

Centre National de Référence des Staphylocoques
Rapport annuel d'activité
2009

Pr François Vandenesch & Pr Jérôme Etienne

Faculté de Médecine Lyon-Est

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 2009 a été marquée par :

- Une expertise par le CNR de 1945 souches de staphylocoques ; 1700 provenant d'une centaine de villes françaises et 390 provenant de 16 pays étrangers,
- Une distribution de 260 souches de staphylocoques de collection soit 105 souches à des laboratoires français et 150 souches à des laboratoires étrangers.

Le CNR a continué à caractériser les grands syndromes toxiques staphylococciques et parmi ceux-ci :

- 31 cas de chocs toxiques staphylococciques dont 15 cas menstruels,
- 12 cas de scarlatine staphylococcique,
- 29 cas de syndromes d'exfoliation staphylococcique dont 10 cas d'exfoliation généralisée et 19 cas d'impétigo bulleux,
- 9 cas de surinfection de lésion varicelleuse,
- 26 cas de pneumonie nécrosante.

Le CNR a continué de développer un intérêt particulier sur les infections à staphylocoques associés à la présence de la leucocidine de Panton Valentine. Il a en effet analysé 36 cas de furonculose chronique ou de cellulite extensive. On a mis en évidence que les infections cutanées liées à la présence de cette toxine étaient primitives et survenaient essentiellement sur peau saine sans effraction cutanée initiale. Même si la prévalence des infections due au clone communautaire résistant à méticilline ST80 restait faible en France, son pouvoir épidémique a été mis en évidence en analysant les souches recueillies lors d'une enquête réalisée à l'hôpital Mustapha Pacha d'Alger. Le rôle de la leucocidine dans la physiopathologie des pneumonies expérimentales a été mis en évidence à la fois dans un modèle murin et de lapin. La mise au point d'un test Elisa et immunochromatographique de détection et de quantification de la leucocidine de Panton Valentine a permis de montrer la production de cette toxine à des taux importants, à la fois dans les pus d'abcès et les prélèvements broncho-pulmonaires lors de pneumonie nécrosante.

Le CNR a continué l'investigation de la résistance aux antibiotiques des souches de staphylocoques dorés et n'a pas démontré d'évolution épidémiologique particulière. Une enquête menée avec l'ONERBA n'a pas montré d'augmentation du taux de staphylocoques dorés résistants à la méticilline communautaire.

La caractérisation de plus d'une centaine de souches de staphylocoques dorés isolés lors d'endocardite infectieuse en comparaison avec des souches de portage nasal a permis de mettre en évidence plusieurs gènes spécifiquement présents chez les souches responsables d'endocardite.

Des études menées en relation avec l'AFSSA ont portées sur l'épidémiologie du clone de staphylocoque doré ST398 résistant à méticilline et présent généralement chez les animaux. Le CNR a initié plusieurs travaux visant à évaluer la prévalence de ces souches dans la colonisation animale et l'infection humaine. Ainsi deux enquêtes ont montré que le taux de staphylocoque doré résistant à la méticilline ST398 était plus important à l'abattoir qu'au sein des élevages.

Une étude a été réalisée parmi les staphylocoques à coagulase négative et a permis de démontrer une épidémie en néonatalogie due à *Staphylococcus capitis*.

Des travaux ont portés sur la clinique et la physiopathologie des maladies à superantigènes staphylococciques. Ainsi des travaux ont débuté sur l'étude de la réponse inflammatoire/anti-inflammatoire chez les patients développant un choc toxique staphylococcique.

Enfin des travaux sur le rôle régulateur de l'ARNIII ont été poursuivis et de nouveaux ARN non codants ont été mis en évidence chez les staphylocoques dorés.

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

Cf. tableau.

Personnel consacrant une part de leur activité au CNR	
Centre de Biologie Est Faculté de Médecine Lyon Est	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 Lyon Est	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 Lyon Est	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 Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon Est	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 Lyon Est	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 Lyon Est	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
Sandrine Boisset (webmaster) Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 64 E-mail : sandrine.boisset@univ-lyon1.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

Techniciens rattachés au Centre de Biologie et Pathologie Est	
Christine Gardon Christine Courtier Martine Rougier Annie Martrat 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)

1- 4- 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 Laennec de la faculté de Médecine Lyon Est, 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 - ACTIVITES 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 toxinique 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 SCC*mec*

Le gène de résistance à la méticilline *mecA* est présent sur une cassette dénommée SCC*mec* pour "staphylococcal chromosomal cassette" dont la taille est variable. Il existe 7 grands types de cassette, SCC*mec* 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 des principaux « répertoires Vbeta » du récepteur T [TCR] des lymphocytes T [LyT] ou [Analyse Vbeta]

Objectifs :

- Diagnostic des chocs toxiques staphylococciques.
- Identification de la toxine superantigénique staphylococcique [SAG] responsable.

Principe et justifications :

Staphylococcus aureus peut exprimer un grand nombre de toxines douées de propriétés immunologiques originales qualifiées de superantigéniques. Vingt trois entités distinctes ont été identifiées dont les plus connues sont : la toxine du choc toxique staphylococcique [TSST-1], les entérotoxines A, B, etc. [SEA, SEB, etc.]. Contrairement à un antigène classique qui active $1/10^7$ lymphocytes T [LyT], les toxines superantigéniques staphylococciques [SAGs] stimulent jusqu'à 1/5 de la population lymphocytaire total, provoquant une réponse immuno inflammatoire exagérée, responsable du tableau de choc toxique. De plus, ces superantigènes se lient et induisent la prolifération des lymphocytes T porteurs de certaines boucles ou répertoires Vbeta du récepteur T (TCR). Au cours de l'année 2009, nous avons pu établir une correspondance entre les superantigènes et leurs principaux répertoires Vbeta cibles introduisant la notion de « signature Vbeta ». Ces superantigènes agissent à des concentrations très faibles (quelques nanogramme/mL), bien en deçà des limites de détections de techniques immunologiques directes conventionnelles. Afin de mettre en évidence la présence ou non des superantigènes,

nous avons mis au point un test immunologique de diagnostic indirect par cytométrie de flux mettant en évidence l'activation des populations lymphocytaires exprimant certains répertoires Vbeta. Grâce à la connaissance des « signatures Vbeta » toxiques, il est alors possible d'identifier quel superantigène peut être impliqué. Par exemple, une expansion des lymphocytes T exprimant le répertoire Vβ 2 évoque la « signature Vbeta » induite par la TSST-1.

