

# **Centre National de Référence des Staphylocoques**

## **Rapport d'activités annuel 2007**

**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 événement 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 2007 a été marquée par :

- la caractérisation de l'ensemble des clones de *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) sécrétant de la leucocidine de Pantone Valentine (PVL) et responsables d'infections communautaires,
- la reconnaissance des facteurs de risque des pneumonies nécrosantes dues à des souches de *S. aureus* PVL positives. Il est apparu que la survenue d'hémoptysie et de la présence d'une leucopénie étaient des facteurs prédictifs de mortalité. Ces observations découlent de la collecte des informations cliniques auprès des cliniciens. Elles permettent de renforcer les thérapeutiques de réanimation chez les enfants ayant une pneumonie nécrosante et ces deux facteurs péjoratifs. On observe par ailleurs en 2007 une augmentation du nombre de cas de pneumonie nécrosante notifiés au CNR.
- la description de la gravité des infections ostéo-articulaires de nouveau dues aux souches de *S. aureus* PVL positives. Une approche thérapeutique pragmatique a pu ainsi être définie pour tout cas due à de telles souches,
- la fréquence de la détection de la PVL et des exfoliatines dans les souches de furoncles et d'impétigo d'après une enquête réalisée chez les dermatologues de ville,
- la caractérisation des toxines superantigéniques ayant un rôle dans le choc toxique staphylococcique. Ainsi parmi les très nombreuses toxines superantigéniques, seules la toxine du choc toxique staphylococcique et l'entérotoxine B ont pu être directement associées à la survenue de choc toxique. Lors du choc septique, le rôle d'aucune toxine superantigénique n'a été mis en évidence.
- la description de la gravité des chocs toxiques non menstruels avec une mortalité de 30% s'opposant à l'absence de décès chez les patientes ayant eu un choc toxique menstruel. Le côté très faiblement suppuratif des plaies associées aux chocs toxiques non menstruels a été souligné, ainsi que la nécessité de faire pratiquer une incision drainage de la plaie pour limiter la diffusion systémique des toxines incriminées.

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

<b>Personnel consacrant une part de leur activité au CNR</b>	
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
<b>François Vandenesch – directeur</b> 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 : <a href="mailto:denesch@univ-lyon1.fr">denesch@univ-lyon1.fr</a>
<b>Jérôme Etienne – co-directeur</b> 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 : <a href="mailto:jetienne@univ-lyon1.fr">jetienne@univ-lyon1.fr</a>
<b>Gérard Lina (virulence)</b> 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 : <a href="mailto:gerard.lina@chu-lyon.fr">gerard.lina@chu-lyon.fr</a>
<b>Yves Gillet (infectiologie pédiatrique)</b> Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	Tél : 04 27 85 56 07 E-mail : <a href="mailto:yves.gillet@chu-lyon.fr">yves.gillet@chu-lyon.fr</a>
<b>Marie-Elisabeth Reverdy (antibiotique)</b> Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 66 E-mail : <a href="mailto:marie-elisabeth.reverdy@chu-lyon.fr">marie-elisabeth.reverdy@chu-lyon.fr</a>
<b>Michèle Bes (identification)</b> Biologiste contractuel - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 62 E-mail : <a href="mailto:michele.bes@chu-lyon.fr">michele.bes@chu-lyon.fr</a>
<b>Anne Tristan</b> Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Maître de Conférence- Faculté de Médecine Laennec	Tél : 04 72 35 76 39 E-mail : <a href="mailto:anne.tristan@chu-lyon.fr">anne.tristan@chu-lyon.fr</a>
<b>Muriel Croze</b> Praticien Attaché – Centre de Biologie Est	Tél. : 04 72 12 96 68 E-mail : <a href="mailto:muriel.croze@chu-lyon.fr">muriel.croze@chu-lyon.fr</a>
<b>Olivier Dauwalder</b> Assistant hospitalo-universitaire – Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 69 E-mail : <a href="mailto:olivier.dauwalder@chu-lyon.fr">olivier.dauwalder@chu-lyon.fr</a>
<b>Oana Dumitrescu</b> Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 25 E-mail : <a href="mailto:oana.dumitrescu@chu-lyon.fr">oana.dumitrescu@chu-lyon.fr</a>
<b>Hélène Meugnier (lien de clonalité)</b> Ingénieur - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 95 80 E-mail : <a href="mailto:helene.meugnier@chu-lyon.fr">helene.meugnier@chu-lyon.fr</a>
<b>Sandrine Boisset (webmaster)</b> Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 64 E-mail : <a href="mailto:sandrine.boisset@univ-lyon1.fr">sandrine.boisset@univ-lyon1.fr</a>

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

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 bibliothèque, 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 m<sup>2</sup>) dispose sur 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 m<sup>2</sup> 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. Elles sont identifiées :

- sur des caractères morphologiques des colonies (taille et aspect des colonies, hémolyse, pigmentation, etc),
- sur des caractères biochimiques (catalase, coagulase, résistance à la bacitracine, résistance au composé vibriostatique O/129...) et à l'aide de la galerie ID 32 Staph (bioMérieux<sup>®</sup>),
- sur des caractères génotypiques par PCR de la région intergénique ribosomale 16S – 23S (ITS PCR).

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, B, D,
- les toxines synergohyménotropes : lukM, et la leucocidine de Pantone Valentine (PVL),
- le facteur EDIN (Epidermal Cell Differentiation Inhibitor) (A-C),
- l'hémolysine bêta.

De plus, nous identifions l'allèle du gène régulateur *agr* « *accessory gene regulator* » et détectons systématiquement le gène de résistance à la pénicilline (*mecA*).

NB :

\*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 pénicilline.

#### 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 *meaA*. Le gène de résistance à la méticilline (*meaA*) 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-cervele.

En cas de criblage positif, une analyse de population est réalisée avec et sans induction sur gélose cœur-cervele 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 *meaA* est présent sur une cassette dénommée *SCCmec* pour "staphylococcal chromosomal cassette" dont la taille est variable. Il existe 5 grands types de cassette, *SCCmec* I-V. 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 Vbeta 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 l'année 2007 : 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 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 C-SARM (*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 C-MRSA 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'ors et déjà nous confirmons la présence de la PVL dans les échantillons biologiques de patients atteints d'infection par des souche contenant les gènes de la PVL. Le test est utilisé actuellement à visée recherche en attendant l'utilisation systématique sur de 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 C-SARM (*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 biologique étant à l'étude.

