoxications alimentaires.

Entérocolites à *S. aureus*

Un seul cas d'entérocolite aiguë a été signalé au CNR en 2008. La souche de *S. aureus* était isolée chez une patiente de 56 ans avec des antécédents d'hospitalisation. La souche était résistante à la méticilline et possédait toutes les caractéristiques du clone « Lyon » hospitalier diffusant de façon dominante dans les hôpitaux en France (souche de SARM résistante à la lévofloxacine et à la lincomycine, ayant un allèle *agr* de type 1 et contenant le gène de l'entérotoxine A). Toutefois son rôle dans la genèse de l'entérocolite aiguë reste discutable.

Syndromes d'exfoliation staphylococcique

Le CNR a analysé les souches provenant de 29 cas de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en 11 cas d'exfoliation généralisée (ce chiffre est en diminution par rapport à ceux des années précédentes – Tableau 1) et 18 cas d'impétigo bulleux (ce chiffre est stable par rapport à ceux des années précédentes – Tableau 1). Aucune épidémie survenant dans une maternité n'a été déclarée cette année.

L'âge des patients ayant présenté une exfoliation généralisée staphylococcique s'étend de quelques jours à 5 ans avec une médiane de 2 ans tandis que le *sex ratio* de ces patients est 7/11. Huit souches possédaient les gènes codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB), une souche l'ETA seule et 2 souches l'ETB seule. Aucune des ces souches n'était résistante à la méticilline. L'âge des patients ayant présenté un impétigo bulleux s'étend de quelques jours à 16 ans avec une médiane de 2 ans et demi tandis que le *sex ratio* de ces patients est 8/18.

Neuf souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 7 souches l'ETA seule, une souche l'ETB seule et une souche ETD seule. Aucune des ces souches n'était résistante à la méticilline.

Pneumonies staphylococciques nécrosantes

Quatorze nouveaux cas de pneumonie nécrosante PVL+ ont été diagnostiqués en 2008 (19 en 2007). Cette diminution du nombre de cas rapportés au CNR est vraisemblablement plus liée à une sous-déclaration (la déclaration n'étant pas obligatoire), qu'à une diminution de l'incidence des cas. Dans la série de 2008, les patients étaient âgés de 1 à 65 ans avec une médiane d'âge de 29 ans, la mortalité étant de 57%. Quatre cas étaient dus à des souches résistantes à la méticilline, les 4 souches appartenaient au groupe *agr3* avec un profil toxique et de résistance aux antibiotiques évocateur du clone SARM d'origine communautaire diffusant en Europe et Afrique du Nord (clone ST80). L'effectif trop faible de cas déclarés ne permet aucune conclusion fiable sur l'évolution de l'épidémiologie, mais il convient de remarquer la proportion non négligeable de cas dus aux SARM communautaires (4/14) comme cela avait déjà été observé en 2007 (9/19). Enfin, tous les patients décédés ont présenté les facteurs de risque associés au mauvais pronostic : des hémoptysies et une leucopénie précoce (taux de GB < 3 G/L).

Ostéites et infections ostéo-articulaires

Nous avons reçu pour expertise 13 souches de *S.aureus* isolées chez 11 patients dans un contexte d'infection ostéoarticulaire, les patients étant âgés de 3 à 85 ans (médiane d'âge 14 ans) avec un *sex ratio* de 7/11. Trois infections étaient dues à des souches portant le gène codant la leucocidine de Panton Valentine. Deux souches étaient sensibles à la méticilline tandis qu'une appartenait au clone majoritaire de SARM d'origine communautaire diffusant actuellement en Europe. Ces souches étaient isolées dans un contexte d'infection ostéoarticulaire en rapport avec des phénomènes suppuratifs (furoncles, panaris, empyème) ou d'évolution rapidement extensive et défavorable. Dans 2 autres cas, il s'agissait de souches produisant la TSST1, résistantes à la méticilline et possédant les gènes codant les entérotoxines C, D, L, R, M et O (ces deux dernières témoignant la présence du locus *egc*). Toutes ces caractéristiques sont celles du clone « Géraldine » émergeant en France, résistant à la méticilline, producteur de TSST-1 et responsable à la fois d'infections communautaires et hospitalières survenant en général chez les sujets jeunes. Dans 3 autres cas, il s'agissait de souches produisant des entérotoxines probablement responsables d'un syndrome clinique de scarlatine staphylococcique et d'un tableau d'éruption généralisée suivie de desquamation.

Furonculoses et relation avec la diffusion de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline

Trente-quatre cas de furonculose chronique ou de cellulites extensives (66 en 2002, 55 en 2003, 48 en 2004, 45 en 2006, 36 en 2007) ont été rapportés au CNR.

Tous les cas étaient communautaires et se répartissent en 3 épidémies intra-familiales et des cas sporadiques. L'âge des patients s'étale de 1 an à 82 ans avec une médiane d'âge de 39 ans tandis que le *sex ratio* de ces patients est 20/34.

Sur les 34 souches, 32 étaient productrices de leucocidine de Pantone Valentine, dont 11 étaient résistantes à la méticilline. Parmi ces 11 souches, 5 correspondent au clone SARM d'origine communautaire diffusant actuellement en Europe (*agr3*, PVL+, *mecA*+) et 3 au clone de SARM d'origine communautaire (USA300) décrit aux Etats-Unis (*agr1*, PVL+, *mecA*).

3-2- Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Soixante treize souches ont été envoyées de laboratoires extérieurs pour expertise (Tableau 2). Il s'agit de 56 souches de *S. aureus* et de 17 souches de staphylocoques coagulase négative (SCN).

Tableau 2. Origine géographique et nombre de souches de staphylocoques adressés à Lyon en 2008 pour expertises concernant la résistance aux antibiotiques.

Provenance	Nb de Souches	<i>S. aureus</i>	SCN
Annecy	1	1	
Annonay	1	1	
Antibes	2	2	
Arpajon	9	9	
Belley	1	1	
Bourg le Péage	1		1
Briançon	4	4	
Cahors	4		4
Chartres	2	1	1
Colmar	3	3	
Creil	1	1	
Dôle	2		2
Foix	1	1	
Giens	4	4	
Grenoble	1	1	
Lyon Autres Hôpitaux	17	9	8
Martigues	1	1	
Meaux	1	1	
Metz	1	1	
Montceau les mines	1		1
Montpellier	7	7	
Niort	1	1	
Nouvelle Calédonie	1	1	
Paris	1	1	
Saverne	2	2	
Strasbourg	1	1	
Thonon	2	2	
TOTAL	73	56	17

Le gène de résistance à la méticilline a été recherché par PCR pour 48 de ces souches : 35 *S. aureus* et 13 staphylocoques coagulase négative.

Un résultat a été rendu positif dans 16 cas (dont 5 staphylocoques coagulase négative). Il s'agissait de souches exprimant de façon très hétérogène la résistance à l'oxacilline ou présentant un phénotype de résistance associé incomplet.

Un résultat négatif a été rendu dans 32 cas (dont 8 staphylocoques coagulase négative). Il s'agissait de souches sensibles à tous les antibiotiques mais pour lesquelles la demande de vérification était faite conformément aux recommandations du CA-SFM, car le diamètre de la cefoxitine était compris entre 25 et 27 mm, de souches multirésistantes aux antibiotiques, de souches résistantes isolément aux aminosides, fluoroquinolones ou macrolides. Ces profils de résistance inhabituels faisaient demander une confirmation de l'absence de gène de résistance à la méticilline.

Pour les hôpitaux de Lyon (HCL) associés au CNR, 88 demandes de recherche du gène *mecA* de résistance à la méticilline ont été faites pour des phénotypes associés inhabituels, 24 se sont avérées positives et 64 négatives.

Détection de souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides

L'étude a été demandée pour 19 souches de laboratoires extérieurs, qui avaient un criblage positif, et pour 12 souches isolées dans les hôpitaux de Lyon associés au CNR.

Pour chaque souche ont été réalisés :

- un criblage avec des bandelettes E-Test (vancomycine et teicoplanine) et un inoculum lourd,
- une analyse de population sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine,
- une analyse de population sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine, après induction par 2 mg/L de vancomycine,
- une analyse de population en cascade sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.

Pour les laboratoires extérieurs, 10 souches ont été confirmées de sensibilité diminuée aux glycopeptides, il s'agissait principalement de souches hétérogènes, inductibles en présence de glycopeptides (souches hGISA), 9 souches étaient sensibles aux glycopeptides.

Pour les hôpitaux de Lyon associés au CNR, 7 souches se sont révélées de sensibilité diminuée.

Mucoviscidose

Depuis 2007, le CNR effectue l'analyse des phénotypes de résistance sur les souches de *S. aureus* de mucoviscidose. En 2007, 262 souches ont été analysées (171 *S. aureus* sensibles à la méticilline - SASM et 91 *S. aureus* résistants à la méticilline - SARM) montrant une grande hétérogénéité de ces souches. La détection de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides a été effectuée sur 37 souches de SARM résistants à la gentamicine et à la rifampicine, 6 présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides (4 patients).

En 2008, 386 souches ont été analysées (242 SASM et 144 SARM) montrant une grande hétérogénéité de ces souches. La détection de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (phénotype hGISA) a été effectuée sur les SARM : 110 souches ont été étudiées, 23 souches se sont révélées de sensibilité diminuée correspondant à 8 patients, dont aucun n'avait reçu des glycopeptides dans les mois précédents. Les carbapénèmes, antibiotiques à visée anti-*Pseudomonas*, utilisés chez les patients mucoviscidosiques pourraient avoir joué le rôle d'agent sélecteur comme cela est rapporté au Japon¹. Nous explorons actuellement cette hypothèse en comparant les consommations de carbapénèmes chez les porteurs de *S. aureus* de phénotype hGISA avec celles des patients ayant des souches de type non hGISA.

Protocoles

A la demande des Laboratoires Janssen Cilag, le CNR a participé à une étude de mesure de l'activité *in vitro* du Doripénème et du Ceftobiprole sur 88 souches de cocci Gram positif, par dilution en milieu liquide.