Type de prélèvement et méthodologie :

- A partir d'un prélèvement sanguin des patients datant de moins de 24h, isolement des cellules mononuclées.
- Détermination des « signatures Vbeta » par cytométrie de flux après marquage par une combinaison d'anticorps monoclonaux.
- Durée de l'analyse : ≈ 4 heures

2-1-1-2- Techniques développées durant l'année 2009 : brève description (principes, validation)

I- Validation de la détection de la leucocidine de Panton Valentine dans les prélèvements biologiques par méthode ELISA.

Lors du précédent compte rendu d'activité, nous avons annoncé la mise au point en collaboration avec bioMérieux d'un test ELISA permettant de détecter et quantifier la PVL dans des surnageants de cultures et les pus d'infection cutanée. Pendant cette année, nous avons étendu notre analyse à un panel de souches plus importantes et plus diverses (6 pays participants), ainsi qu'à d'autres prélèvements biologiques tels que les prélèvements broncho-pulmonaires et ostéo-articulaires. Plus de 300 souches de divers fonds génétiques ont été analysées et nous avons observé une concordance totale entre le test ELISA PVL et la PCR. De même, le test a été utilisé pour détecter directement la PVL dans les échantillons cliniques, pus cutanés et osseux, liquides articulaires, aspirations trachéales, liquides de lavage broncho-alvéolaire et liquides pleuraux. Avec ces prélèvements, le test ELISA PVL a eu une spécificité de 100% et une sensibilité de 95%, ce qui fait de lui un test de diagnostic très fiable. Ces résultats peuvent être obtenus en 3-4 heures.

II- Développement d'un test immunochromatographique pour la détection rapide de la leucocidine de Panton Valentine.

Les résultats obtenus avec le test ELISA laissaient entrevoir la possibilité de mettre au point un test immunochromatographique qui est une méthode de détection de la PVL plus rapide que le test ELISA. En plus d'être rapides, ils sont faciles d'utilisation, faciles à conserver (température

ambiante) et beaucoup moins coûteux par rapport aux techniques de PCR commercialisées actuellement ou les tests ELISA car ne nécessitant aucun matériel. Ce test a été à nouveau développé en collaboration avec bioMérieux. A nouveau, environ 300 souches de divers fonds génétiques ont été analysées et nous avons observé une concordance totale entre test immunochromatographique PVL et la PCR. De même, le test a été utilisé pour détecter directement la PVL dans les échantillons cliniques, pus cutanés et osseux, liquides articulaires, aspirations trachéales, liquides de lavage broncho-alvéolaire et liquides pleuraux. Avec ces prélèvements, le test ELISA PVL a eu une spécificité de 100% et une sensibilité de 88%, ce qui fait de lui un test immunochromatographique très fiable. Le grand avantage est que ces résultats peuvent être obtenus dans l'heure directement à partir des échantillons cliniques en l'absence de tout matériel spécifique. Ce type de test permet d'envisager une détection très rapide de la PVL, permettant d'identifier rapidement les patients atteints d'infections sévères PVL+ et ainsi la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée. Avec ce mode de prise en charge, nous pouvons espérer une meilleure prise en charge des patients ce qui devrait se traduire par une baisse de la mortalité de ces infections.

III- Evaluation de l'immunodépression au cours du choc toxique staphylococcique

Objectifs :

- Evaluer l'état d'immunodépression des patients en choc toxique staphylococcique [CTS].
- Améliorer la compréhension de mécanismes physiopathologiques du CTS.

Principe et justifications :

Chocs septiques et chocs toxiques sont deux entités cliniquement proches, ne différant que par signes cutanés (*i.e.* érythrodermie et desquamation). Bien que mettant tous deux en jeu une réponse immuno inflammatoire exacerbée, ils diffèrent par leurs *stimuli* initiaux. La réponse immunitaire observée au cours du choc septique est décrite comme biphasique, une réponse anti-inflammatoire succédant 48 à 72 heures après la réponse inflammatoire initiale. Parmi les marqueurs de suivi de la réponse immunitaire décrite, la mesure du HLA-DR monocytaire semble d'intérêt, cette dernière ayant une valeur prédictive de la mortalité au delà de 48 heures. Par ailleurs, les superantigènes ciblent les lymphocytes T mais leurs actions sur les différentes sous populations lymphocytaires T restent méconnues. La sous entité des lymphocytes T régulateurs (CD4⁺CD25⁺CD127⁻FOXP3⁺) [LyTreg] intervient dans le contrôle de la réponse immunitaire. Au cours du choc septique, leur nombre reste constant et ils présentent des fonctions suppressives accrues, corrélée avec la survie des patients, pouvant ainsi contribuer à l'immunodépression observée chez les patients en choc septique. Au cours du choc toxique staphylococcique, l'existence ou non d'une immunodépression réactionnelle et le comportement

des LyTreg (numération en pourcentage et en valeur absolue, fonctionnalité) restent inconnus.