## **Application d'une technique de séquençage nucléotidique pour caractériser la cassette SCC*mec*.**

La cassette SCC (en anglais "staphylococcal cassette chromosome") est un élément génomique très répandu parmi les staphylocoques commensaux qui sert de machinerie pour capturer des ADN étrangers et pour survivre dans un environnement défavorable. La cassette SCC*mec* (en anglais, "staphylococcal cassette chromosome *mec*") contient le gène *mec* de résistance à la pénicilline. Le séquençage nucléotidique complet de nombreuses cassettes SCC*mec* a révélé de nombreuses différences structurales qui peuvent être utilisées en épidémiologie pour discriminer les souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline ou définir les clones, en association avec les autres marqueurs épidémiologiques. Notre laboratoire a souhaité utiliser une méthode internationale de classification des cassettes SCC*mec* ([www.staphylococcus.net](http://www.staphylococcus.net)) en caractérisant par séquence nucléotidique deux parties discriminantes de la cassette :

- le complexe *mec* qui comprend les gènes d'expression de la résistance à la pénicilline et de deux protéines régulatrices. Ces deux derniers gènes sont parfois délétés ou tronqués. Ainsi on peut reconnaître quatre classes de complexe *mec* (A, B, C et D),
- le complexe *ccr* qui comprend une à deux recombinaisons responsables de la mobilité de la cassette. On reconnaît quatre types de combinaison pour les recombinaisons *ccrA* et *ccrB* et un type pour la recombinaison *ccrC*.

La caractérisation de ces deux complexes (*mec* et *ccr*) permet d'attribuer à la cassette une dénomination internationale.

Ainsi le CNR substitue la caractérisation de la cassette SCC*mec* par PCR comme il le faisait jusqu'à présent au profit d'une technique plus précise basée sur le séquençage nucléotidique comme décrit ci-dessus.

### **2-1-2- Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles**

L'antibiotype, la toxinotypie, le typage *agr*, la caractérisation du type de cassette SCC*mec*, le *spa* typing, le MLST et l'analyse des profils de restriction en champs 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 pénicilline SARM diffusant actuellement en milieu hospitalier (H-SARM) et dans la communauté (C-SARM) (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 2007**

Au cours de l'année 2007, le CNR a reçu 1 400 souches de staphylocoques pour expertise. Mille souches provenaient d'une centaine de villes françaises (environ 120 hôpitaux, 8 LAM) et 400 souches provenaient de 11 pays étrangers ou territoires d'outre-mer (Guyane, Nouvelle Calédonie, Tahiti, Allemagne, Hollande, Royaume Uni, Suisse, Turquie, Algérie, Tunisie, Sénégal).

Le CNR a distribué 158 souches de ses collections, 52 en France et 106 à l'étranger (Allemagne, Belgique, Corée, Danemark, Ecosse, Espagne, Inde, Irlande, Portugal, Sénégal, Slovénie, Suisse, Turquie, USA).

## **3- Activités de surveillance :**

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

Le nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines déclarées en France est en faible diminution avec 80 cas en 2007 pour 95 cas en 2006 (Tableau 1).

**Tableau 1.** Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines recensées par le CNR des Staphylocoques de Lyon entre 1994 et 2007 en France.

Année	Syndrome d'exfoliation généralisée	Impétigo bulleux	Choc toxique staphylococcique	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
<b>2007</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>27</b>	<b>19</b>	<b>80</b>
Total	177	151	298	189	1002

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 toxiniques :

**Chocs toxiques staphylococciques (TSS) et formes incomplètes.**

- 27 cas de TSS ont été rapportés, dont 11 cas de TSS menstruels confirmant ainsi la tendance en augmentation observée en 2006 où 12 cas avaient été recensé par rapport aux 11 cas recensés entre 2002 et 2004. L'âge des patientes s'étend de 16 à 43 ans avec une médiane de 19 ans. Les cas ne semblent pas reliés à l'utilisation d'une marque particulière de protection périodique. 9 souches possédaient le gène codant la TSST-1 et 2 possédaient le gène codant SEB. Aucune des souches responsables des cas menstruelles n'était résistante à la méticilline.

Dans les 16 autres cas, 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 patientes s'étend de 3 à 75 ans avec une moyenne de 39 ans tandis que le sexe ratio de ces patients est 11/16. Dix souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 6 autres souches possédaient au moins un gène codant pour une entérotoxine. Ces souches étaient le plus souvent sensibles à la méticilline avec uniquement 3 souches résistantes aux pénicillines M.

- 19 cas de scarlatine staphylococcique (SS) ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 2 à 61 ans avec une moyenne de 13 ans tandis que le sexe ratio est de 9/19. Ces manifestations sont survenues au décours d'infections diverses (infection cutanée, pneumonie, ostéite, méningite), communautaires ou nosocomiales. Les autres cas sont survenus à la suite d'infections suppuratives. Douze souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 7 autres possédaient au moins un gène codant une entérotoxine. Deux souches possédaient le gène *meaA* codant la résistance à la méticilline dont les caractéristiques génétiques correspondent au clone MRSA agr 2, possédant les gènes codant la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) ainsi que les entérotoxines C, D, L, R, M et O (ces deux dernières témoignant la présence du *locus egc*). Toutes ces caractéristiques sont celles d'un nouveau clone émergent 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.

### **Intoxications alimentaires individuelles et collectives.**

Le CNR a été contacté pour deux cas d'intoxication alimentaire individuelle et deux cas groupés de possible intoxication alimentaire collective en 2007. La recherche des entérotoxines dans les prélèvements (1 liquide gastrique et 3 vomis) étant négative, nous n'avons pas pu impliquer un staphylocoque doré dans ces intoxications alimentaires.