3-3- Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Au cours de l'année 2008, le CNR a investigué 17 cas groupés d'infection ou épidémies. L'analyse des profils de restriction de l'ADN des souches après électrophorèse en champ pulsé (permettant de définir des pulsotypes) associés ou non au toxinotype, au type d'allèle *agr* et à l'antibiogramme a permis d'évaluer le lien de clonalité des souches isolées. Deux pulsotypes différant par plus de trois bandes sont considérés comme correspondant à des souches non reliées épidémiologiquement (et ceci dans un contexte d'épidémiologie locale au niveau d'un hôpital). Les cas ont été analysés dans les contextes suivants :

- **Bordeaux** : 3 souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez 3 patients sur un intervalle d'un an à partir d'hémocultures dans un contexte d'endocardites post-chirurgicales. Les 3 pulsotypes étaient identiques et confirmaient l'appartenance de ces souches de SARM *agr* 1 au clone hospitalier diffusant actuellement en France.
- **Briançon** : 4 souches de *Staphylococcus aureus* isolées le même mois de divers prélèvements chez 4 patients. Trois souches étaient identiques. La quatrième présentait des différences mineures. Ces 4 souches résistantes à la méticilline et de type *agr* 1 appartenaient probablement au clone hospitalier majoritaire diffusant actuellement en France (clone « Lyon »).

¹ Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H, Hiramatsu K. Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 2003 Aug;49(3):807-21.

- **Dijon** : 11 souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans un Service de Réanimation Pédiatrique. Dix souches sur 11 appartenaient au clone hospitalier diffusant actuellement en France.
- **Elbeuf** : 5 souches de *Staphylococcus aureus* isolées en janvier et février de prélèvement de nez et de selles chez 5 patients âgés de 46 à 82 ans (2 décédés). Les pulsotypes des 4 souches isolées en février étaient identiques. Le pulsotype de la souche isolée en janvier (patient cas index possible décédé) était différent (4 bandes).
- **Grenoble** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez un patient atteint de mucoviscidose. L'habillage toxinique de ces deux souches ne différaient que par un caractère (gène codant l'hémolysine β) et les pulsotypes ne montraient qu'une différence d'une bande correspondant probablement à l'insertion d'un phage ce qui négative la détection du gène codant l'hémolysine β par PCR. Ces résultats étaient en faveur d'un fort lien de clonalité entre les 2 souches.
- **Grenoble/Lyon** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de cicatrice de fémur et de liquide articulaire du genou à 11 mois d'intervalle chez un patient âgé de 40 ans. Les pulsotypes étaient différents (5 bandes)
- **Le Chesnay** : 3 souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans le cadre d'un accident transfusionnel (hémoculture du patient transfusé, poche de produit sanguin, portage nasal du donneur). Les pulsotypes de la souche isolée des hémocultures du patient transfusé et celle isolée de la poche du produit sanguin étaient identiques ; le pulsotype de la souche isolée de l'écouvillonnage nasal du donneur présentait une seule bande de différence avec les deux premières. Les souches isolées de l'hémoculture et de la poche possédaient les gènes codant les entérotoxines A, M et O, le gène codant la TSST-1 et un allèle *agr* de type 3. La souche de nez du donneur ne possédait pas le gène codant l'entérotoxine A et possédait au contraire le gène codant l'hémolysine bêta. Ces deux différences (entérotoxine A et hémolysine bêta) peuvent s'expliquer par la plasticité génétique de *Staphylococcus aureus* : l'entérotoxine A est codée par un phage et le gène de l'hémolysine bêta constitue le site d'insertion de différents phages. Ces résultats mettaient en évidence un lien phylogénétique étroit entre la souche d'écouvillonnage nasal du donneur et les deux autres souches.

- **Orléans :**
 - 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de prélèvement cutané chez 2 bébés. Les profils toxiniques des 2 souches étaient proches (*sem, seo, tst, +/-h1b*) et les pulsotypes ne présentaient qu'une bande de différence pouvant correspondre à une insertion de phage dans le gène de l'hémolysine bêta. Ces résultats étaient en faveur d'un fort lien de clonalité entre les souches.
 - 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'une part d'hémoculture et abcès en 2006 et d'autre part d'hémoculture et fausse membrane en 2007 chez un patient de 72 ans. Deux pulsotypes différents étaient observés. Le premier correspondait aux souches de 2006 présentant un allèle *agr* de type 3, le second aux souches de 2007 de type *agr* 1. Les deux épisodes infectieux étaient donc dissociés.
- **Paris :**
 - 2 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées de ponction de hanche à 8 mois d'intervalle chez une patiente âgée de 85 ans. Les pulsotypes étaient identiques.
 - 2 souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'hémoculture et de biopsie disco-vertébrale chez un patient âgé de 76 ans. Les pulsotypes étaient identiques.
 - 3 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de vagin, liquide articulaire et de portage nasal chez une patiente âgée de 69 ans. Les 3 souches présentaient le même pulsotype.
- **Pau :** 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de prélèvements cutanés chez 2 nourrissons âgés de 1 mois et demi. Les profils toxiniques et les pulsotypes étaient différents.
- **Riom :** 3 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de prélèvement vaginal, d'hémoculture et d'urines chez une patiente âgée de 51 ans. Les 3 souches étaient différentes.
- **Roanne :** 2 souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'hémoculture et de plaie de pied pour 2 patients âgés de 62 et 68 ans. Les pulsotypes étaient identiques.
- **Strasbourg :** 5 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées de manière rapprochée dans une pouponnière à partir de frottis d'oreille, d'ombilic et de liquide gastrique chez 5 enfants. Les 5 pulsotypes étaient différents.
- **Toulouse :** 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de pus de cotyle à 9 mois d'intervalle chez un patient âgé de 67 ans. Les pulsotypes étaient différents (8 bandes de différence)

3-4- Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Lister les réseaux auxquels le CNR et ses laboratoires associés participent et leur contribution (expertise, envoi de données, de souches...)

3-5- Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Etude "Profil toxinique des souches responsables de surinfections staphylococciques au cours de la varicelle"

Type de collaboration : CNR – Hôpitaux français du réseau CNR

Les souches de *S. aureus* (n=58) isolées au cours de surinfections de varicelle et adressées au CNR entre 2000 et 2008 ont été étudiées. Le groupe *agr* ainsi que la présence du gène *mecA* et des gènes de toxine suivants : *sea-d*, *seh*, *sek*, *sel-o*, *tst*, *eta*, *etb*, *lukS* et *lukF-PV*, *lukM*, *hly*, ont été déterminés. Pour un certain nombre de souches, ces éléments ont été complétés par l'étude du *spa*-type et du profil MLST. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la symptomatologie clinique observée est bien corrélée à l'habillage toxinique avec : i) des manifestations toxiques de type fièvre scarlatiniforme et choc toxique en cas de souches présentant le gène *tst* codant la toxine TSST-1 ; ii) l'impétigo bulleux et la maladie exfoliante généralisée (SSSS pour *staphylococcal scalded skin syndrome*) en cas de souches portant les exfoliatines *eta* et *etb* ; iii) des formes abcédées en cas de souches portant les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine. Quand ces 3 toxines majeures étaient absentes, la symptomatologie était polymorphe. Le gène *tst* était le plus fréquemment rencontré (28%, n=16) avec des manifestations cliniques associées qui étaient non seulement de type toxinique mais aussi de type infections de la peau et des tissus mous (dermohypodermite). Un tiers des souches de l'étude (n=19) possédait le gène *mecA* dont 12 appartenaient à un clone émergent appelé clone Géraldine (*agr2*, ST5, *mecA+*).

Compte tenu de la prévalence (parmi les souches de staphylocoques responsables de surinfection au cours des épisodes de varicelle) des souches portant des gènes codant des toxines majeures, l'ajout de clindamycine au traitement habituel des complications de varicelle (béta-lactamines), tant pour ses propriétés anti-toxiques que pour son activité anti-staphylococcique, pourrait être proposé afin de limiter la morbidité et la mortalité de ces surinfections.

Etude "Endocardite infectieuse en France en 2008"

Type de collaboration : CNR – Association pour l'étude et la prévention de l'endocardite infectieuse (AEPEI)

Cette enquête, conduite dans le cadre d'un PHRC a eu pour objectif principal de décrire l'évolution de l'incidence, des caractéristiques épidémiologiques, cliniques, microbiologiques et pronostiques et des modalités du traitement chirurgical de l'endocardite infectieuse (EI) en France en 2008 par rapport à 1991 et 1999. A travers cette étude, ont été réalisées une évaluation de l'impact de la limitation des indications de l'antibioprophylaxie depuis 2002, l'identification de l'éventuelle émergence des endocardites nosocomiales et liées aux soins et la surveillance de l'évolution de la résistance aux antibiotiques des streptocoques, entérocoques et staphylocoques, la description des pratiques chirurgicales (délai d'intervention, type de geste réalisé) selon les caractéristiques de l'EI et enfin l'évaluation de l'impact des stratégies chirurgicales sur la morbi-mortalité à court et moyen terme.

Il s'agissait d'une étude observationnelle prospective à base populationnelle sur 25 millions d'habitants. Le recueil des cas a été effectué sur 1 an, du 1er janvier au 31 décembre 2008. Dans le but d'une comparaison avec les résultats des enquêtes précédentes, elle intéressait les zones géographiques alors concernées (Rhône-Alpes, Paris et Petite Couronne, Lorraine, Franche-Comté et Marne) auxquelles ont été rajoutés la région Languedoc-Roussillon et le département de l'Ille et Vilaine. Tout patient de plus de 18 ans traité pour endocardite prouvée ou suspectée a fait l'objet d'une déclaration, y compris en cas de prise en charge secondaire ou tertiaire. L'application de critères diagnostiques validés a permis de ne retenir que les endocardites avérées. La déclaration des cas a été obtenue par trois voies : 1) cliniciens ayant pris en charge le patient, 2) microbiologistes par le biais des hémocultures, des sérologies et des prélèvements de valves, 3) échocardiographistes des centres participants. Après chaque déclaration un clinicien, un microbiologiste ou un échocardiographe des centres participants, des bordereaux de recueil d'informations cliniques et microbiologiques ont été adressés respectivement au clinicien responsable du patient et au microbiologiste du centre. Le CNR des Staphylocoques a participé à l'élaboration du protocole et a coordonné le recueil et l'analyse moléculaire des souches de staphylocoques isolées. La collection analysée était constituée de 160 souches dont 124 souches de *S. aureus*, 25 *S. epidermidis*, 4 *S. capitis*, 2 *S. haemolyticus*, 2 *S. hominis*, 3 *S. lugdunensis*. L'identification de l'espèce a été vérifiée par PCR et séquençage du gène *tuf*. L'analyse moléculaire des souches basée sur les outils de typages décrits par ailleurs dans ce document (*mecA*, *agr*, MLST, *spa*-type, profil toxinique et puces à ADN) est en cours.