Type de prélèvement et méthodologie :

- A partir d'un prélèvement sanguin des patients datant de moins de 24h, isolement des cellules mononuclées.
- Détermination :
 - o des « signatures Vbeta » par cytométrie de flux
 - o de la numération et du pourcentage des LyTreg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻)
 - o de l'expression du HLA-DR monocytaire
- Durée : 5 - 6 heures

Etat d'avancement :

Ce projet est en cours de mise au point. L'analyse des données préliminaires (5 patients atteints de choc toxique staphylococcique menstruel ou non-menstruel) montrent que, bien que l'expansion lymphocytaire T exprimant le répertoire Vbeta ciblé par le superantigène (*i.e.* Vbeta2 ⇔ TSST-1 dans nos 5 cas), la mesure de l'expression du HLA-DR monocytaire reste élevée, contrairement à ce qui est observé au cours du choc septique. Par ailleurs, la numération des lymphocytes T régulateurs montre une augmentation tant en pourcentage qu'en valeur absolue de leur nombre. Ces données nécessitent : *i)* d'être étayées sur un plus grand nombre de patients ; *ii)* de mettre au point un test de suppression permettant l'évaluation de la fonctionnalité suppressive des LyTreg et *iii)* de mesurer l'expression du répertoire Vbeta ciblé par la toxine impliquée sur la population des LyTreg. Ce projet contribue à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la réponse immunitaire au cours des chocs toxiques staphylococciques et suggèrent la nécessité d'études ciblant spécifiquement les LyTreg.

IV- Evaluation de la spectrométrie de masse MALDI TOF pour la détection de la leucocidine de Panton et Valentine [PVL]

Objectifs :

Détection des souches productrices de la PVL lors de l'étape d'identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Principe et justifications :

La PVL est un facteur conférant une virulence accrue aux souches de *S. aureus*. Cependant, sa détection nécessite la réalisation de techniques moléculaires, réservées aux laboratoires spécialisés. Récemment, Bittar *et al.* ont mis en évidence la sensibilité et la spécificité de deux pics en spectrométrie de masse [SM] MALDI-TOF (*i.e.* 4448 et 5302 m/Z) pour la détection de la PVL à l'aide d'une collection de souches cliniques (6).

Type de prélèvement et méthodologie :

- Collection de souches issues de prélèvements cliniques, appartenant à différents clones [ST80, ST8 (USA300), ST8 (clone Lyon)] et porteurs ou non du gène codant la PVL
- Collection de souches isogéniques dans lesquelles le gène codant la PVL a été inséré puis retiré par remplacement allélique.
- Spectromètres de masse MALDI-TOF :
 - o Shimadzu Axima Assurance[®] + SirWeb MaldiTof[®]
 - o Brucker Autoflex[®] + Biotyper[®]

Etat d'avancement :

Cette évaluation a été réalisée dans le cadre d'un prêt d'un SM MALDI-TOF au sein du CNR-Staph pendant 1 mois et d'une collaboration avec le Dr. Etienne Carbonnelle (Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Européen George Pompidou, Paris). Contrairement aux données de Bittar *et al.*, nos résultats montrent la présence quasi systématique du pic de m/Z 4448 parmi les souches appartenant aux clones ST80, qu'elles possèdent ou non le gène codant la PVL. A l'inverse, aucune concordance n'est retrouvée entre la présence des pics de m/Z 4448 comme 5302 et la détection du gène codant la PVL tant dans les souches cliniques que les souches de laboratoire dans lesquelles le gène *pvl* a été inséré. Au total, ces deux pics ne semblent pas satisfaisant pour la détection de la PVL (7). Des études complémentaires à l'aide de PVL purifiée sont en cours de réalisation afin de mettre en évidence les pics spécifiques par SM MALDI-TOF. Des travaux complémentaires seront également réalisés dès l'arrivée d'un SM MALDI-TOF mutualisé au sein du laboratoire de Bactériologie du Centre de Biologie et Pathologie Est (appel d'offre transversal en cours de publication).

V- Nouveau test immunochromatographique permettant la détection rapide directement sur isolement primaire de l'expression de la PLP2a (Test Cleaview Exact PBP2A – Inversness Medical)

Nous avons évalué un test immunochromatographique innovant permettant la détection de la PLP2a directement à partir des isollements primaires (Clearview Exact PBP2a[®], Inversness Medical France). Ce test, réalisé en 5 minutes à partir des colonies primaires, repose sur le même principe et la même procédure que les tests de diagnostic rapide (TDR) utilisés pour le dépistage rapide du streptocoque A au cours des angines.

Au total, 222 souches de staphylocoques cultivées sur gélose au sang et Trypticase-Soja au sang ont été testées : 153 *S. aureus* (102 *S. aureus* sensibles à la méticilline ou SASM, 51 *S. aureus* résistants à la méticilline ou SARM) et 69 staphylocoques à coagulase négative (SCN) (19 SCNSM, 50 SCNRM). Pour chacune de ces souches, le test a également été réalisé

après induction de l'expression de la PLP2a, à partir des colonies présentes autour de disques d'oxacilline et de céfoxitine sur gélose Mueller-Hinton. La résistance ou la sensibilité à la méticilline de chaque souche a été déterminée par méthodes phénotypiques (disques céfoxitine, BioRad ; Galerie Phoenix, Becton Dickinson) complétée par la PCR *mecA* en cas de discordances.

Pour les *S. aureus*, la sensibilité, la spécificité, la VPP et la VPN étaient respectivement de 96,1%, 100%, 100% et 98.1%. Après induction par les disques d'oxacilline et de céfoxitine la sensibilité et la spécificité étaient de 100%. Deux des 51 MRSA se sont révélés négatifs en TDR PLP2a à partir de la culture primaire de 24 heures mais étaient positifs après une nuit de réincubation (producteur faible ou lent de PLP2a).

Pour les SCN la sensibilité, la spécificité, la VPP et La VPN étaient respectivement de 86%, 100%, 100% et 73%. Après induction par les disques d'oxacilline et de céfoxitine la sensibilité et la spécificité étaient de 100%. Sept des 50 SCNMR se sont révélés négatifs en TDR PBP2a sur une culture de 24 heures mais étaient positifs après une nuit de réincubation (producteur faible ou lent de PLP2a). Il est à noter que le test TDR PBP2a a permis de détecter une souche de SCNMR (confirmée par PCR*mecA*) qui n'avait pas été mise en évidence par les antibiogrammes (disques et Phoenix BD).