### **Entérocolites à *S. aureus*.**

Quatre cas d'entérocolites staphylococciques ont été signalés au CNR en 2007. Trois souches étaient isolées d'enfants prématurés hospitalisés dans le même service et ayant présenté une entérocolite nécrosante ; les souches présentaient le même profil toxinique possédant les gènes codant les entérotoxines M et O (celles-ci signant la présence du locus *egc*). Le quatrième patient âgé de 40 avait présenté une entérocolite nécrosante mais la souche incriminée ne possédait pas les gènes codant les entérotoxines

### **Syndromes d'exfoliation staphylococcique.**

Le CNR a analysé les souches provenant de 34 cas de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en 18 cas d'exfoliation généralisée (25 en 2002, 27 en 2003, 22 en 2004, 32 en 2006) et 16 cas d'impétigo bulleux (19 en 2002, 18 en 2003, 8 en 2004, 20 en 2006). Aucune épidémie survenant dans une maternité n'a été déclarée cette année.

L'âge des patientes ayant présenté une exfoliation généralisée staphylococcique s'étend de quelques jours à 1 à 4 ans avec une moyenne de 1 an et demi tandis que le sexe ratio de ces patients est 6/18. Dix souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 5 souches l'ETA seule et 3 souches l'ETB seule. Une seule de ces souches était résistante à la méticilline. L'âge des patientes ayant présenté un impétigo bulleux s'étend de quelques jours à 5 ans avec une moyenne de 2 an et demi tandis que le sexe ratio de ces patients est 7/16. Huit souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 5 souches l'ETA seule et 3 souches l'ETB seule. Aucune des ces souches n'était résistante à la méticilline.

### **Pneumonies staphylococciques nécrosantes.**

Dix-neuf nouveaux cas de pneumonie nécrosante PVL+ ont été diagnostiqués en 2007, les patients étaient âgés de 1 à 56 ans avec une médiane d'âge de 26 ans, la mortalité étant de 42%. Neuf cas étaient dus à une souche résistante à la méticilline, dont 7 souches appartenaient au groupe *agr3* avec un profil toxinique et de résistance aux antibiotiques évocateur du clone circulant en Europe et Afrique du Nord (ST80) ; une souche appartenait au groupe *agr1* ayant un profil toxinique évocateur du clone CA-MRSA USA300 ; et une souche importée d'Afrique appartenait au groupe *agr2*.

### **Ostéites et infections ostéo-articulaires**

Nous avons reçu pour expertise 15 souches de *S.aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéoarticulaire, les patients étant âgés de 1 à 58 ans (moyenne d'âge 23 ans) avec un *sex ratio* de 10/15. Six souches portaient le gène codant la leucocidine de Panton Valentine, 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 5 cas il s'agissait de souches produisant la TSST1 probablement responsable 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-six cas de furonculose chronique ou de cellulites extensives (66 en 2002, 55 en 2003, 48 en 2004, 45 en 2006) ont été rapportés au CNR.

Tous les cas étaient communautaires et se répartissent en 4 épidémies intra-familiales et des cas sporadiques. L'âge des patientes s'étale de 1 mois à 70 ans avec une moyenne de 28 ans et demi tandis que le sexe ratio de ces patients est 21/36.

Sur les 36 souches, 26 étaient productrices de leucocidine de Panton Valentine, dont 11 étaient résistantes à la méticilline. Parmi ces 11 souches 9 correspondent au clone européen décrit par le CNR (*agr3*, PVL+ *mecA*+) de CA-MRSA, 1 au clone de « CA-MRSA » décrits aux Etats-Unis (*agr1*, PVL+, *mecA*+) et 1 au clone isolé chez des militaires français de retour de Côte d'Ivoire et présentant des pathologies cutanées (*agr3*, PVL+, SEA , SEH, SEK, SEQ, *mecA*+).

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

Soixante neuf souches ont été envoyées de laboratoires extérieurs pour expertise (Tableau 2). Il s'agit de 60 souches de *S. aureus* et de 9 souches de staphylocoques coagulase négative.

**Tableau 2.** Origine géographique et nombre de souches de staphylocoques adressés à Lyon en 2007 pour expertises concernant la résistance aux antibiotiques.

Provenance	Nb de Souches	S. aureus	SCN
Angoulême	2	2	
Annecy	2	2	
Arpajon	3	3	
Antibes	4	4	
Aulnay sous bois	1	1	
Bourg en bresse	1	1	
Bourgoin	2	1	1
Cahors	2	2	
Colmarl	2	2	
Gap	3	3	
Giens	2	2	
Grenoble	1	1	
Lagny	1	1	
Les Vans	1	1	
Lyon Autres Hôpitaux	9	7	2
Martigues	4	1	3
Meaux	4	4	
Moirans	1	1	
Montaigu	1	1	
Montceau les mines	1	1	
Montpellier	13	13	
Moulin	1	1	
Niort	1	1	
Roanne	2		2
Romans	1		1
Selestat	1	1	
Toulon	1	1	
Valence	1	1	
Vienne	1	1	
Villiers St Denis	2	2	
<b>TOTAL</b>	<b>69</b>	<b>60</b>	<b>9</b>



Le gène de résistance à la méticilline a été recherché par PCR pour 46 de ces souches : 41 *S. aureus* et 5 staphylocoques coagulase négative.

Un résultat a été rendu positif dans 19 cas (dont 2 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 27 cas (3 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 céfoxitine était compris entre 24 et 26 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 associés au CNR, 43 demandes de recherche du gène *mecA* de résistance à la méticilline ont été faites pour des phénotypes associés inhabituels : 21 se sont avérées positives et 22 négatives.

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

L'étude a été demandée pour 21 souches de laboratoires extérieurs, qui avaient un criblage positif,

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, 14 souches ont été confirmées de sensibilité diminuée aux glycopeptides, il s'agissait principalement de souches hétérogènes, inductibles en présence de glycopeptides (souches hGISA), 7 souches étaient sensibles aux glycopeptides.

Etudes de CMI. Les CMI de la teicoplanine ont été demandées pour 4 souches de staphylocoques à coagulase négative.

Une souche de *S. aureus* a été envoyée pour confirmation d'antibiogramme

Deux souches de *S. aureus* a été envoyée pour recherche de la cassette *SCCmec* en complément de la recherche du gène *mecA*.