Protocole "Polymorphisme génétique de l'hôte et portage nasal de *S. aureus* chez les amérindiens du village de Trois-Sauts (Guyane) "

Type de collaboration : CNR – Inserm, Département de la Recherche Clinique et Thérapeutique (DRCT)

Ce protocole se situe dans la continuité scientifique du projet ERAES (Ecologie de la résistance aux antibiotiques de E*scherichia coli* et S*taphylococcus aureus* dans les flores commensales de l'homme et des animaux en milieu naturel. Transition vers la virulence et impact sur la santé humaine). Ce projet se déroule depuis le 12/10/2006 dans le village de 3-Sauts en Sud-Guyane où vit de façon traditionnelle une tribu d'amérindiens Wayampi. Les caractéristiques du polymorphisme ADN seront analysées par rapport au statut de porteur nasal de *S. aureus* de ces volontaires et la nature des souches hébergées (clone, facteur de colonisation). Cent soixante cinq sujets se sont portés volontaires pour être inclus dans l'étude initiale lors d'une campagne de prélèvements effectuée sur place en Octobre 2006. L'analyse de ces prélèvements auquel a participé le CNR des staphylocoques a montré que la prévalence du portage nasal de *S. aureus* chez les Wayampi est de 44% alors qu'avec des techniques d'analyse strictement équivalentes, notre équipe et d'autres trouvent dans les populations humaines des taux de prévalence entre 20 et 25%.

Une deuxième campagne de prélèvements de nez, auquel a participé un des membres de notre laboratoire, a été effectuée en 2008 chez les volontaires du projet ERAES dans les mêmes conditions que la première afin de déterminer les caractéristiques du portage nasal de *S. aureus* chez chacun des volontaires. Au terme de ce deuxième prélèvement et de la caractérisation des souches isolées, les volontaires ont été classés en 4 catégories : pas de portage, portage intermittent (1/2 prélèvements positifs), portage permanent à souche unique, portage permanent à souches différentes.

L'analyse moléculaire des souches isolées lors des premiers prélèvements d'octobre 2006 a montré qu'un petit nombre de clones de *S. aureus* circulaient parmi les volontaires étudiés, ce qui n'est pas surprenant en raison de la grande promiscuité qui existe à 3-Sauts (nombreux habitants dans chaque habitation) et des conditions d'hygiène qui y prévalent.

L'analyse des 71 souches de *S. aureus* recueillies au cours de la campagne 2008 est en cours de finalisation. Les premiers résultats indiquent que les souches appartiennent à seulement 10 séquence-types (ST) différents dont seulement 5 concentrent de façon sensiblement équilibrée près de 90% des souches. Aucune des souches n'étaient porteuse du gène *mecA* (résistance à la pénicilline, MRSA), ni du gène codant la toxine TSST-1. En revanche, huit souches (11%) portaient le gène codant la leucocidine de Panton Valentine et trois le gène de l'exfoliatine A (*eta*). La comparaison entre les souches des deux périodes de recueil effectué sur les mêmes patients est en cours. Les premières données semblent indiquer majoritairement un portage intermittent de *S. aureus* dans la population étudiée et chez les porteurs permanents un changement de la nature (clone) de la souche hébergée entre les deux périodes.

Ces premières données microbiologiques vont être mises en perspective avec les résultats des autres axes de l'étude notamment l'étude de la ségrégation, dans cette population ethniquement très homogène, de traits génétiques spécifiques.

Etude "ONERBA 2008 – SARM producteurs de toxines"

Type de collaboration : CNR - ONERBA

En raison de l'émergence récente de nouveaux clones de SARM communautaires porteurs de gènes codant les toxines de Panton Valentine (PVL/*luk-PV*) et du choc toxique staphylococcique (TSST-1/*tst*) responsables d'infections staphylococciques graves, l'ONERBA et le CNR ont décidé de mener conjointement une enquête en 2008 afin : i) d'évaluer l'évolution des cas d'infections à SARM PVL et les caractéristiques des souches SARM-PVL isolées en France en 2008 ; ii) d'évaluer l'incidence des SARM-TSST (la pré-enquête rétrospective de 11 laboratoires de l'ONERBA suggérant que ces souches sont au moins aussi importante que les souches de SARM-PVL).

Cette enquête "trans-réseaux", menée par les microbiologistes volontaires des réseaux fédérés au sein de l'ONERBA sur une durée de 6 mois (mai à octobre 2008) a permis de recueillir le nombre total de malades pour lesquels a été obtenu un prélèvement positif à visée diagnostique comportant : i) *S. aureus*, ii) *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM), iii) *S. aureus* résistant à la méticilline et de phénotype PVL "européen" (SARM-PVL ST80) (OX_R, FA_I, FQ_S, GM_S et K_R, TM_S) ; iv) *S. aureus* résistant à la méticilline et de phénotype TSST1 typique (OX_R, FA_I, FQ_S, GM_S et K_R, TM_R) ; v) *S. aureus* résistant à la méticilline et sensible à tous les aminosides (OX_R, FA_I, FQ_S, GM_S et K_S, TM_S). Des données clinico-biologiques ont été par ailleurs recueillies.

En liaison avec l'ONERBA, le CNR des staphylocoques a assuré l'organisation de la collecte de l'ensemble des souches incluses et la caractérisation moléculaire de collection constituée.

A ce jour, 325 souches ont été incluses. L'analyse combinée des phénotypes de résistance du typage *agr* et des profils toxiques a permis de montrer que 88 souches présentaient les caractéristiques du « clone SARM-PVL Européen ST80 » et 198 présentaient les caractéristiques du clone « SARM-TSST1 Géraldine ». L'analyse de l'ensemble des données moléculaires ainsi que des données épidémiologiques (prévalence par rapport à l'ensemble des *S. aureus* et SARM sur la période d'études, données clinico-biologiques des patients) sont en cours de réalisation. D'ores et déjà, ces premiers résultats semblent confirmer l'émergence du clone « Géraldine » (SARM-TSST1, *agr*2) en France, sa diffusion sur l'ensemble du territoire français avec les risques en terme de santé publique et les conséquences cliniques (choc toxique staphylococcique) liées à la sécrétion éventuelle par ces souches de la toxine TSST-1.

Etude "Diversité génétique des souches de *S. aureus* isolées chez des ruminants producteurs de lait"

Type de collaboration : CNR - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité Pathologie des Petits Ruminants, Sophia-Antipolis, France.

Staphylococcus aureus est un pathogène largement répandu et responsable d'infections mammaires cliniques ou subcliniques chez les brebis, chèvres et vaches laitières. L'étude conduite avait pour but de comparer 65 souches de *S. aureus* de brebis colonisées au niveau nasal ou présentant une mammite subclinique avec 43 souches isolées de mammites subcliniques chez 22 chèvres et 21 vaches laitières. Une puce à ADN présentant des sondes spécifiques a été utilisée pour détecter après amplification par PCR multiplex la présence de 190 gènes de virulence (connus ou potentiels). Le CNR des staphylocoques a assuré le typage moléculaire (identification des clones) des souches de *S. aureus* recueillies.

Les résultats obtenus montrent que les souches d'origine ovine ne présentaient aucun facteur de virulence tissulaire. De plus parmi l'ensemble des souches étudiées, le pulsotype majoritaire souches (OV/OV') correspondant à des souches présentant un allèle *agr* de type 3 et un spa-type t1773 n'a été isolé que parmi les souches caprines et bovines. Ce clone est caractérisé par la présence spécifique des gènes *lpl4*, *ssl6*, *bsaA1*, *bsaB*, *bsaP*, *SAV0812*. Par ailleurs, les sept gènes *lpl1*, *sel*, *sec*, *tst*, *lukF-PV-like component*, *lukM*, *SAV0876*) étaient associées aux souches isolées des petits ruminants, alors que dans le même temps l'opéron *egc* ainsi que les gènes *fhuD1*, *abiF* and *SAV2496* étaient associées aux souches d'origine bovine. Cette étude moléculaire suggère l'existence de spécificité clones/hôtes aboutissant à une spécificité hôte-dépendant de la pathogénie de souches de *S. aureus* isolées chez les ruminants.

Epidémiologie des clones de SARM en Afrique

Type de collaboration : CNR – Réseau Institut Pasteur (Programme Transversal de Recherche – PTR SARM Afrique)

L'objectif principal de ce projet était de caractériser les clones de SARM hospitaliers et communautaires circulants en Afrique. En effet les données concernant l'épidémiologie de ces pathogènes sur ce continent sont peu nombreuses et parcellaires bien que ce continent présente des caractéristiques environnementales, culturelles et sociologiques favorables à l'existence de spécificités. Entre janvier 2007 et Mars 2008, 86 souches de SARM ont été collectées dans cinq villes africaines représentatives de différentes zones géographiques : Casablanca au Maroc pour le Maghreb, Dakar au Sénégal pour l'Afrique de l'Ouest, Niamey au Niger pour l'Afrique sub-saharienne, Yaoundé au Cameroun pour l'Afrique centrale, et Antananarivo à Madagascar pour l'Afrique de l'Est. Une combinaison de techniques de typage moléculaire (*agr* typing, *spa*-typing, MLST, ECP, profil toxinique) et d'antibiogramme a été appliquée afin de caractériser les souches isolées.

L'analyse des résultats a révélé la présence d'un clone prédominant dans chaque pays comme en Europe mais avec une diversité inter-pays plus réduite compte tenu de l'étendue de la zone géographique étudiée. La plupart des souches (n=75, 87%) appartiennent à seulement trois clones majeurs (définis par leur séquence-type ST (MLST) et leur type de cassette SCC_{mec} (I à VI): le premier clone ST239/241-III (n=34, 40%) correspondait à un clone pandémique mondial bien connu, les deux autres clones ST88-IV (n=24, 28%) et ST5-IV (n=18, 21%) n'ont été rapportés qu'exceptionnellement à ce jour. De plus, notre étude a mis en évidence que l'Afrique comme les autres continents doit faire face à l'émergence et la dissémination inquiétante de clone communautaire (SARM-CO) porteur du gène codant pour la leucocidine de Panton Valentine spécifique à l'Afrique. Des études complémentaires ont d'ores et déjà été initiées afin d'évaluer la dynamique (temporel et géographique) de dissémination de ces clones spécifiques notamment des clones SARM-CO dans la communauté. Ces données permettront afin de pouvoir suivre et prévenir le risque d'épidémie et d'endémie au sein des populations autochtones ou des populations migrantes et par extension dans les populations des pays développés.