Le test Clearview Exact PBP2a® permet une identification simple, spécifique et rapide des souches de staphylocoques résistantes à la méticilline (SARM ou SCNMR), directement à partir des isollements primaires. En raison de l'importance d'une adaptation précoce du traitement chez les patients présentant une infection staphylococcique grave, ce test devrait trouver rapidement sa place au quotidien dans les laboratoires de bactériologie.

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 2009

Au cours de l'année 2009, le CNR a reçu 1945 souches de staphylocoques pour expertise. Mille sept cents souches provenaient d'une centaine de villes françaises (environ 140 hôpitaux, 27 LAM) et 390 souches provenaient de 16 pays étrangers ou territoires d'outre-mer (Guyane, Tahiti, Mayotte, Allemagne, Algérie, Belgique, Danemark, Espagne, États Unis, Italie, Inde, Maroc, Suède, Suisse, Singapour, Tunisie).

Le CNR a distribué 260 souches de ses collections, 105 en France et 155 à l'étranger (Allemagne, Belgique, Danemark, Italie, Espagne, Grande Bretagne, Inde, Suisse, Turquie, USA).

• Analyse « Vbeta »

En 2009, le CNR-Staph a réalisé 13 déterminations des répertoires Vbeta des lymphocytes T pour 11 patients. Ces déterminations concernaient 9 enfants et 2 adultes hospitalisés à Lyon excepté pour 1 (Besançon). Ces analyses furent réalisées dans le but d'aider au diagnostic *i*) des chocs toxiques, qu'ils soient staphylococciques ou streptococciques, *ii*) de la scarlatine ou *iii*) du syndrome de Kawasaki. Dans 81% des cas, cette analyse se révéla contributive, faisant ou aidant au diagnostic de certitude. Le détail des analyses réalisées figure dans le tableau ci-dessous.

Pathologie suspectée	Présence d'expansion(s) des répertoires « Vbeta » du TCR des lymphocytes T		Absence d'expansion(s) des répertoires « Vbeta » du TCR des lymphocytes T		Total
	Souche responsable isolée	Absence de souche isolée	Souche responsable isolée	Absence de souche isolée	
CTS-M	3	/	/	/	3
CTS-NM	2	1	/	1*	4
Scarlatine	/	/	1	/	1
Syndrome de Kawasaki	1	/	/	/	1
CTStrepto	2	/	/	/	2
Total	7	2	1	1	11

* Un *Streptococcus pneumoniae* fut isolé dans le liquide pleural.

Abréviations : CTS-M : choc toxique staphylococcique menstruel ; CTS-NM : choc toxique staphylococcique non menstruel ; CTStrepto : choc toxique streptococcique

L'analyse corrélée des résultats de l'analyse « Vbeta » avec les données des profils toxiques (ou toxinotypie) des souches correspondantes montrent une parfaite corrélation lorsque cette dernière est disponible. Les CTS-M présentaient tous une « signature Vbeta » évoquant la TSST-1 et les souches isolées possédaient toutes le gène *tst* codant la TSST-1. Les CTS-NM présentaient une « signature Vbeta » évoquant la TSST-1 dans les deux cas où la souche de *S. aureus* isolée fut obtenue. Dans le cas restant, la « signature Vbeta » évoquait la SEB ou la SEC (redondance des signatures Vbeta SEB/SEC) mais aucune souche n'a pu être isolée, probablement en raison de l'introduction d'une antibiothérapie avant la réalisation des prélèvements bactériologiques. Enfin, les tableaux cliniques des CTS-NM et CTStrepto sont proches mais les « signatures Vbeta » induites sont différentes. Dans deux cas, le diagnostic de CTStrepto dû à la toxine streptococcique pyrogénique A (*SpeA*) fut suspecté grâce à l'analyse des « répertoires Vbeta » puis confirmé lors de l'analyse toxique de la souche de *Streptococcus pyogenes* réalisée par le CNR des Streptocoques du Groupe A (Pr. Anne BOUVET).

Par comparaison, le CNR des Staphylococques avait réalisé, en 2008, 23 déterminations pour 17 patients (9 adultes et 8 enfants) provenant tous du CHU de Lyon à l'exception d'un (CHI Fréjus). L'analyse montrait des altérations des « répertoires Vbeta » dans 24% des cas. Le Tableau ci-dessous illustre le contexte clinique de réalisation de l'analyse.

Pathologie suspectée	Présence d'expansion(s) des répertoires « Vbeta » du TCR des lymphocytes T		Absence d'expansion(s) des répertoires « Vbeta » du TCR des lymphocytes T		Total
	Souche responsable isolée	Absence de souche isolée	Souche responsable isolée	Absence de souche isolée	
CTS-M	/	/	/	/	0
CTS-NM	2*	/	2**	/	4
Scarlatine	/	/	/	1	1
Syndrome de Kawasaki	/	/	/	1	1
CTStrepto	2				2
Choc septique			6***	1	7
Infection cutanée à <i>S. aureus</i>	/	/	1	/	1
Erysipèle	/	/	/	1	1
Total	4	0	9	4	17

* Dans un cas, profil Vbeta douteux évocateur de l'entérotoxine A (SEA).

** Dont un profil Vbeta réalisé à J+1 (précoce) montrant une déplétion et non une expansion de certains répertoires Vbeta.

***5 impliquant un *S. aureus* possédant tous le gène codant la TSST-1, 1 à *Streptococcus pyogenes* dénué de toxines streptococciques superantigéniques.

Ces données illustrent la meilleure maîtrise de l'utilisation de cette analyse au cours de l'année 2009 dans le diagnostic des chocs toxiques, qu'ils soient staphylococciques ou streptococciques.