#### Protocoles.

A la demande des Laboratoires Novartis, Le CNR a participé à une étude européenne de mesure l'activité in vitro de la daptomycine en comparaison à l'activité de la vancomycine et de la teicoplanine sur 40 souches de cocci Gram positif, par ETest.

A la demande de JMI Laboratories, Le CNR a participé à une étude européenne (DECIDE) de mesure l'activité in vitro de la dalbavancine et de la vancomycine en comparaison avec 7 autres antibiotiques, sur 75 souches de cocci Gram positif, par ETest.

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

Au cours de l'année 2007 le CNR a investigué 13 cas groupés d'infection ou épidémies. L'analyse des profils de restriction de l'ADN des souches après électrophorèse en champ pulsé associés ou non au toxinotype, au type d'allèle *agr* et à l'antibiogramme a permis de mettre d'évaluer le lien de clonalité des souches isolées dans les contextes suivants :

**Pau** : 2 *Staphylococcus aureus* isolés d'hémocultures prélevées à 18 mois d'intervalle chez un même patient, les deux souches appartenaient à des pulsotypes différents.

**Tourcoing** : 2 *Staphylococcus aureus* isolés de deux membres d'une même famille appartenaient au même pulsotype.

**Bobigny** : 6 souches isolées dans le cadre d'un accident transfusionnel concernant un patient de 52 ans : les 5 souches isolées des hémocultures, du concentré plaquettaire transfusé et du nez du patient appartenaient au même pulsotype, tandis qu'une souche isolées précédemment chez le même patient dans un contexte d'arthrite était différente.

**Orléans** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'une patiente âgée de 50 ans, (spondylodiscite L1 en juillet 2006 et ponction articulaire de hanche droite en mars 2007) : les deux souches appartenaient au même pulsotypes et présentaient le même profil protéiques.

**Lyon** : 7 *Staphylococcus aureus* isolées dans un contexte d'incident transfusionnel : les souches isolées de la poche de sang transfusé et des hémocultures du patient étaient

identiques, les souches isolées dans le nez du donneur étaient identiques entre elles mais différentes des souches du patient.

**Paris** : 3 souches de *Staphylococcus aureus* isolée d'un prélèvement per-opératoire dans le cadre d'une arthrite de genou sur prothèse, chez un patient âgé de 56 ans. Ce patient a déjà présenté 2 infections sur PTG à *S. aureus* (mai 2005 et mars 2006): les 3 souches étaient différentes.

**Briançon** : 3 souches de *Staphylococcus aureus* isolées des urines de 2 patients et de crachats d'une autre patiente dont les pulsotypes étaient proches (une différence) ou identiques à celui du clone SARM décrit à Lyon.

**Bayonne** : 3 souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez 3 enfants prématurés ayant présenté une entérocolite nécrisante : les profils toxiques étaient identiques mais les pulsotypes étaient identiques seulement pour deux souches des trois analysées.

**Lyon** (Hôpital Desgenettes) : 5 souches *Staphylococcus aureus* isolées chez 4 patients : 4 souches de même pulsotype clone Lyon (transmission croisée possible) et une souche dont le pulsotype était différent des autres (3 bandes) qui infirme une possible transmission croisée.

**Bourg en Bresse** : 4 souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'hémocultures de patients hospitalisés en service d'hématologie : toutes étaient différentes.

**Neuilly sur Seine** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'une suppuration profonde du rachis chez un patient de 80 ans et d'une cicatrice chez un autre patient de 69 ans. Ces patients ont présenté des infections postopératoires retardées avec deux souches différentes car appartenant à deux groupes *agr* différents.

**Paris** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'une collection au niveau du mollet droit et d'un écouvillonnage nasal chez un patient âgé de 44 ans : les souches étaient probablement identiques appartenant au même groupe *agr* et présentant le même profil toxique.

**Elbeuf** : 6 *Staphylococcus aureus* isolées chez 4 patients hospitalisés à l'hôpital d'Elbeuf en novembre et décembre 2007 : une souche isolée du tissu péri-tibial droit d'un patient de 49 ans, une souche isolée de la cheville droite d'un patient de 26 ans, deux souches isolées de l'hémoculture et d'une cicatrice au niveau du poignet droit d'un patient de 79 ans, deux souches isolées en post-opératoire d'un hallux valgus du pied droit et au niveau du pied droit chez un patient de 55 ans : les pulsotypes étaient différents entre les malades mais identiques pour les souches isolées d'un même malade.

### **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...)

**Protocole EARSS** : Protocole d'identification des clones de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections invasives en Europe.

Cette étude s'insère dans le cadre de surveillance européenne EARSS, qui associe, depuis 2001, pour les SARM, les laboratoires de l'ONERBA, l'InVS et le Centre National de Référence (CNR) des Staphylocoques. Vingt deux laboratoires (Centres Hospitaliers) répartis sur les différentes régions de France ont été sélectionnés de manière aléatoire par l'InVS. L'étude est limitée au niveau européen à 200 souches par pays.

Il était demandé aux laboratoires de sélectionner et d'envoyer au CNR 5 souches consécutives de *S. aureus* sensibles à la méticilline et 5 souches consécutives de *S. aureus* résistantes à la méticilline, isolées d'infections invasives entre le 1<sup>er</sup> septembre 2006 et le 28 février 2007.

Les analyses effectuées par le CNR sur les souches étaient :

- le typage par séquençage du gène de la protéine A (*spa* typing). Les résultats du typage de la protéine A seront centralisés quant à eux, au niveau européen (EARSS / SeqNet.org).
- le profil toxinique,
- la détection de la présence du gène *mecA*,
- le fond génétique de la souche (Type *agr*).

Le CNR a participé à Bilthoven en 2007 à l'analyse européenne des résultats. Il est apparu que les clones dominants hospitaliers français de SARM sont propres à la France et ne sont pas retrouvés dans les pays limitrophes à la France. Une description précise des clones français de SARM hospitaliers sera effectuée en 2009.