Protocole STIC "Evaluation en réseau de l'identification rapide de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline et productrices de la leucocidine de Panton-Valentine (SARM-PVL) par PCR et hybridation sur bandelettes"

Type de collaboration : CNR – STIC coordonné par Pr Vincent Jarlier

Ce projet réalisé dans le cadre d'un STIC (Soutien aux techniques innovantes et coûteuses) coordonné par le Pr Vincent Jarlier visait : (a) à mettre en place dans une cohorte d'hôpitaux universitaires une technologie récemment mise au point et commercialisée sous forme de trousse permettant l'identification rapide des souches de SARM-PVL et (b) à évaluer le bénéfice de l'application de cette technologie en routine par comparaison avec la situation antérieure (encore actuelle dans un grand nombre d'établissements) nécessitant le plus souvent un recours à un laboratoire expert capable de réaliser une PCR spécifique pour les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine.

La technique choisie, souvent désignée par les sigles LiPA (Line Probe Assay) ou DNA STRIP, repose sur une amplification génique multiplex à partir de bactéries obtenues en culture suivie d'une hybridation sur bandelettes.

La procédure se déroule en 3 phases : (a) lyse bactérienne simplifiée, (b) amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées et (c) détection de l'ADN amplifié par hybridation inverse sur des sondes pré-immobilisées sur des bandelettes et (d) révélation chromogénique. Les réactifs sont réunis sous forme de trousses.

Cette technique a tout récemment été étendue pour répondre à d'autres impératifs de bactériologie médicale, aboutissant à la mise à disposition d'une trousse GénoType *Staphylococcus* qui permet d'identifier les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (présence du gène *mecA*) et les souches productrices de la toxine PVL (présence des gènes *luk*). Les patients inclus ont été les patients hospitalisés chez lesquels on isole une souche de SARM suspecte d'être un SARM-PVL :

- prélèvement cutané ou pulmonaire chez un patient hospitalisé depuis moins de 48 heures (ex. hospitalisation pour dermatose nécrosante via les urgences).
- écouvillonnage nasal pour recherche de colonisation dans le cadre des enquêtes de dépistage autour de cas identifiés de SARM-PVL.
- toute souche de SARM sensible à gentamicine, tobramycine et fluoroquinolones, c.a.d. suspect de ne pas être un SARM hospitalier mais d'être un SARM communautaire, en particulier les souches de sensibilité diminuée à l'acide fusidique, phénotype majoritaire parmi les SARM-PVL isolés en France durant les dernières années.

L'intérêt de l'innovation sera évalué sur la base des 5 paramètres suivants :

1. Le délai d'obtention des résultats définitifs de l'identification pour chaque cas suspect, c.a.d. confirmation ou infirmation de SARM porteur du gène codant pour la PVL, à partir du jour de mise en culture des prélèvements. Ce délai a été comparé à celui nécessaire pour obtenir les résultats définitifs par les méthodes conventionnelles et le recours au service de laboratoires experts comme ceux des CNR.

2. Le délai de mise en oeuvre des mesures de prévention pour les patients porteurs identifiés : mise en isolement contact....

3. Le coût de la stratégie d'identification rapide comparé au coût des méthodes conventionnelles et au recours au service de laboratoires experts (frais d'expédition, frais d'analyse..)

Les souches de SARM-PVL identifiées grâce au projet ont été mises à la disposition des CNR ci-dessus.

Le CNR des staphylocoques a, pour sa part réalisé, l'inclusion de 19 patients. Les résultats obtenus avec la trousse GénoType *Staphylococcus* ont révélé une concordance de 100% avec les techniques de PCR classique.

Parallèlement, l'analyse des données recueillies clinico-microbiologiques ainsi que des données pharmaco-économiques sur l'ensemble des 22 laboratoires français ayant participé à l'étude, est en cours.

4- Alerte :

Des rapports très fluides et très directs avec nos partenaires de l'InVS rendent les procédures d'alerte simples, rapides et efficaces. Le téléphone et le courrier électronique sont utilisés en priorité.

5- Activités d'information, de formation et de conseil :

5-1- Accueil de stagiaires

Ont été accueillis les stagiaires suivants : Leila Forough Nowrouzian (Protocole Immunobiota, Göteborg University) : 3 mars au 31 mai 2008, Jean Philippe Rasigade (Master): 2008-2009, Nicolas Rouzic (Master) : 2008-2009, Marie Bergeron (Mise au point technique identification gène *tuf*, 5^{ème} année hospitalo-universitaire Pharmacie) : 1^{er} septembre 2007 au 30 septembre 2008, Grégory Perrier (thèse Pharmacie) : 2008-2009 , Mélanie MOUNIER (Test du kit Evigene, 2ème année IUT) : 14 avril au 27 juin 2008.

5-2- Organisation d'un congrès

Le CNR a organisé les 14 et 15 octobre 2008 à Lyon un colloque francophone sur les staphylocoques et les maladies staphylococciques (SympoStaph) en partenariat avec l'InVS, l'INSERM, les Hôpitaux de Lyon et l'Université de Lyon. Ce colloque a traité des staphylocoques humains et animaux, de leurs aspects cliniques et thérapeutiques, de l'épidémiologie, de la physiopathologie, de la réponse de l'hôte et d'aspects plus fondamentaux avec un objectif de compréhension des maladies staphylococciques.

SympoStaph a réuni plus de 200 participants issus du monde des cliniciens, vétérinaires, épidémiologistes, biologistes, chercheurs et industriels. On notera la participation de citoyens Suisses, Belges, Canadiens et d'Afrique du Nord.

Le Comité d'organisation était composé de : F. Vandenesch, G. Lina, C. Chidiac, J. Etienne, Ph Vanhems, A. Lepape, D. Floret, et N. Bonnefoy-Berard.

Les principaux thèmes traités ont été :

- **Clinique des Infections à staphylocoques** : la pneumonie nécrosante ; les infections ostéo-articulaires ; les infections de la peau et des tissus mous ; les infections endovasculaires,
- **Physiopathologie** : Rôles des leucocidines en pathologie humaine et vétérinaire : les leucocidines LukED, LukM lukF et leucocidine de Panton Valentine ; superantigènes et sepsis,
- **Epidémiologie** : dynamique des *S. aureus* résistants à la méticilline communautaires et hospitaliers ; épidémiologie des SASM ; modélisation des phénomènes épidémiques,
- **Génomique et autres approches globales** : bénéfice des approches par puces à ADN pour comprendre la physiopathologie et la génétique de population de *S. aureus* ; approche bio-informatique des ARN régulateurs de *S. aureus*.
- **Contrôle et prévention** : nouveaux phénotypes de résistance aux antibiotiques, nouvelles cibles thérapeutiques, place de l'immunothérapie active et passive anti-staphylococciques, recommandations de prévention.

Les résumés des interventions et des posters sont disponibles sur le site web du CNR.
Le CNR envisage une nouvelle édition de SympoStaph en octobre 2010.

5-3- Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

- Rétro-information aux partenaires
- Diffusion aux professionnels : conférences, Site web : le CNR dispose d'un site web (<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR%5Fstaphylocoques/>) qui présente notamment les activités du CNR, le mode de fonctionnement, les modalités d'envoi, les fiches à télécharger, et les personnes à contacter.

5-4- Activités de conseils aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)

Les demandes sont gérées à travers un staff hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce staff permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel. En cas d'urgence des réunions de concertation sont organisées sans délai.

5-5- Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

- J. Etienne a été contacté par Peet Tüll de l'ECDC pour participer à une réunion européenne sur les SARM communautaires. J. Etienne a été élu au niveau européen avec 4 autres microbiologistes du réseau EARSS pour orienter les projets portant sur les staphylocoques.
- Le Professeur J.C. Lucet a été mandaté par le HCSP et le CTINILS pour animer un groupe de travail en charge d'élaborer des recommandations sur le SARM Communautaire en France. Les termes de la saisine du DGS au HCSP sont : « La question [des SARM communautaires PVL positifs] mérite d'être débattue collégialement par les experts du HCSP sur la base des données bactériologiques et épidémiologiques actualisées, avec, le cas échéant, constitution d'un groupe de travail et proposition de recommandations de prise en charge et de prévention des infection à SARM Co. »

Un groupe de travail a donc été constitué, groupe auquel participe F. Vandenesch et Y. Gillet pour le CNR des staphylocoques. Les propositions de recommandation devraient être finalisées avant l'été 2009.

6- Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

Les personnels du CNR appartiennent pour la plupart à l'équipe de recherche INSERM thématifiée sur les staphylocoques. Il existe donc un continuum entre la recherche fondamentale, la recherche clinique et la recherche transitionnelle, l'activité de CNR étant située plutôt sur les versants clinique et translationnel de ces recherches.

L'équipe INSERM dirigée par F. Vandenesch et J. Etienne est intégrée depuis le 1 janvier 2007 dans une formation de 9 équipes (**INSERM U851, Dir J. Marvel**) qui réunit des équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes.

Notre objectif général de recherche est une approche globale des maladies staphylococciques et nos recherches relèvent :

A- de la microbiologie clinique, de l'épidémiologie moléculaire des staphylocoques et des caractéristiques cliniques des infections, en s'appuyant très fortement sur le CNR des Staphylocoques (notamment grâce aux réseaux de collaborations et aux bibliothèques du CNR).

B- de la physiopathologie des maladies staphylococciques et des perspectives thérapeutiques : (a) physiopathologie des lésions observées dans les maladies associées à la leucocidine de Pantone Valentine, en particulier la pneumonie nécrosante et les infections ostéo-articulaires pour laquelle nous avons démontré le rôle pro-apoptotique de la PVL, le rôle dysrégulateur global de cette toxine sur l'expression des autres facteurs de virulence de *S. aureus* et la fonction d'adhésine exercée par le peptide signal de la PVL, le rôle causal dans la constitution des lésions chez l'animal, et enfin l'influence des antibiotiques sur la production de cette toxine ; (b) physiopathologie des maladies associées aux superantigènes staphylococciques (SAg), incluant : (b1) l'étude des capacités immunomodulatrices des SAg dans les maladies non toxiques (suppurations superficielles et profondes, bactériémies) ainsi que dans l'induction de la tolérance immunitaire (étude de l'action des SAg sur les Treg) ; (b2) le rôle potentiel de certains SAg (codés par l'enterotoxin gene cluster) dans la stimulation de l'immunité anti-tumorale.