3 - ACTIVITES 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 légère augmentation avec 72 cas en 2009 pour 66 cas en 2008 (Tableau 1).

Tableau 1. Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines recensées par le CNR des Staphylocoques de Lyon entre 1994 et 2009 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
2007	18	16	27	19	80
2008	11	18	26	11	66
2009	10	19	31	12	72
Total	198	188	355	212	1140

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.

- 31 cas de TSS ont été rapportés, dont 15 cas de TSS menstruels ; ces chiffres sont supérieurs à ceux de 2008 (8 cas de TSS menstruels) signant ainsi une nouvelle augmentation après celle 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 13 à 25 ans avec une médiane de 18 ans. Les cas ne semblent pas reliés à l'utilisation d'une marque particulière de protection périodique. Le pronostic était excellent à l'exception d'un cas fatal mais il s'agissait d'une récurrence. Treize souches isolées possédaient le gène codant la TSST-1 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*, tandis qu'une autre souche possédait les gènes codant la TSST-1, l'entérotoxine C et un allèle *agr 2*. Aucune des souches responsables des cas menstruels 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 patients s'étend de 1 à 81 ans avec une médiane d'âge de 47,5 ans tandis que le *sex ratio* de ces patients est 8/16. Onze souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 5 autres souches possédaient au moins un gène codant une entérotoxine (SEA, SEB ou SEC). Ces souches étaient le plus souvent sensibles à la méticilline avec uniquement 2 souches résistantes aux pénicillines M.

- 12 cas de scarlatine staphylococcique (SS) ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 3 à 66 ans avec une médiane d'âge de 10,5 ans tandis que le *sex ratio* est de 4/12. Ces manifestations sont survenues au décours d'infections diverses (infections cutanées, pharyngite, ostéite, arthrite), communautaires ou nosocomiales. Sept souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 5 autres possédaient au moins un gène codant une entérotoxine (SEA, SEB, SEC, SEK, SEQ). Une seule souche était résistante à la méticilline.

Syndromes d'exfoliation staphylococcique.

Le CNR a analysé les souches provenant de 29 cas de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en 10 cas d'exfoliation généralisée (25 en 2002, 27 en 2003, 22 en 2004, 32 en 2006, 18 en 2007, 11 en 2008) et 19 cas d'impétigo bulleux (19 en 2002, 18 en 2003, 8 en 2004, 20 en 2006, 16 en 2007, 18 en 2008). Aucune épidémie survenant dans une maternité n'a été déclarée cette année.

Pour les 9 cas pédiatriques, l'âge des patients ayant présenté une exfoliation généralisée staphylococcique s'étend de quelques jours à 5 ans avec une médiane de 1,5 ans tandis que le *sex ratio* de ces patients est 6/9. Un seul cas d'exfoliation généralisée a été rapporté chez un adulte âgé de 57, souffrant d'insuffisance rénale et immunodépression. Six souches possédaient les gènes

codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB), 3 souches l'ETA seule et 1 souche l'ETB seule. Aucune de ces souches n'était résistante à la méticilline.

L'âge des patients ayant présenté un impétigo bulleux s'étend de quelques jours à 41 ans avec une médiane de 5 ans tandis que le *sex ratio* de ces patients est 13/19. Huit souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 10 souches l'ETA seule, une souche l'ETB seule. Aucune de ces souches n'était résistante à la méticilline.

Surinfections des lésions varicelleuses

Neuf souches adressées étaient isolées des surinfections de lésions varicelleuses. L'âge des patients est compris entre 1 et 7 ans avec une médiane de 1 an et un *sex ratio* de 5/9. Sept souches possédaient au moins un gène codant une entérotoxine (6 souches SEC, une souche SEB et SEP). Une souche possédait l'exfoliatine A et l'entérotoxine A, tandis qu'une souche possédait uniquement l'exfoliatine A.

Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine

Vingt-six nouveaux cas de pneumonie nécrosante PVL+ ont été diagnostiqués en 2009 (14 en 2008, 19 en 2007) ; les patients étaient âgés de 1 mois à 84 ans avec une médiane d'âge de 22 ans. Deux cas sont survenus dans les suites d'une grippe H1N1. Neuf cas étaient dus à des souches résistantes à la méticilline, 7 souches appartenaient au groupe *agr3* avec un profil toxinique et de résistance aux antibiotiques évocateur du clone SARM d'origine communautaire diffusant en Europe et Afrique du Nord (ST80), tandis que 2 souches appartenaient au clone de SARM communautaire majoritaire circulant sur le continent américain (USA300).

Six cas de pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine ont été rapportés au CNR en 2009. Les patients étaient âgés de 1 mois à 21 ans avec une médiane d'âge de 0,5 ans. Toutes les souches isolées dans ce contexte étaient sensibles à la méticilline.

Intoxications alimentaires individuelles et collectives.

Aucune souche de *S. aureus* isolée dans un contexte d'intoxication alimentaire n'a été adressée au CNR pendant l'année 2009.

Entérocolites à *S. aureus*.

Un seul cas d'entérocolite aiguë a été signalé au CNR en 2009. La souche de *S. aureus* était isolée chez un nourrisson de 1 mois ayant présenté un choc septique sur entérocolite fulminante. La souche était sensible à la méticilline, possédait le gène codant l'entérotoxine C ainsi qu'un allèle *agr* de type 1. Toutefois son rôle dans la genèse de l'entérocolite aiguë reste discutable.

Ostéites et infections ostéo-articulaires

Nous avons reçu pour expertise 24 souches de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéoarticulaire, les patients étant âgés de 1 à 58 ans (médiane d'âge 14,5 ans) avec un *sex ratio* de 17/24. Treize infections étaient liées à des souches productrices de la TSST-1 : 11 souches sensibles à la méticilline et 2 souches résistantes à la méticilline appartenant au « 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. Deux infections étaient dues à des souches portant le gène codant la leucocidine de Panton Valentine. Une souche était sensible 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 une furonculose récidivante.