**Protocole Alger** : Une collaboration importante a été établie avec les microbiologistes de l'hôpital Mustapha Pacha d'Alger (Prof Mohamed Tazir et Prof Nadja Ramdani). Plus de deux cent souches de *S. aureus* d'infections communautaires et nosocomiales ont été collectées en 2007 ainsi que les caractéristiques cliniques des infections associées. Les profils toxiniques des souches ont été déterminés. Les premières analyses montrent que 49% des infections communautaires sont dues à des souches de SARM communautaires PVL positifs. Cette situation épidémiologique est donc proche de celle décrite actuellement aux USA et

explique pourquoi les souches de SARM communautaires sont retrouvées pour partie en France chez des patients d'origine algérienne. Le taux de SARM parmi les infections hospitalières est de 53% mais parmi ces souches de SARM, 70% correspondent au clone communautaire PVL positif. Ce qui veut dire que le clone communautaire PVL positif a envahi l'hôpital et est maintenant responsable de véritables infections nosocomiales. Si la dénominateur est la totalité des infections nosocomiales, l'incidence des infections à SARM PVL positifs est de 37%, ce qui veut dire que les anciens clones hospitaliers ne sont plus isolés que dans 16% des cas. Cette situation est de nouveau identique à celle des USA, où le clone majoritaire de SARM PVL positifs dénommé USA300 est largement responsable d'infections nosocomiales. De plus nous sommes en train de démontrer que le clone algérien de SARM PVL+ responsable d'infections nosocomiales est multi-résistant aux antibiotiques dont les fluoroquinolones.

Cette situation propre à l'Algérie se retrouve également en Grèce et nous incite à mettre en place une surveillance active du taux d'infection à SARM PVL positifs parmi les infections communautaires.

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

#### **Détermination du taux d'infection à SARM PVL positifs parmi les infections communautaires.**

Il est important de surveiller en France le taux de SARM communautaires PVL positifs. Plusieurs approches méthodologiques ont dans le passé été utilisées, comme la mesure de ce taux à partir de prélèvements réalisés chez les dermatologues de ville (Dufour 2006) : cette approche avait montré un faible recueil de souches de SARM PVL positifs (environ 1%). L'étude Labville réalisée avec l'InVS avait collecté des souches de SARM des laboratoires de ville et avait surtout permis l'identification de souches d'origine hospitalière responsables d'infections chez des personnes âgées, ayant des facteurs de risque pour être colonisées par une souche de SARM d'origine hospitalière.

Pour suivre l'évolution du taux de SARM communautaires PVL positifs, la meilleure approche nous apparaît maintenant comme celle comptabilisant parmi les infections communautaires, les abcès suppurés à *S. aureus* des services de porte des hôpitaux. Ainsi nous avons mis en place une telle surveillance avec le service des urgences chirurgicales de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon. Les souches de *S. aureus* de la totalité des abcès drainés en urgence sont caractérisées. Ainsi en 2007, le taux de SARM PVL positifs parmi les abcès communautaires a été de 3%. Il conviendrait de mettre en place en France d'autres observatoires de ce type pour avoir une vision plus générale de la situation actuelle.

#### **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 :**

- Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires,
- Ont été accueillis les stagiaires suivants : Meriem Zribi (hôpital La Rabta, Tunis) : 1 mois (janvier 2007), Kenza Antri et Ilhem Boubekri (Hôpital M Bacha, Alger) : du 3/09 au 3/10/ 2007, Rémi Duclaux Loras (MSBM), Salima Ben Ayed (Faculté de Médecine de Tunis) : 1/09 au 24/12/2007, Ivana Cirkovic et Tanja Tošic (Belgrade) : une semaine en Novembre 2007

- Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Le CNR a émis un rapport sur la caractérisation du clone de SARM de porc ST398 (rédacteur Rémi Duclaux Loras), pour permettre la reconnaissance de ce clone au cas où des infections humaines surviendraient. Dans ce rapport des souches porcines originaires de Hollande, Danemark et France ont été comparées : elles ont toutes été identifiées comme appartenant au clone SARM ST398.

Le CNR a également fait la synthèse de l'ensemble des données internationales sur les méthodes de prévention de la transmission des SARM communautaires (rédacteur Caroline Dumortier). Ce dernier rapport a été transmis à l'InVS.

- Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :
  - o Rétro-information aux partenaires
  - o 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'envois, les fiches à télécharger, et les personnes à contacter.

- Activités de conseil 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 délais.
- 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.

## **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 transitionnel 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 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*, 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), par l'identification des différents domaines régulateurs de cette molécule ainsi que des co-facteurs protéiques (Hfq, ribonucléase,..) qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes cibles (gènes de virulence et gènes métaboliques).

Ainsi, les principaux **faits marquants** de notre recherche au cours de l'année **2007** 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 Valentine,<sup>1</sup> et à montrer que ce phénomène se produisait au niveau mondial avec des clones différents apparaissant comme spécifiques de continent<sup>2</sup>. 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 prévalent aujourd'hui<sup>3</sup>. Néanmoins, toutes les études actuelles illustrent le formidable « succès épidémique » des souches issues

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 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.



de la lignée USA300 et une étude récente<sup>4</sup> corroborée par notre équipe<sup>5</sup> révèle que la PVL des souches USA300 est porteuse d'une mutation H176R qui pourrait avoir des conséquences fonctionnelles sur la virulence. Notre travail actuel est centré sur la question du « succès évolutif » de certains clones de CA-MRSA et nous tentons de mettre en évidence une différence fonctionnelle d'activité entre les différents variants de la PVL.

**Clinique et physiopathologie des pneumonies nécrosantes à *S.aureus* producteurs de la leucocidine de Panton Valentine.** Notre travail publié en 2002<sup>6</sup> 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 associés au décès<sup>7</sup>. Ces deux facteurs sont cohérents par rapport au rôle proposé de la PVL qui d'une part produit des lésions nécrotiques au niveau des épithélia (à l'origine des hémoptysies), d'autre part induit une mort des polynucléaires par un effet pro-apoptotique et nécrotique dose dépendant<sup>8</sup>. 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 et, par ailleurs, mis en évidence le fait que la PVL induit une dysrégulation d'expression de plusieurs gènes de régulation et de virulence de *S. aureus*. Parmi ceux-ci, la protéine A, facteur de virulence reconnu dans la pathogénie des pneumonies staphylococciques, voit son expression augmentée d'un facteur 10 en présence du gène de la PVL. La contribution de la surexpression de la protéine A à la

---

<sup>4</sup> 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.