C- d'une recherche plus fondamentale sur l'étude des relations structure-fonction de l'ARNIII (ARN régulateur de l'expression de la virulence), et par l'identification et la caractérisation de nouveaux ARN non codants chez *S. aureus*.

Les principaux **faits marquants** de notre recherche sont les suivants :

Epidémiologie des *S. aureus* résistants à la méticilline en milieu communautaire. Nous avons été l'une des premières équipes à décrire l'émergence, dans la communauté, de souche de *S. aureus* résistantes à la méticilline et producteurs de la leucocidine de Panton Valentine² et, à montrer que ce phénomène se produisait au niveau mondial avec des clones différents apparaissant comme spécifiques de continent³. Une nouvelle étude réalisée entre 2002 et 2006 à partir d'une collection de 469 isolats provenant des cinq continents nous a permis de montrer, d'une part la diffusion intercontinentale des clones initiaux, témoignant de la forte épidémicité de ces clones, d'autre part l'apparition de nouveaux clones, non identifiés dans l'étude précédente, et encore faiblement prévalents aujourd'hui⁴. Néanmoins, toutes les études actuelles illustrent le formidable « succès épidémique » des souches issues de la lignée USA300 et une étude récente⁵ corroborée par notre équipe⁶ révèle que la PVL des souches USA300 est porteuse d'une mutation H176R qui pourrait avoir des conséquences fonctionnelles sur la virulence. Nous avons testé cette hypothèse par l'analyse fonctionnelle de l'activité leucotoxique des différents variants alléliques de PVL sous forme recombinante⁷.

Dans ce système, nous n'avons pas observé de différences fonctionnelles entre les différents allèles de la PVL ce qui n'exclut pas des différences de virulence *in vivo*. En revanche, ce travail confirme les capacités de cytotoxicité de la PVL produite par la souche de SARM communautaire USA300, redressant ainsi l'idée selon laquelle la PVL d'USA300 n'est pas un facteur de virulence⁸

² Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Richet H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis. 2002 Oct 1;35(7):819-24. Epub 2002 Sep 3.

³ Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. 2003 Aug;9(8):978-84

⁴ Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, Reverdy ME, Enright MC, Vandenesch F, Etienne J. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin—positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. Emerg Infect Dis. 2007 Apr;13(4):594-600.

⁵ O'Hara FP, Guex N, Word JM, Miller LA, Becker JA, Walsh SL, Scangarella NE, West JM, Shawar RM, Amrine-Madsen H. A geographic variant of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin toxin and the origin of community-associated methicillin-resistant *S. aureus* USA300. J Infect Dis. 2008 Jan 15;197(2):187-94.

⁶ Dumitrescu O, Anne Tristan, Hélène Meugnier, Michèle Bes, Manolo Gouy, Jerome Etienne, Gérard Lina, François Vandenesch. The polymorphism of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin and its possible link with the fitness of CA-MRSA. J Infect Dis 2008. In press.

⁷ Besseyre des Horts T, Oana Dumitrescu, Cédric Badiou, Yvonne Benito, Jerome Etienne, François Vandenesch, Gerard Lina. The histidine to arginine substitution of Panton-Valentin leukocidin expressed by USA300 CA-MRSA does not impair leukotoxicity. Soumis à Clinical Microbiology and Infections

⁸ Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, DeLeo FR. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? J Infect Dis. 2006 Dec 15;194(12):1761-70. Epub 2006 Nov 2.

Clinique et physiopathologie des pneumonies nécrosantes à *S.aureus* producteurs de la leucocidine de Panton Valentine. Notre travail publié en 2002⁹ avait démontré le lien épidémiologique entre *S. aureus* producteur de PVL et la survenue de pneumonies gravissimes (70% de mortalité) chez l'enfant et l'adulte jeune sans facteur de risques. Dans une étude portant sur une cohorte de 50 cas documentés de pneumonie nécrosante nous avons identifié les facteurs associés à la mortalité : l'hémoptysie (en analyse univariée) et la leucopénie (analyse multivariée) apparaissent comme significativement associées au décès¹⁰. Ces deux facteurs sont cohérents par rapport au rôle proposé de la PVL qui d'une part produirait des lésions nécrotiques au niveau des épithélia et notamment de la barrière alvéolo-capillaire (à l'origine des hémoptysies et de l'altération aigue des échanges gazeux), d'autre part induit une mort des polynucléaires par un effet pro-apoptotique et nécrotique dose dépendant¹¹. Sur le plan de la physiopathologie, un modèle de pneumonie nécrosante a été mis au point en collaboration avec une équipe américaine et des souches isogéniques pour la PVL ont été testées dans ce modèle. Nous avons confirmé le rôle déterminant de la PVL dans la constitution de la pneumonie chez la souris, y compris en utilisant la souche USA300 et son dérivé isogénique délété dans luk-PV¹²¹³.

Par ailleurs, dans cette dernière étude nous avons montré l'effet protecteur vis à vis de la pneumonie nécrosante chez la souris d'une vaccination intranasale avec le composé LukS de la PVL. Concernant les étapes initiales de l'infection, en particulier la phase d'adhésion des *S. aureus* à l'épithélium respiratoire, nos travaux antérieurs réalisés avec des souches cliniques révélaient une adhésion importante des souches PVL-positive à la surface de l'épithélium respiratoire et à la matrice extracellulaire.

⁹ Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piemont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet. 2002 Mar 2;359(9308):753-9.

¹⁰ Gillet Y., Vanhems P., Lina G., Bes M., Vandenesch F., Floret D., Etienne J. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis 2007;45:315-21.

¹¹ Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F (equal senior authorship with LG), Genestier L. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin Invest. 2005 Nov;115(11):3117-27.

¹² Labandeira-Rey M., Couzon F., Boisset S., Brown EL., Bes M., Benito Y., Barbu EM., Vazquez V., Hook M., Etienne J., Vandenesch F., Bowden MG. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science 2007;315:1130-3.

¹³ Brown EL, Dumitrescu O, Thomas D, Badiou C, Koers EM, Choudhury P, Vazquez V, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Bowden MG. The Pantan-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. Clin Microbiol Infect. 2009 Feb;15(2):156-64

Nous avons confirmé ce phénotype à l'aide de souches isogéniques pour la PVL et avons démontré que cette capacité d'adhésion augmentée était déterminée par le peptide signal de LukS-PV qui fonctionne comme une adhésine des héparanes sulfates présents à la surface des épithéliums¹⁴.

Concernant la question de l'expression *in vivo* de la PVL au cours des infections en clinique humaine, nous avons tout d'abord démontré la présence de PVL à dose toxique dans les pus d'infections cutanées et dans les prélèvements broncho-pulmonaires de pneumonie nécrosante¹⁵ ; nous avons ensuite montré l'existence d'une réponse anticorps spécifique de la PVL dans les suites d'infection à *S. aureus* PVL-positif ce qui confirme indirectement l'expression de cette toxine *in vivo*¹⁶.

Du point de vue des stratégies thérapeutiques, nous avons montré que l'expression de la PVL est modulée au niveau transcriptionnel par les antibiotiques anti-staphylococciques avec un effet inducteur de l'expression par les bêta-lactamines¹⁷. Cet effet inducteur est cependant neutralisé par l'association des bêta-lactamines à des antibiotiques comme la clindamycine ou la rifampicine et dans une moindre mesure le linézolide¹⁸. Notre projet actuel vise à décrypter les mécanismes à l'origine de cette dysrégulation de la PVL induite par les antibiotiques. Nous avons démontré que les β -lactamines qui induisent la production de PVL (oxacilline, imipenem) ont comme cible la PLP1, enzyme qui intervient dans la synthèse de la muréine du septum de division. *A contrario*, le céfotaxime (spécifique de la PLP2), le céfacleore (spécifique de la PLP3) et la céfoxitine (spécifique de la PLP4) sont sans effet sur la production de PVL.

Nous faisons l'hypothèse que le blocage de la constitution du septum de division conduit à l'activation de la transcription de PVL. Dans ce sens, on constate que le blocage de l'expression de la PLP1 par un ARN antisens inductible a les mêmes effets d'induction de la PVL que l'ajout d'antibiotiques inhibant la PLP1. Ce sujet constitue le travail de doctorat d'Université de Oana Dumitrescu.

14 Tristan A., Yvonne Benito, Roland Montserret, Sandrine Boisset, Eric Dusserre, Francois Penin, Florence Ruggiero, Jerome Etienne, Hugues Lortat-Jacob, Gerard Lina, M. Gabriela Bowden, François Vandenesch The Signal Peptide of Staphylococcus aureus Panton Valentine Leukocidin LukS Component Mediates Increased Adhesion to Extracellular Matrix Components through an Heparan Sulfate Bridge. PLOS One 2009: in press

15 Badiou C, Dumitrescu O, Croze M, Gillet Y, Dohin B, Slayman DH, Allaouchiche B, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. Clin Microbiol Infect. 2008 Dec;14(12):1180-3.

16 Croze M, Dauwalder O, Dumitrescu O, Badiou C, Gillet Y, Genestier AL, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Serum antibodies against Panton-Valentine leukocidin in a normal population and during Staphylococcus aureus infection. Clin Microbiol Infect. 2009 Feb;15(2):144-8

17 Dumitrescu O., Boisset S., Badiou C., Bes M., Benito Y., Reverdy ME., Vandenesch F., Etienne J., Lina G. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1515-9.

18 Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. Clin Microbiol Infect. 2008 Apr;14(4):384-8.

Caractérisations clinico-microbiologiques des autres infections associées à la PVL

Hormis la pneumonie nécrosante dont l'association avec la PVL est bien établie, d'autres infections comme les infections cutanées primitives¹⁹ et les infections ostéo-articulaires²⁰ sont associées à des souches productrices de PVL. Dans un travail en collaboration avec le Dr Anne-Claude Crémieux, un modèle d'infection ostéo-articulaire chez le lapin a été développé afin de tester le rôle de ce modèle. La souche USA300 et son dérivé isogénique delta-PVL ont été utilisés ; les résultats révèlent que la PVL contribue à la sévérité des lésions, en particulier aux atteintes extra-osseuses²¹, ainsi qu'à l'ampleur de l'inflammation systémique, rejoignant ainsi les observations humaines.