Dans 5 autres cas, il s'agissait de souches produisant des entérotoxines (SEA, SEC) 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-six cas de furonculose chronique ou de cellulites extensives (66 en 2002, 55 en 2003, 48 en 2004, 45 en 2006, 36 en 2007, 34 en 2008) ont été rapportés au CNR.

Tous les cas étaient communautaires et se répartissent en 5 épidémies intrafamiliales et des cas sporadiques. Vingt et un cas étaient liés à des souches résistantes à la méticilline et productrices de la leucocidine de Panton Valentine. L'âge des patients s'étale de 1 an à 48 ans avec une médiane d'âge de 16 ans tandis que le *sex ratio* de ces patients est 12/21.

Parmi ces 21 souches, 19 correspondent au clone SARM d'origine communautaire diffusant actuellement en Europe (*agr3*, PVL+, *mecA*+) et 2 au clone de SARM d'origine communautaire décrit aux Etats-Unis (*agr1*, PVL+, *mecA*).

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

99 souches ont été envoyées de laboratoires extérieurs pour expertise (Tableau 2). Il s'agit de 89 souches de *S. aureus* et de 10 souches de staphylocoques coagulase négative.

Tableau 2. Origine géographique et nombre de souches de staphylocoques adressés à Lyon en 2009 pour expertises concernant la résistance aux antibiotiques.

Provenance	Nb de Souches	<i>S. aureus</i>	SCN
Agen	1	1	
Annecy	1		1
Annonay	1	1	
Antibes	2	2	
Arpajon	5	5	
Beaumont sur Oise	1	1	
Beziers	1		1
Brest	1	1	
Cabestany	1	1	
Cahors	1	1	
Clamart	7	7	
Creil	2	2	
Eaubonne	1	1	
Foix	1	1	
Fréjus	1	1	
Gap	2	2	
Grenoble	2	2	4
Lyon Autres Hôpitaux	12	8	
Le BlancMesnil	1	1	1
Le Mans	1		
Montceau les mines	4	3	1
Montpellier	42	41	1
Moulins	2	2	
Papeete	1	1	
Privas	1		1
Roanne	1	1	
Toulouse	2	2	
Valence	1	1	
TOTAL	99	89	10

Le gène de résistance à la métilcilline a été recherché par PCR pour 36 de ces souches : 29 *S. aureus* et 7 staphylocoques coagulase négative.

Un résultat a été rendu positif dans 10 cas (dont 1 staphylocoque 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 26 cas (dont 6 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 25 et 27 mm, de souches multirésistantes aux antibiotiques, de souches résistantes isolément aux aminosides, fluoroquinolones ou macrolides. Ces profils de résistance peu habituels faisaient demander une confirmation de l'absence de gène de résistance à la métilcilline.

Pour les hôpitaux associés au CNR, 80 recherches du gène *mecA* de résistance à la méticilline ont été faites pour des phénotypes associés inhabituels (32 *S. aureus* et 48 staphylocoques à coagulase négative), 29 se sont avérées positives et 51 négatives.

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

L'étude a été demandée pour 64 souches de laboratoires extérieurs, pour lesquelles le criblage était 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.

22 souches ont été confirmées de sensibilité diminuée aux glycopeptides, il s'agissait principalement de souches hétérogènes, inductibles en présence de glycopeptides (souches hGISA), 42 souches étaient sensibles aux glycopeptides.

Mucoviscidose

Depuis 2007, le CNR effectue l'analyse des phénotypes de résistance sur les souches de *S. aureus* de mucoviscidose isolées dans les hôpitaux associés au CNR.

133 SARM ont été isolés et 741 souches sensibles à la méticilline.

En 2009, la détection des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides a été effectuée sur 133 souches de mucoviscidose principalement des SARM, isolés chez 47 patients. Vingt huit souches présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides, isolées chez 10 patients ; 8 d'entre eux avaient déjà été dépistés les années précédentes.

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

Au cours de l'année 2009, le CNR a investigué 14 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. Les cas ont été analysés dans les contextes suivants :

- **Macon** : Six souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées chez 6 patients sur un intervalle de 8 mois. Ces souches étaient responsables d'infections sur site opératoire. Un fort lien de clonalité a été mis en évidence pour trois souches sur 6, les trois pulsotypes correspondants présentaient plus de 90 % d'homologie. Les trois autres souches étaient différentes entre elles et différentes des 3 premières. Trois autres souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées 5 mois plus tard chez 3 nouveaux patients ont été reçues pour comparaison aux 6 souches précédentes. Seule une souche du 2^{ème} cas groupé a pu être rattachée, sur la base du pulsotype, au groupe des trois souches précédentes qui présentaient un fort lien de clonalité. Les 5 autres souches étaient différentes entre elles et différentes de ce groupe.
- **Macon** : Deux souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées à 6 mois d'intervalle d'hémoculture chez un même patient porteur d'une dérivation ventriculo-péritonéale. Les pulsotypes des 2 souches étaient différents.
- **Lyon** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées à partir d'hémoculture chez 2 bébés hospitalisés dans le même service. Les pulsotypes différents mettaient en évidence l'absence de lien de clonalité entre ces deux souches.
- **Chambéry** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées à partir de prothèse de sein et d'ombilic chez 2 patientes hospitalisées dans le même service. Les deux souches appartenant à des fonds génétiques différents (allèles *agr* 1 et 3) ne présentaient donc pas de lien de clonalité.
- **Montbéliard** : 3 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées à partir d'infections sur site opératoire chez 3 patients hospitalisés dans le même service. Seules deux souches sur trois présentaient un fort lien de clonalité (pulsotypes et allèles *agr* identiques), la troisième était complètement différente.
- **Aubenas** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées chez un même patient à 6 mois d'intervalle (souche d'endocardite infectieuse 2008 et souche d'hémoculture 2009). Les deux souches étaient parfaitement identiques (pulsotype et allèle *agr* identiques).
- **Bayonne** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées au cours d'un accident transfusionnel à partir de l'hémoculture du patient et du mélange de concentrés plaquettaires. Les deux souches présentaient des pulsotypes identiques et le même fond génétique (allèle *agr* de type 2).
- **Giens** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées de prothèse de hanche et de genou chez deux patients opérés à trois jours d'intervalle. Les deux souches appartenant à des fonds génétiques différents (allèle *agr* 2 et 3) ne présentaient pas de lien de clonalité.