<sup>5</sup> 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.

<sup>6</sup> 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.

<sup>7</sup> 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.

<sup>8</sup> 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.

pathogénie de la pneumonie nécrosante a été confirmée expérimentalement dans le modèle souris à l'aide de souches isogéniques pour la protéine A<sup>9</sup>. Par ailleurs 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-lactamines<sup>10</sup>. 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 linézolide<sup>11</sup>. Notre projet actuel vise à décrypter les mécanismes à l'origine de cette dysrégulation induite par la PVL (ARNm ou protéine) et ceux à l'origine de la dysrégulation de la PVL par les antibiotiques.

### **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 primitives et les infections ostéo-articulaires peuvent être associées à des souches productrices de PVL. Dans une première étude effectuée en association avec des dermatologues, nous avons tenté de corrélérer les tableaux cliniques dermatologiques avec la présence de *S. aureus* et la production de toxines (exfoliatines, PVL, etc.). Les résultats obtenus à partir d'une série de 64 patients présentant des lésions à type de furoncle ou d'impétigo et dont la culture était positive, confirment la forte association entre furunculose chronique et PVL<sup>12</sup>. En revanche la PVL n'est pas associée aux cas de furoncles simplex ni à l'impétigo, ce dernier étant associé à la production d'exfoliatine. Cette étude descriptive permet de poser la question essentielle de la contribution de la PVL à la constitution des furoncles.

Dans une deuxième étude<sup>13</sup>, la question investiguée avec les orthopédistes pédiatriques était d'identifier les caractéristiques clinico-biologiques des infections ostéo-articulaires (IOA) de l'enfant dues à des souches productrices de PVL. La comparaison d'une série de 14 cas d'IOA

---

<sup>9</sup> 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.

<sup>10</sup> 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.

<sup>11</sup> 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.

<sup>12</sup> 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.

<sup>13</sup> Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, Floret D, Etienne J. Pediatric bone and joint infections caused by Pantan-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Nov;26(11):1042-8.

PVL+ à un groupe de 17 cas d'IOA PVL- a permis de montrer que les IOA dues aux souches PVL+ sont plus souvent associées à un sepsis sévère, ont une CRP à l'admission plus élevée (202.6 mg/L versus 83 mg/L dans le groupe PVL-;  $P = 0.001$ ), ont des lésions plus extensives détectée par IRM ou tomodensitométrie, ont une durée d'hospitalisation plus longue (45 jours versus 13 dans le groupe PVL- ;  $p < 0.001$ ), un traitement antibiotique parentéral prolongé (48 jours versus 11.3) et requièrent plus souvent un drainage chirurgical. Ces observations suggèrent que la PVL pourrait être un facteur de virulence majeur dans l'infection ostéo-articulaire, en particulier chez l'enfant. Pour le démontrer, nous testons actuellement en collaboration avec le Dr Anne-Claude Crémieux, la virulence de souches isogéniques pour la PVL dans un modèle d'infection ostéo-articulaire chez le lapin.

### **Clinique et physiopathologie des maladies à superantigènes staphylococciques.**

Il est établi que le choc toxique staphylococcique peut 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 dues à différentes entérotoxines, aucune n'étant significativement plus fréquente que dans les cas non menstruels. 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 superantigénique (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 SAG<sup>14</sup>, 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

---

<sup>14</sup> 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

du répertoire Vbeta des lymphocytes T des patients dont l'expansion témoigne d'un contact spécifique avec un SAG. Ainsi, l'analyse prospective du répertoire Vbeta par cytométrie en flux (marquage par anticorps anti-CD3 et 24 anticorps anti-Vbeta) 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 Vbeta 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 Vbeta des SAG impliqués étaient les suivantes : TSST-1, Vbeta 2 ; SEA, Vbeta 9, 22 ; SEB: Vbeta 3, 14, 17; SED: Vbeta 1, 8; *egc*: Vbeta 5.3, 7.1, 9, 23; et SEK: Vbeta 5.1. Les signatures Vbeta de TSST-1 ou de SEB étaient retrouvées chez les patients ayant un choc toxique ; à l'inverse, aucune signature Vbeta n'a été retrouvée chez les patients ayant un choc septique alors que les isolats produisaient un ou plusieurs SAG *in vitro*<sup>15</sup>. Ainsi, la recherche d'une signature Vbeta 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 toxique<sup>16</sup> ; 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 inhibiteurs<sup>17</sup>. A ce jour, deux cibles directes de l'ARNIII sont connues, l'ARNm hla (codant l'hémolysine alpha) et l'ARNm spa (codant la

---

<sup>15</sup> Ferry T, Thomas D, Perpoint T, Lina G, Monneret G, Mohammedi I, Chidiac C, Peyramond D, Vandenesch F, Etienne J. Analysis of superantigenic toxin Vbeta T-cell signatures produced during cases of staphylococcal toxic shock syndrome and septic shock. Clin Microbiol Infect. 2008 Mar 27;

<sup>16</sup> 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 Vbeta signature in peripheral blood of a 12-year old boy. Pediatr Infect Dis J. 2008 Feb 7;

<sup>17</sup> 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

protéine A) dont nous avons identifié le mécanisme de régulation<sup>18</sup>. 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 RNaseIII. 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 virulence<sup>19</sup>. Notre projet actuel est de poursuivre 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 (à cheval sur 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).

---

<sup>18</sup> 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 autorship with P.Romby), Romby P. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *Embo J* 2005; 24:824-35.

<sup>19</sup> 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.

## **7. Liste des publications et communications**

### **7.1. Liste des publications et communications**

Kondo Y., Ito T., Ma XX., Watanabe S., Kreiswirth BN., Etienne J., Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:264-74.

Verdier I., Durand G., Bes M., Taylor KL., Lina G., Vandenesch F., Fattom AI., Etienne J. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J Clin Microbiol* 2007;45:725-9.