Clinique et physiopathologie des maladies à superantigènes staphylococciques

Les superantigènes (SAGs) établissent un pont entre le CMHII présent sur les cellules présentatrices d'antigènes (en dehors du site de fixation classique des antigènes) et la chaîne V β du récepteur TCR2, au niveau des parties constantes de la portion variable de certains types de chaînes V β . Cette fixation est suffisante pour induire une activation cellulaire, touchant 5 à 50% des lymphocytes T, indépendamment de leur spécificité antigénique. En fonction de l'identité du SA, il existe des différences d'affinité pour les différentes chaînes V β des récepteurs TCR2. Une exploration complète de la spécificité V β des 20 SAG de *S. aureus* a été réalisée et permet d'établir le pattern V β caractéristique de chaque SAG²².

Il est établi que les chocs toxiques staphylococciques peuvent avoir une origine menstruelle ou non menstruelle mais ces derniers sont mal connus du point de vue clinique, microbiologique et toxinique. Nous avons donc comparé les caractéristiques cliniques et biologiques de 21 cas menstruels à 34 cas non menstruels diagnostiqués en France entre décembre 2003 et juin 2006.

Les cas non menstruels sont plus souvent bactériémiques (50% versus 0% dans les cas menstruels), sont plus fréquemment associés à des manifestations neurologiques et ont une mortalité plus élevée (22% versus 0%). La TSST-1 et l'entérotoxine A (SEA) sont plus fréquemment en cause dans les cas menstruels alors que les cas non menstruels sont dus à différentes entérotoxines, aucune n'étant significativement plus fréquente que dans les cas non menstruels.

¹⁹ Durupt F, Mayor L, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Thomas L, Etienne J. Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157(6):1161-7. Epub 2007 Oct 4.

²⁰ Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, Floret D, Etienne J. Pediatric bone and joint infections caused by Pantón-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Nov;26(11):1042-8.

21 SALEH-MGHIR A., Oana DUMITRESCU, Gerard LINA, Christian VALLEE, François. VANDENESCH, Jerome ETIENNE, and Anne Claude CRÉMIEUX. Program of Abstracts. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington. Abstr. no. B-3566, 2008, p 69

22 Thomas D, Dauwalder O, Brun V, Badiou C, Ferry T, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Staphylococcus aureus superantigens elicit redundant and extensive human V{beta} patterns. *Infect Immun*. 2009 Mar 2. [Epub ahead of print]

Cependant, la production de SED reste significativement associée à une mortalité plus élevée. Au total, il existe de nombreuses différences entre les cas menstruels et non menstruels, notamment du point de vue pronostic, qui encouragent à une prise en charge plus agressive des cas non menstruels.

Le rôle des exotoxines superantigéniques (SAG) est actuellement bien établi pour ce qui est du choc toxique staphylococcique ; en revanche la participation de ces toxines à la survenue du choc septique est controversée. La mise en évidence de la production de ces toxines *in vivo* chez des patients présentant un choc septique, comparés à d'autres présentant un choc toxique serait un élément de réponse à cette question. Même si nos travaux sur la détection de toxines par spectrométrie de masse sont prometteurs et permettraient même une quantification absolue des SAG²³, la sensibilité de ces approches est aujourd'hui insuffisante. Aussi, l'absence de technique actuellement disponible pour la détection directe de ces toxines dans les liquides biologiques nous a conduit à utiliser un test fonctionnel : l'analyse du répertoire V β des lymphocytes T des patients dont l'expansion témoigne d'un contact spécifique avec un SAG. En effet il est bien démontré que les SAG induisent l'expansion d'un répertoire V β spécifique de chaque superantigène. Ainsi, l'analyse prospective du répertoire V β par cytométrie en flux (marquage par anticorps anti-CD3 et 24 anticorps anti-V β) des LT de 5 et 9 patients présentant respectivement un choc toxique staphylococcique et un choc septique a été effectuée. En parallèle, le profil toxinique de toutes les souches isolées a été réalisé et le répertoire V β des lymphocytes T de sujets sains exposés aux surnageants de chaque souche a été déterminé. Les résultats révèlent que les patients ayant un choc septique étaient plus âgés (61 vs. 30 ans), étaient plus lymphopéniques (0.8 vs. 2.5 G/L), étaient plus souvent immunodéprimés (44% vs. 0%) et avait un taux de mortalité supérieur (56% vs. 0%). *In vitro*, la signature V β des SAG impliqués étaient les suivantes : TSST-1, V β 2 ; SEA, V β 9, 22 ; SEB: V β 3, 14, 17; SED: V β 1, 8; *egc*: V β 5.3, 7.1, 9, 23; et SEK: V β 5.1. Les signatures V β de TSST-1 ou de SEB étaient retrouvées chez les patients ayant un choc toxique ; à l'inverse, aucune signature V β n'a été retrouvée chez les patients ayant un choc septique alors que les isolats produisaient un ou plusieurs SAG *in vitro*²⁴.

²³ Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, Vandenesch F, Garin J. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Dec;6(12):2139-49

²⁴ Ferry T, Thomas D, Perpoint T, Lina G, Monneret G, Mohammedi I, Chidiac C, Peyramond D, Vandenesch F, Etienne J. Analysis of superantigenic toxin V β T-cell signatures produced during cases of staphylococcal toxic shock syndrome and septic shock. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Mar 27;

Ainsi, la recherche d'une signature V β sur les lymphocytes de patients confirme l'exposition du système immunitaire aux SAG produits par *S. aureus* dans le cas du choc toxique ; cette technique s'avère même être un test fonctionnel utile au diagnostic précoce du choc toxique²⁵; y compris dans le cas des chocs toxiques liés aux streptocoques du groupe A producteurs de SAG²⁶ ; en revanche, cette approche suggère que les SAG ne participent pas à la physiopathologie du choc septique à *S. aureus*.

Relation structure fonction de l'ARN régulateur de la virulence (ARNIII) de *S.aureus*.

L'ARNIII contrôle positivement et négativement l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la virulence. Une grande partie des effets de l'ARNIII sont probablement indirects, par un effet sur des régulateurs transcriptionnels qui contrôlent eux-mêmes plusieurs gènes. Aussi, une fonction possible de l'ARNIII serait de moduler l'activité de facteurs transcriptionnels activateurs ou inhibiteurs²⁷. A ce jour, deux cibles directes de l'ARNIII sont connues, l'ARNm hla (codant l'hémolysine alpha) et l'ARNm spa (codant la protéine A) dont nous avons identifié le mécanisme de régulation²⁸. Dans la mesure où de nombreux ARN régulateurs contrôlent l'expression de leurs gènes cibles par formation d'un duplex avec l'ARNm, une recherche systématique de séquences complémentaires à l'ARNIII a été effectuée sur les séquences 5' et 3' des gènes annotés disponibles dans les bases de données. Ainsi plusieurs ARNm qui possèdent des séquences complémentaires avec le domaine 3' de l'ARNIII ont été identifiés et comprennent d'une part des facteurs de virulence : l'ARNm spa (protéine A), l'ARNm SA1000 (codant une protéine annotée comme fibrinogen-like binding protein), l'ARNm coa (coagulase), et d'autre part des facteurs de transcription comme l'ARNm rot (facteur de régulation transcriptionnel de nombreux facteurs de virulence). De façon analogue à l'ARNm spa, le domaine 3' de l'ARNIII couvre le site de fixation au ribosome des ARNm identifiés et l'équipe de Pascale Romby avec qui nous collaborons a montré que le duplex ARNIII-ARNm cible entre en compétition avec le ribosome et que ce duplex est clivé par la RNaseIII²⁹.

²⁵ Ferry T, Thomas D, Bouchut JC, Lina G, Vasselon-Raina M, Dauwalder O, Gillet Y, Vandenesch F, Floret D, Etienne J. Early diagnosis of staphylococcal toxic shock syndrome by the detection of TSST-1 V β signature in peripheral blood of a 12-year old boy. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Feb 7;

²⁶ Thomas D, Perpoint T, Dauwalder O, Lina G, Floccard B, Richard JC, Bouvet A, Peyramond D, Allaouchiche B, Chidiac C, Vandenesch F, Etienne J, Ferry T. In vivo and in vitro detection of a superantigenic toxin V β signature in two forms of streptococcal toxic shock syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Nov 20. [Epub ahead of print]

²⁷ Romby P, Vandenesch F, Wagner EG. The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Apr;9(2):229-36. Epub 2006 Mar 10. Review

²⁸ Huntzinger E & Boisset S (contribution égale de EH et SB), Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, Lina G, Etienne J, Ehresmann B, Ehresmann C, Jacquier A, Vandenesch F (equal senior authorship with P.Romby), Romby P. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *Embo J* 2005; 24:824-35.

²⁹ Chevalier C, Huntzinger E, Fechter P, Boisset S, Vandenesch F, Romby P, Geissmann T. Staphylococcus aureus endoribonuclease III purification and properties. *Methods Enzymol*. 2008;447:309-27.

Ce modèle de régulation a été testé *in vivo* en utilisant différentes fusions transcriptionnelles et nos résultats confirment l'hypothèse d'un mécanisme de type antisens. Ainsi, le domaine 3' de l'ARNIII apparaît comme un domaine de régulation de la virulence, agissant par formation d'un duplex avec d'une part l'ARNm de différents gènes de virulence et d'autre part l'ARNm rot dont le produit régule la transcription de plusieurs gènes de virulence³⁰. Nous poursuivons actuellement l'analyse fonctionnelle des autres domaines de l'ARNIII non encore explorés à l'aide des mêmes approches déjà utilisées avec succès et toujours en collaboration avec l'équipe de P.Romby (financement ANR Microbio).