- **Compiègne** : 2 souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez 2 patients dans le cadre d'infections sur prothèses orthopédiques. Les deux souches étaient très différentes. La première, résistante à la méticilline, possédait le gène de l'entérotoxine A, un allèle *agr* de type 1 et appartenait au clone majoritaire de SARM hospitalier diffusant actuellement en France. La deuxième sensible à la méticilline, possédait les gènes de l'entérotoxine A, de la TSST1, un allèle *agr* de type 3 et appartenait au clone diffusant actuellement dans la communauté et responsable dans 2/3 des cas de choc toxique staphylococcique et dans 1/3 des cas d'infections suppuratives.

- **Saint Quentin** : 2 souches de *Staphylococcus hominis* isolées au cours d'un accident transfusionnel à partir de l'hémoculture du patient et de la poche de sang. Les deux souches présentaient des pulsotypes proches mais non identiques (homologie de 90 %, une bande de différence). En l'absence de souches contrôles appartenant à la même espèce l'identité des souches n'a pas pu être affirmée.

- **Grenoble** : 2 souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infection sur prothèse totale de hanche chez un même patient à 8 mois d'intervalle. Les pulsotypes des 2 souches étaient identiques à l'exception du décalage d'une bande. L'électrophorèse en champ pulsé étant une technique très discriminante pour cette espèce, il a été possible de conclure à l'existence d'un fort lien de clonalité entre les deux souches.

- **Paris** : un premier cas portant sur 2 souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline isolées d'hémocultures chez un même patient dans le cadre d'une récurrence d'infection sur prothèse totale de hanche à quatre ans d'intervalle. Les deux souches étaient différentes (> 5 différences au niveau des pulsotypes). Un deuxième cas portant sur 2 souches de *Staphylococcus epidermidis* (une sensible et une résistante à la méticilline) isolées au cours d'infection sur prothèse totale de hanche chez un même patient le même jour. Une seule bande de différence était observée entre les deux pulsotypes pouvant correspondre à la cassette *mec* de résistance à la méticilline. Les deux souches présentaient donc un fort lien de clonalité.

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

Le CNR a caractérisé les souches de *S. aureus*, après l'enquête menée par l'Onerba (voir § 3-5- ci-après);

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

Etude "Endocardite infectieuse en France en 2008"

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

Cette étude observationnelle prospective à base populationnelle sur 25 millions d'habitants et 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.

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 172 souches dont 131 souches de *S. aureus* (17 *mecA*+, 13 %), 30 *S. epidermidis* (15 *mecA*), 4 *S. capitis* (1 *mecA*), 3 *S. lugdunensis*, 2 *S. haemolyticus* (1 *mecA*), and 2 *S. hominis* (1 *mecA*). Les souches étaient sensibles à l'ensemble des antibiotiques à l'exception des 17 souches de SARM qui présentaient des résistances à la lévofloxacine (15/17, 88 %), à la kanamycine et la tobramycine (8/17, 47 %), et à l'érythromycine (6/17, 35 %). Seules 5 souches de *S. epidermidis* ont présenté une sensibilité diminuée aux glycopeptides (CMI teico ≥ 8 mg/l).

Les souches de *S. aureus* appartenaient à 19 séquence-types (ST) différents avec une diversité identique à celle observée au sein d'une collection de 114 souches invasives isolées en France entre 2006 et 2007 (Indice de Simpson de 88.3% vs 91.1%). Aucune souche de SARM communautaire n'a été identifiée. L'analyse moléculaire comparée par puces à ADN des 114 souches de SASM isolées d'endocardites et de 152 souches de SASM isolées du nez de patients colonisés a permis de mettre en évidence plusieurs gènes ou allèles (sialoprotein (*bbp*), elastin binding protein (*ebps*), hyaluronate lyase (*hysA*) et modulins (*ssl*)) spécifiquement présents chez les souches de SASM responsables d'endocardites.

Au final, aucune modification majeure n'a été notée en termes de distribution des espèces et des clones de SASM ou de SARM responsables d'endocardite en France. *S. aureus* demeure l'espèce la plus courante et les souches conservent une grande sensibilité dans leur grande majorité. Certains gènes de virulence semblent associés aux souches responsables

d'endocardite et des travaux complémentaires sont en cours pour confirmer ces derniers résultats et en apprécier les conséquences cliniques et physiopathologiques.

Etude "ONERBA 2008 – SARM producteurs de toxines"

Type de collaboration : CNR - ONERBA

En raison de l'émergence récente de nouveaux clones de SARM communautaires porteur de gènes codant pour les toxines de Panton et Valentin (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 (104 laboratoires) des 6 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 1 (OX_R, FA_I, FQ_S, GM_S et K_R, TM_S) ; iii) *S. aureus* résistant à la méticilline et de phénotype 2 (OX_R, FA_{I/R}, FQ_S, GM_S et K_R, TM_R) ; iv) *S. aureus* résistant à la méticilline et sensible à tous les aminosides (OX_R, FA_{I/R}, FQ_S, GM_S et K_S, TM_S) (phénotype 3). 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.