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;13:594-600.

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.

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.

Lesens O., Haus-Cheymol R., Dubrous P., Verret C., Spiegel A., Bonnet R., Bes M., Laurichesse H., Beytout J., Etienne J., Migliani R., Koeck JL. Methicillin-susceptible, doxycycline-resistant *Staphylococcus aureus*, Cote d'Ivoire. *Emerg Infect Dis* 2007;13:488-90.

Pouessel G., Ythier H., Carpentier O., Vachee A., Etienne J., Catteau B. Childhood pustular psoriasis associated with Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Dermatol* 2007;24:401-4.

Mayor L., Ortellado J., Menacho C., Lird G., Courtier C., Gardon C., Meugnier H., Bes M., Vandenesch F., Etienne J. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in Asuncion, Paraguay. *J Clin Microbiol* 2007;45:2298-300.

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.

Ferry T., Etienne J. Community acquired MRSA in Europe. BMJ 2007;335:947-8.

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;157:1161-7.

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

Desachy A., Lina G., Vignon P., Hashemzadeh A., Denis F., Etienne J., Francois B., Ploy MC. Role of superantigenic strains in the prognosis of community-acquired methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia. Clin Microbiol Infect 2007;13:1131-3.

Chiquet C., Lina G., Benito Y., Cornut PL., Etienne J., Romanet JP., Denis P., Vandenesch F. Polymerase chain reaction identification in aqueous humor of patients with postoperative endophthalmitis. J Cataract Refract Surg 2007;33:635-41.

Blanc DS., Petignat C., Wenger A., Kuhn G., Vallet Y., Fracheboud D., Trachsel S., Reymond M., Troillet N., Siegrist HH., Oeuvray S., Bes M., Etienne J., Bille J., Francioli P., Zanetti G. Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a small geographic area over an eight-year period. J Clin Microbiol. 2007;45:3729-36.

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.

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

Liassine N., Decosterd F., Etienne J. Evaluation du test IDI-MRSA sur une collection de souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline d'acquisition communautaire et sur des prélèvements de portage. *Pathol Biol (Paris)* 2007;55:37800 -81.

Gillet Y., Dohin B., Dumitrescu O., Lina G., Vandenesch F., Etienne J., Floret D. Infections ostéoarticulaires à staphylocoques dorés sécréteurs de la leucocidine de Panton-Valentine. *Arch Pediatr* 2007;14 Suppl 2:S102-7.

### **7.2. Communications sur invitation à des congrès**

Etienne J. CA-MRSA in the world. Conférence organisée par NABI, Rockeville (USA), 19-20 avril 2007.

Etienne J. Staphylocoque et toxines. Conférence organisée par le laboratoire Pfizer, Paris le 23 mai 2007.

Etienne J. World healthcare Associated infection forum. 1<sup>st</sup> meeting, "Community acquired MRSA" Annecy (France) June 4-5, 2007

Etienne J. The spread of MRSA in the community: a real threat for the future ? Istituto Superiore di Sanita, Rome (Italie) les 10-11 juillet 2007.

Etienne J. Staphylocoque doré et pneumonie nécrosante. Conférence sur les actualités en microbiologie, Nice (France) le 30 novembre 2007.

Etienne J. Global epidemiology of CA-MRSA, 25th International Congress of Chemotherapy and 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich – Germany, 31 March – 3 April 2007.

### **7.3. Communications orales à des congrès**

Thomas D., Ferry T., Perpoint T., Richard J.C., Guillaume C., Allaouchiche B., Vandenesch F., Peyramond D., Etienne J. Usefulness of analysis of the Vbeta repertoire of T cells for the early diagnosis of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndrome. 25th International Congress of Chemotherapy and 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich – Germany, 31 March – 3 April 2007.



Ferry T., de Bentzmann S., Mayor L., Bes M., Vandenesch F., Etienne J. Heterogeneous but higher adhesive properties of hospital-acquired MARSAs Lyon clone isolates in comparison to MSSA isolates. 25th International Congress of Chemotherapy and 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich – Germany, 31 March – 3 April 2007.

Daurel C., Huet C., Dhalluin A., Bes M., Etienne J., Leclercq R. Risk for selection by clindamycin of resistant mutants from *Staphylococcus aureus* inducibly resistant to erythromycin. 25th International Congress of Chemotherapy and 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich – Germany, 31 March – 3 April 2007.

François C., Lemaire X., Legout L., Senneville E., Beltrand E., Caillaux M., Lina G., Etienne J., Yazdanpanah Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones producing toxic shock syndrome toxin 1: first case of intrafamily transmission. 25th International Congress of Chemotherapy and 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich – Germany, 31 March – 3 April 2007.

Perpoint T., Descloux E., Ferry T., Lina G., Bes M., Vandenesch F., Etienne J. Clinical and microbiological features of 55 cases of staphylococcal toxic shock syndrome in France. 25th International Congress of Chemotherapy and 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich – Germany, 31 March – 3 April 2007.

Durand G., Tristan A., Ferry T., Bes M., Meugnier H., Forey F., Reverdy M-E., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. La traque des clones pandémiques de *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline : intérêt des nouveaux outils de description. Société Française de Microbiologie (SFM) VII<sup>ème</sup> Congrès National 30, 31 mai et 1<sup>er</sup> Juin 2007, Nantes.

Boisset S, Huntzinger E, Geissmann T, Chevalier C, Fechter P, Benito Y, Gaspin C, Romby P, Vandenesch F. Pathogenesis and global regulation, the subtlety of RNAIII implication. Symposium on Staphylococcal Pathogenesis organized by the Department of Fundamental Microbiology (DMF), Génomex, UNIL-Sorge, Friday November 16, 2007.

Boisset S, Huntzinger E, Geissmann T, Chevalier C, Fechter P, Benito Y, Gaspin C, Romby P, Vandenesch F. A multifunctional regulatory domain of *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the expression of several virulence genes. Gordon Research Conferences, Staphylococcal Diseases, Les Diablerets, Switzerland, September 2-7, 2007.