En parallèle, nous collaborons avec l'équipe de Christine Gaspin (Inra, Toulouse) et celle de P. Romby pour rechercher et caractériser de nouveaux ARN non codants de *S. aureus*. L'approche bioinformatique utilisée par C. Gaspin a révélé plusieurs candidats dont l'expression a été vérifiée *in vivo* par Northern blot. La caractérisation de ces petits ARN est en cours (conjointement entre les laboratoires de Lyon et Strasbourg) en utilisant les approches *in vitro* (expression *in vitro*, cartographie en solution) et *in vivo* (invalidation, recherche des cibles, mécanismes d'interaction, etc). L'un de nos objectifs spécifique par rapport à ces nouveaux petits ARN est de déterminer s'ils sont exprimés en situation d'infection et/ou de colonisation chez l'homme. Pour cela nous avons choisi de travailler sur deux types d'échantillons cliniques, d'une part des pus d'abcès profonds requérant une évacuation chirurgicale qui représentent l'infection aiguë, d'autre part des prélèvements broncho-pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose et qui représentent l'infection chronique. Nous avons mis en place une filière avec les cliniciens de notre hôpital pour la prise en charge de ces prélèvements en vue d'une préservation du contenu en ARN bactérien. Nous travaillons actuellement à la mise au point des techniques d'extraction de ces ARN à partir des prélèvements.

7- Liste des publications et communications

7-1- Liste des publications

Descloux E, Perpoint T, Ferry T, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Mohammedi I, Etienne J. One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. Eur J Clin microbiol Infect Dis. 2008;27:37-43.

³⁰ Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, Chevalier C, Helfer AC, Benito Y, Jacquier A, Gaspin C, Vandenesch F, Romby P. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. Genes Dev. 2007 Jun 1;21(11):1353-66.

Ferry T, Thomas D, Bouchut JC, Lina G, Vasselon-Raina M, Dauwalder O, Gillet Y, Vandenesch F, Floret D, Etienne J. Early diagnosis of staphylococcal toxic shock syndrome by detection of the TSST-1 V β signature in peripheral blood of a 12-year-old boy. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:274-7.

Ferry T, Thomas D, Perpoint T, Lina G, Monneret G, Mohammedi I, Chidiac C, Peyramond D, Vandenesch F, Etienne J. Analysis of superantigenic toxin V β T-cell signatures produced during cases of staphylococcal toxic shock syndrome and septic shock. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:546-54.

Lemaire X, Legout L, François C, Lina G, Beltrand E, Senneville E, Etienne J, Yazdanpanah Y. First case of horizontal transmission of a new clone C-MRSA with toxic shock syndrome toxin 1. *Scand. J. Infect. Dis*. 2008;40:675-6.

Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:384-8.

Sotto A, Lina G, Richard J.L, Combescure C, Bourg G, Vidal L, Jourdan N, Etienne J, Lavigne J.P.

Virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from diabetic foot ulcers: a new paradigm. *diabetes care* 2008;31:2318-24.

Dauwalder O, Lina G, Durand G, Bes M, Meugnier H, Jarlier V, Coignard B, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3454-8.

Dumitrescu O, Tristan A, Meugnier H, Bes M, Gouy M, Etienne J, Lina G, Vandenesch F. Polymorphism of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin genes and its possible link with the fitness of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *J Infect Dis*. 2008;198(5):792-4

Carré N, Sillam F, Dabas JP, Herbreteau N, Pinchon C, Ortman C, Thiolet JM, Vandenesch F, Coignard B. *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes nasal colonization and skin infection: Screening in case of outbreak in a school environment. *Med Mal Infect*. 2008;38:483-8.

Karauzum H, Ferry T, de Bentzmann S, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Schlaer M, Berger-Bächi B, Etienne J, Landmann R. Comparison of adhesion and virulence of two predominant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones and clonal methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. Infect Immun. 2008;76:5133-8.

Laurent F, Tristan A, Croze M, Bes M, Meugnier H, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Presence of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone (EEFIC) of *Staphylococcus aureus* in France. J Antimicrob Chemother. 2008;63:420-1.

Badiou C, Dumitrescu O, Croze M, Gillet Y, Dohin B, Slayman DH, Allaouchiche B, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. Clin Microbiol Infect. 2008;14:1180-3.

Chini V, Petinaki E, Meugnier H, Foka A, Bes M, Etienne J, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Emergence of a new clone carrying Panton-Valentine leukocidin genes and staphylococcal cassette chromosome mec type V among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. Scand J Infect Dis. 2008;40:368-72.

Marcel JP, Alfa M, Baquero F, Etienne J, Goossens H, Harbarth S, Hryniewicz W, Jarvis W, Kaku M, Leclercq R, Levy S, Mazel D, Nercelles P, Perl T, Pittet D, Vandenbroucke-Grauls C, Woodford N, Jarlier V. Healthcare-associated infections : think globally, act locally. Clin Microbiol Infect. 2008;14:895-907.

Gillet Y, Etienne J, Vandenesch F. Association of necrotizing pneumonia with panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*, regardless of methicillin resistance. Clin Infect Dis. 2008;47:985-6.

Daurel C, Huet C, Dhalluin A, Bes M, Etienne J, Leclercq R. Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *erm(A)* and *erm(C)* *Staphylococcus aureus* genes. J Clin Microbiol. 2008;46:546:50.

7-2- Communications sur invitation à des congrès

Lina G. *Staphylococcus aureus* : un nouveau pathogène. Paris, Microbiologie clinique, janvier 2008,

Etienne J. Overview of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. IX-Sir Dorabji Tata Symposium, Bangalore, India, 10-11 mars 2008.

Etienne J. Virulence of community-acquired MRSA. Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Royaume-Uni, 31 mars-9 avril 2008.

Vandenesch F. Call-to-action: strains of MRSA in Europe. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelone, 19-22 avril 2008.

Lina G. The Panton Valentin leukocidin as an example of a bacterial toxin underestimated clinical relevance. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelone, 19-22 avril 2008.

Dumitrescu O. Community acquired methicillin resistant *S. aureus*: Europe versus US. ESCMID Conference on Fighting Infections due to MDR Gram positives, Venise, 29-31 mai 2008.

Vandenesch F. CA-MRSA: update 2008. 6th congress of medical microbiology – MICROMED 2008, Belgrade, 11-14 juin 2008.

Etienne J. Actualités sur *Staphylococcus aureus*. 8^{ème} Journée Scientifique de l'ALMI, Casablanca, Maroc, 20 juin 2008.

Vandenesch F. Adhesion of PVL-positive isolates to matrix proteins. ISSSI. Cairns, Australie, 8 septembre 2008

Vandenesch F. PVL does it matter? ISSSI. Cairns, Australie, 10 septembre 2008

Dumitrescu Oana. Community acquired MRSA: an international perspective. Irish National MRSA Meeting. Dublin, 2 novembre 2008.

Etienne J. Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus*. 51^{ème} Journée de l'Hôpital Claude Bernard, Paris, 14 novembre 2008.

Vandenesch F. Staphylococcal Panton Valentine leukocidin: is it just a pore forming toxin among others? Séminaire. Institute of Medical Microbiology and Hygiene. University of Saarland Hospital Homburg/Saar, Allemagne, 18 novembre 2008 (invité par Pr. Hermann)

Lina G. Choc toxique et choc septique à *Staphylococcus aureus*. Symposium d'Anesthésie, Réanimation et Urgence, Toulouse, décembre 2008.

Tristan A. Le portage nasal à *S. aureus* : épidémiologie et caractéristiques microbiologiques.
28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 5 - 6 décembre 2008.

7-3- Communications orales à des congrès

Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Effect of antibiotics, alone and in association, on Panton-Valentine leukocidin production by *Staphylococcus aureus*. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, 19-22 avril 2008.

Leclercq R, Soussy C, Rio Y, Roussel-Delvallez, Etienne J, Biedenbach D, Jones R. Dalbavancin (DECIDE) tested against indicated Gram-positive species in European medical centres : results from France. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, 19-22 avril 2008.

Karauzum H, Ferry T, de Bentzmann S, Lina G, Bes M, Durand F, Vandenesch F, Landmann R, Etienne J. The two predominant HA-MRSA clones in France exhibit specific adhesive and virulence properties in vitro and in vivo in a mice sepsis model in comparison with MSSA isolates. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, 19-22 avril 2008.

Saleh-Mghir A, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Vandenesch F, Etienne J, Cremieux AC. Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Role in the Induction, Maintenance and Local Extension of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Rabbit Osteomyelitis. 48th ICAAC/46th ISDA. Washington, USA, octobre 2008.

Ramdani-Bougoussa N, Ziane H, Antri K, Bes M, Boubekri I, Djennane F, Neggazi M, Etienne J, Tazir M. Pneumonies communautaires nécrosantes à *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant producteur de leucocidine de Panton-Valentine à Alger. SympoStaph, Lyon, 14-15 octobre 2008.

Ferry T, Lina G, Chidiac C, Peyramond D, Vandenesch F, Etienne J. Exotoxines superantigéniques et état de choc (toxique et septique). SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Sotto A, Lina G, Richard JL, Combescure C, Etienne J, Lavigne JP. Potentiel de virulence des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de plaies du pied chez les diabétiques : nouveau concept. SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Garin B, Boisier P, Breurec S, Brisse S, Bouhali Zriouil S, Caro V, Djibo S, El Mdaghri N, Etienne J, Fall C, Fonkoua MC, Maudry A, Ngandjio A, Pouillot R, Rakotonirina A, Randrianirina F, Sani O, Seck A, Sire JM., Thiberge JM., Timinouni M, Zerouali K. Epidémiologie des infections à *Staphylococcus aureus* à la méticilline dans 5 villes africaines. SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Olivier J, Monneuse Y, Barth X, Etienne J, Pilleul F, Gruner L, Allaouchiche B. Emergence of cases of primary group A streptococcal peritonitis: how to diagnose and treat them-First series of primary group A streptococcal peritonitis. 94th American College of Surgeons. San-Francisco, 12-16 octobre 2008.