Laurent F., Lindsay J., Benito Y., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. *Staphylococcus aureus* pathogenicity according to microarray analysis of growth in fresh human plasma. 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 6-7 décembre 2007 à Paris.

Dumitrescu O., Badiou C., Bes M., Reverdy M.E., Vandenesch F., Etienne J., Lina G. Effet des antibiotiques, seuls et en association, sur la production de leucocidine de Panton Valentine par *Staphylococcus aureus*. 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 6-7 décembre 2007 à Paris.

Dauwalder O., Bes M., Meugnier M., Durand G., Ferry T., Maugat S., Coignard B., Jarlier V., Trystram D., Lina G., Vandenesch F., Laurent F., Etienne J. Identification et caractérisation des clones communautaires et hospitaliers de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline circulant en France entre septembre 2006 et janvier 2007. 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 6-7 décembre 2007 à Paris.

Dohin B., Gillet Y., Kohler R., Lina G., Vandenesch F., Vanhems P.H., Floret D., Etienne J. Pediatric bone and joint infections caused by to Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 6-7 décembre 2007 à Paris.

#### **7.4. Communications affichées à des congrès**

Chini V., Foka A., Petinaki E., Meugnier H., Kolonitsiou F., Garantziotou D., Bes M., Etienne J., Spiliopoulou I. Tracking the epidemiology of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* strains producing Panton Valentine leukocidin in Greece. 25th International Congress of Chemotherapy and 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich – Germany, 31 March – 3 April 2007.

Durand G., Ferry T., Bes M., Gillet Y., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* toxigènes et résistantes à la méticilline dans des cas de surinfections de varicelle - 8<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie (JNI) 13, 14 et 15 Juin 2007, Dijon.

Croze M., Genestier A.L., Badiou C., Gillet Y., Vandenesch F., Etienne J., Lina G. Existe-t-il un lien entre la production d'anticorps dirigés contre la leucocidine de Panton Valentine (PVL) et l'évolution des infections à *S. aureus* sécréteurs de PVL ? 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 6-7 décembre 2007 à Paris.

Zribi M., Bes M., Meugnier H., Masmoudi A., Vandenesch F., Fendri C., Etienne J. Caractérisation moléculaire des SARM isolés à partir de bactériémies à l'Hôpital La Rabta de Tunis. 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 6-7 décembre 2007 à Paris.

Durand G., Bes M., Meugnier H., Dauwalder O., Laurent F., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. Comparaison des techniques de typage de la cassette de résistance à la méticilline SCC*mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*) chez *Staphylococcus aureus*. 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 6-7 décembre 2007 à Paris.

## **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.**

Le programme d'activité pour l'année 2008 est dans la lignée des travaux 2007 et en accord avec le programme d'activité 2006-2009.

Le CNR des staphylocoques a surtout caractérisé pendant des années la présence de facteurs de virulence au niveau du gène. Ainsi et c'est la base quotidienne de son activité, 25 facteurs de virulence sont caractérisés pour chaque souche de *S. aureus* reçue. Il nous semble important de s'intéresser à l'expression de ces facteurs de virulence, notamment dans les produits pathologiques et à la réponse immune vis à vis de ces facteurs de virulence. La finalité est de hiérarchiser l'importance des facteurs de virulence dans les différentes pathologies staphylococciques. La détermination du rôle protecteur de différents anticorps vis à vis de certains facteurs de virulence, dans un modèle expérimental chez la souris est un projet en cours de finalisation avec une équipe américaine de Houston (Texas). Parallèlement nous avons été contacté par plusieurs industriels pour participer au développement de vaccins qui développeront une immunité vis à vis des facteurs de virulence jugés impliqués en pathologie humaine.

Les études épidémiologiques consisteront à surveiller le taux de SARM communautaires PVL positif. La surveillance à partir des services d'urgence chirurgicale sera poursuivie mais surtout une nouvelle enquête nationale sera menée en collaboration avec l'Onerba (Jérôme Robert, MCU-PH à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière). Cette enquête sera similaire à celle de 2004 menée avec les laboratoires de bactériologie du territoire national membres de ce réseau ; enquête n'ayant pas été publiée. Cette nouvelle enquête sera de nouveau basée sur la quantification des SARM PVL positif ayant le phénotype de résistance du clone européen majoritaire ST80. Le CNR déterminera la présence des gènes de la PVL dans les souches sélectionnées. Une recherche du nouveau clone de SARM communautaire contenant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique sera également effectuée. La comparaison des résultats de 2004 et de 2008 permettra surtout de mesurer l'évolution de l'incidence des SARM communautaires sur une période de 4 ans.

Une recherche épidémiologique sera également effectuée pour déterminer si le clone épidémique responsable de maladies exfoliantes et décrit dans le nord de l'Europe est retrouvée en France. Ce clone contient les gènes des exfoliatines A et/ou B, appartient au complexe clonal CC121 et a un séquenço-type ST121 ou ST123. La recherche sera effectuée dans la base de données du CNR.

Une analyse des populations de *S. aureus* sensibles à la méticilline et contenant les gènes de la PVL sera réalisée à partir de 400 souches de la collection du CNR par typage de la protéine A (*spa* typing) et détermination des séquenço-types. La finalité est de rechercher s'il existe de grands clones épidémiques de *S. aureus* sensibles à la méticilline et contenant les gènes de la PVL. Ce travail fait suite à l'épidémie d'infections dues à de telles souches chez les enfants et familles des écoles de Saint Clair sur Ept.

Un travail rétrospectif sera réalisé pour caractériser les souches de *S. aureus* responsables de surinfections de varicelle. Il convient de quantifier la virulence de ces souches en caractérisant leurs facteurs de virulence, ainsi que de déterminer la fréquence de la résistance à la méticilline de ces souches.

Concernant la sensibilité diminuée aux glycopeptides, une étude sera menée à partir de la collection de souches de patients mucoviscidosiques de l'hôpital de Giens et de l'hôpital Femmes-Mères-Enfants de Lyon pour déterminer la fréquence des souches GISA et GISA dans cette collection. Une corrélation sera recherchée avec la prescription de vancomycine chez ces enfants.

\*\*\*\*\*