Sotto A, Lina G, Richard JL, Combescure C, Etienne J, Lavigne JP. Staphylocoques infectants – staphylocoques colonisants : nouvelles données issues de souches isolées du pied diabétique. 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

Rasigade JP, Meugnier H, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Etienne J, Tristan A. Diversité génétique des souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline et contenant les gènes de la leucocidine de Panton Valentine. 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

Ruimy R, Armand-Lefèvre L, Meugnier H, Bes M, Bertine M, Lixandru BE, Barbier F, Angebault C, Djossou F, Vandenesch F, Andremont A. Diversité génétique du portage nasal de *Staphylococcus aureus* dans une population amérindienne vivant isolée en Sud-Guyane. 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

Besseyre des Horts T, Dumitrescu O, Badiou C, Benito Y, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Implications biologiques du polymorphisme de la leucocidine de Panton Valentine de *Staphylococcus aureus*. 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

Antri K, Boubekri I, Dauwalder O, Rouzic N, Bes M, Etienne J, Tazir M, Ramdani-Bougoussa N. Forte prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et sécréteur de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algérois. 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

7-4- Communications affichées à des congrès

Ferry T, Perpoint T, Thomas D, Lepape A, Dauwalder O, Monneret G, Badiou C, Chidiac C, Vandenesch F, Etienne J. Detection of superantigenic toxin V β T-cell signatures during menstrual and non-menstrual staphylococcal toxic shock syndrome but not during *S. aureus* septic shock. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, 19-22 avril 2008.

Tristan A, Benito Y, Dusserre E, Bowden MG, Etienne J, Lina G, Vandenesch F. The signal peptide of Pantone-Valentine leukocidin *lukS* component induces increased adhesion to extracellular matrix components in *Staphylococcus aureus*. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, 19-22 avril 2008.

Ythier M, Boisset S, Vandenesch F, Moreillon P. *Caenorhabditis elegans* food-choice experiment : a rapid way to screen for *agr*-related *Staphylococcus aureus* toxins. 18th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, 19-22 avril 2008.

Ben Ayed S, Boutiba Ben Boubaker I, Bes M, Vandenesch F, Ben Red Jeb S, Etienne J. Caractérisation des clones de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline circulant à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis. SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Meugnier H, Dauwalder O, Mounier M, Bes M, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Evaluation du kit EVIGENE pour la mise en évidence des gènes *nucA*, *mecA*, *lukS-PV/lukF-PV*, *tst*, *vanAB* et *mupA* chez *Staphylococcus aureus*. SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Fechter P, Geissmann T, Boisset S, Chevalier C, Wagner G, Vandenesch F, Romby P. L'ARNIII de *Staphylococcus aureus* module la composition de la surface bactérienne. SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Carré N, Sillam F, Herbreteau N, Dabas JP, Ortman C, Pinchon C, Vandenesch F, Coignard B. Colonisation nasale et infection cutanée à *Staphylococcus aureus* porteur des gènes codant la leucocidine de Pantone Valentine : dépistage lors d'une épidémie en milieu scolaire. SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Ythier M, Boisset S, Vandenesch F, Moreillon P. *Caenorhabditis elegans* food-choice experiment : a rapid way to screen for *agr*-related *Staphylococcus aureus* toxins. SympoStaph. Lyon, 14-15 octobre 2008.

Antri K, Boubekrhi I, Bes M, Dauwalder O, Ramdani-Bougoussa N, Etienne J, Tazir M. Infection nosocomiales et communautaires à *Staphylococcus aureus* à la méticilline et analyse toxinique dans l'Algérois. SympoStaph, Lyon, 14-15 octobre 2008.

Deloufa A, Antri K, Salmi A, Yagoubi S, Arib S, Souici M, Ziane H, Djennane F, Ramdani-Bougoussa N, Lina G, Etienne J, Tazir M. Endocardite infectieuse nosocomiale fatale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et sécréteur de la leucocidine Panton-Valentine, à propos d'un cas. SympoStaph, Lyon, 14-15 octobre 2008.

Saleh-Mghir A, Dumitrescu O, Lina G, Valee C, Vandenesch F, Etienne J. Panton-Valentine leukocidin (PVL) role in the introduction, maintenance and local extension of community-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (CA-MRSA) rabbit osteomyelitis. 48th Annual ICAAC/IDSA Annual Meeting – Washington, DC – October 25-28, 2008.

Raulin O, Durand G, Croze M, Bes M, Meugnier H, Vandenesch F, Lina G, Laurent F, Etienne J. Caractérisation moléculaire des souches de *S. aureus* isolées de surinfections de varicelle en France. 28ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

Bergeron M, Bes M, Gardon C, Courtier C, Meugnier H, Benito Y, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Boisset S. Identification des staphylocoques par amplification : séquençage du gène *tuf*. 28ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

Meugnier H, Dauwalder O, Mounier M, Bes M, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Evaluation du kit EVIGENE® pour la mise en évidence des gènes *nucA*, *mecA*, *lukS-PV*/*lukF-PV*, *tst*, *vanAB* et *mupA* chez *Staphylococcus aureus*. 28ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4-5 décembre 2008.

8- Programme d'activité N+1 et N+2

Fournir les perspectives et grandes lignes du programme d'activité de l'année N+1 sur la base du présent rapport et du programme quadriennal proposé en 2005 pour les années 2006-2009.

Implantations de la technologie des puces à ADN ou microarray

Comme cela a été décrit précédemment, la caractérisation moléculaire du profil de virulence et de résistance des souches reçues au CNR s'appuie sur des techniques de PCR multiplex qui sont lourdes, fortement consommatrices de réactifs et forcément réductrices par rapport au potentiel de virulence et de résistance des staphylocoques. Aussi, nous mettons en place progressivement depuis début 2009 une approche par mini-puce à ADN ciblant 300 gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques de *S. aureus*. Outre les informations directes en terme de virulence et de résistance, la combinatoire obtenue sur ce grand nombre de cibles permet une approche épidémiologique et de génétique de population qui autorise par exemple le rattachement de la souche étudiée à un ST (*sequence type*) connu. A terme, l'ensemble des souches reçues au CNR devrait pouvoir bénéficier de cette technologie

Définition, épidémiologique et facteurs de risque associés aux pneumonies nécrosantes

Type de collaboration : CNR, Staphylococcus reference laboratory of the Health Protection Agency (Londres), INSERM-U550 (Faculté Necker).

Concernant la pneumonie nécrosante à *S. aureus* producteur de PVL nos objectifs sont triples : (i) surveiller l'incidence de la maladie, (ii) valider des critères de définition clinico-biologiques de la maladie, (iii) évaluer les facteurs de pronostic favorable en particulier thérapeutiques. Pour atteindre ces trois objectifs nous inciterons à la déclaration systématique des cas par nos collègues cliniciens et microbiologistes et nous mettons en place actuellement avec nos collègues britanniques un recueil informatisé (non nominatif) des données cliniques. Enfin, outre les aspects de microbiologie fondamentale évoqués au chapitre 6, nous développons actuellement en collaboration avec l'équipe de Laurent Abel et Jean-Laurent Casanova (Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, INSERM-U550, Faculté Necker) un travail visant à déterminer les facteurs génétiques de susceptibilité individuelle qui participeraient au caractère exacerbé –et en même temps exceptionnel- du tableau de pneumonie nécrosante que l'on connaît.

Etude de la sensibilité diminuée aux glycopeptides des souches de *S. aureus* isolées de patients mucoviscidosiques

Type de collaboration : CNR, services de pédiatrie.

Concernant la sensibilité diminuée aux glycopeptides, une étude sera menée à partir de la collection de souches de patients mucoviscidosiques de l'hôpital de l'hôpital Femmes-Mères-Enfants de Lyon pour déterminer si l'exposition aux carbapénèmes (antibiotiques largement utilisés chez ces patients à des fins anti-*Pseudomonas*) contribue à l'émergence de souches GISA.

Mise en place d'un laboratoire sentinelle "SARM" Europe Afrique pour l'étude de la capacité du test GeneOhm MRSA Becton Dickinson à détecter l'ensemble des clones circulants en Europe et en Afrique

Type de collaboration : CNR – Becton Dickinson Diagnostic GeneOhm (Canada)

Ce travail prospectif et rétrospectif réalisé sur un panel de 2000 souches a pour but d'identifier des clones SARM variant présentant des cassettes *SSCmec* atypiques non détectés **par les tests moléculaires rapides de criblage des porteurs de SARM** pouvant être à l'origine d'une émergence et d'une dissémination de ce fait méconnues comme cela a été rapporté récemment au Danemark.

Caractérisation moléculaire des clones et des déterminants génétiques de virulence et de résistance aux antibiotiques des clones de SARM circulants en Europe

Type de collaboration : CNR – Membres du réseau EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System)

Un panel de 250 souches représentatives des grands clones de SARM circulants en Europe et collectés dans le cadre du Projet EARSS Staph 2006-2007 sera caractérisé au niveau moléculaire en utilisant les puces à ADN décrites précédemment dans ce document. L'objectif est d'identifier les clones circulants ainsi que la nature et la variabilité des déterminants génétiques de virulence et de résistance aux antibiotiques.

Protocole EARSS 2009-2010 : Identification et suivi longitudinal des clones de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections invasives en Europe

Type de collaboration : CNR – EARSS – Laboratoires correspondants du CNR - INVS

L'objectif de cette étude prospective réalisé de façon identique (protocole et technique de caractérisation (*spa*-typing)) et simultanée (1er Septembre 2009 – 28 Février 2010) dans 26 pays européens sera

- au niveau européen de caractériser les principaux clones européens de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections invasives,
- au niveau national de connaître le profil toxinique de ces mêmes clones.

Le protocole reprenant exactement celui utilisé en 2006 dans les mêmes laboratoires, les données permettront de connaître l'évolution longitudinale temporelle et géographique des clones de *S. aureus* responsables d'infections invasives en Europe.

Projet ECO-SARM : Emergence du SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline) chez l'animal : Ecologie et potentiel de transmission à l'homme

Type de collaboration : CNR – AFSSA – ENVA (Ecole Nationale vétérinaire Maison-Alfort) - IFIP (Institut Français des industries du Porc)

L'objectif de ce travail sera d'identifier les réservoirs des souches de SARM chez différentes espèces animales et le long de la chaîne de préparation des aliments d'origine animale depuis l'élevage en passant par les abattoirs jusqu'au produit final proposé à la vente au grand public. Nous chercherons à comprendre et identifier les mécanismes liés à l'émergence de ces souches de SARM ainsi qu'à analyser et évaluer le risque sanitaire lié à la transmission et la colonisation par ces souches des professionnels et des consommateurs.

Dans ce cadre, le CNR des staphylocoques sera chargé de la caractérisation moléculaire des souches (typage et identification des facteurs de virulence), l'étude de leur niveau de résistance aux antibiotiques. Le CNR coordonnera une étude pilote afin d'étudier le niveau et le risque de transmission professionnelle de ces souches animales chez les personnels des abattoirs.