Au total, sur la période d'étude, 34970 patients porteurs de *S. aureus* ont été détectés dont 7253 MRSA (20.7%). Trois cent trente trois souches de MRSA ont été analysées par le CNR soit 93 présentant le phénotype 1 (1.3% des MRSA), 176 présentant le phénotype 2 (2.4%), et 64 (0.9%) présentant le phénotype 3. L'analyse combinée des phénotypes de résistance, du typage *agr*, des profils toxiques et du typage de la cassette *SCCmec* a permis de montrer que l'essentiel des souches (n=91) de phénotype 1 présentaient les caractéristiques du "clone SARM-PVL Européen ST80" et que la grande majorité (n=190) des souches de phénotypes 2 et 3 présentaient les caractéristiques du clone SARM-TSST1 Géraldine. Les patients infectés avec les souches de phénotype 1 étaient plus jeunes (27ans vs 49 ans), présentaient plus souvent des infections cutanées profondes (48% vs 6%), avaient eu recours plus souvent à un drainage chirurgical (42% vs 11%) et montraient une acquisition communautaire bien plus marquée (14% vs 46%) que les patients infectés avec les souches des phénotypes 2 et 3 (dont les populations étaient non significativement différentes). Ces résultats confirment la faible prévalence des souches appartenant au clone Européen ST80 CA-MRSA et l'émergence du

clone Géraldine (CA-SARM TSST1) en France ainsi que sa diffusion sur l'ensemble du territoire français avec les risques en terme de santé publique et les conséquences cliniques (choc toxique staphylococcique de type superantigénique) liées à la sécrétion éventuelle par ces souches de la toxine TSTT-1.

Etude "Clone *S. aureus* ST398 : relation entre souches humaines et animales".

Type de collaboration : CNR – AFSSA – Réseau CHG/CHU du CNR

Staphylococcus aureus est considéré comme un pathogène et comme un commensal chez les animaux et de nombreuses études ont détaillé leur prévalence dans diverses populations animales. Si les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont bien connus pour être une cause importante d'infections «hospitalières» chez l'homme, la découverte d'une colonisation asymptomatique massive par un clone de SARM, appelé « SARM ST398 », chez les porcs en Europe a été récemment décrite. Ce clone a été décrit comme une cause d'infection chez des personnes exposées aux porcs par contact direct ou indirect, dans le cadre de leurs activités professionnelles. Plusieurs publications ont aussi montré que ces SARM ST398 peuvent s'introduire dans des hôpitaux à la suite d'infections d'origine communautaire. Parallèlement des souches SARM ST398 ont été identifiées comme possible réservoir. Compte tenu des informations disponibles au niveau européen, l'autorité européenne de sécurité des aliments a d'ailleurs *"recommandé de compléter les informations issues de l'enquête préliminaire par une surveillance du SARM chez les porcs d'élevage et d'engraissement aussi bien que chez d'autres espèces animales productrices d'aliments, comme les volailles et les bovins. Il est également recommandé d'étudier les causes de la variation de la prévalence du SARM parmi les États membres ainsi que l'importance pour la santé humaine de la détection de SARM non-ST398 chez les porcs et le rôle de l'homme en tant que source potentielle de souches de ce type"*.

Dans le cadre de la surveillance de ces clones ST398 et plus généralement des SARM chez les animaux, le CNR des staphylocoques a donc initié et participé à plusieurs travaux visant à évaluer la prévalence et l'implication des souches à la fois dans la colonisation animale et les infections humaines en France.

Collaboration CNR - AFSSA Paris, Ploufragan, Fougères - DAG - DDSV

A l'instar de la Hollande et d'autres pays, l'AFSSA, en collaboration avec la DGAL, les DDSV et le CNR des Staphylocoques, a réalisé une enquête de prévalence du portage de SARM avec typage des souches chez le porc. L'échantillonnage, représentatif de la production nationale, portait sur 165 lots de 10 porcs, prélevés par écouvillonnage nasal dans 21 abattoirs entre janvier et septembre 2007. Parallèlement, une enquête de concordance visant à déterminer le différentiel entre statuts en élevage et à l'abattoir, a été conduite sur 37 lots de 10 porcs

prélevés à l'élevage puis à l'abattoir. La recherche de SARM a été réalisée par enrichissement sélectif des écouvillons en milieu liquide puis isolement sur un milieu sélectif chromogène. L'identification de l'espèce et la recherche du gène *mecA* ont été réalisées par PCR. Les antibiogrammes des SARM isolés ont également été réalisés.

L'enquête de prévalence a montré que 29,5 % (IC 95% [23,2 – 35,7]) des lots et 13,5 % (IC 95% [8,3 – 18,7]) des porcs étaient porteurs de SARM au moment de l'abattage. Parmi les facteurs liés au portage de SARM recherchés, seul un effet "abattoir" a pu être mis en évidence. L'enquête de concordance a en outre montré une différence significative entre le portage des SARM à l'élevage (5 % des lots et 0,8 % des porcs) puis au moment de l'abattage (38 % des lots et 16 % des porcs). La très grande majorité des SARM isolés au cours de cette étude est résistante à la tétracycline et plus de la moitié d'entre eux sont résistants aux macrolides. Contrairement aux SARM isolés chez l'Homme en milieu hospitalier, les SARM isolés chez les porcs sont majoritairement sensibles aux fluoroquinolones.

Le typage moléculaire des isolats a permis de mettre en 12 *spa*-types dont l'un est très largement majoritaire, le t011, regroupant 66% des souches. Les autres *spa*-types retrouvés étaient : t002 (8%), t1184 (6%), t899 (5%), t2370 (4%), t034 (3%), t108 (2%). Le typage par MLST a montré la présence d'une majorité de ST398, puis ST5, ST8 et ST1348. Le typage de la cassette *SCCmec* donne 50% de type V, 14% de type IV et 36% de non typable. L'analyse par puces à ADN a permis de montrer que l'ensemble des souches était très proche génétiquement avec l'absence de gènes de toxine et de gènes majeurs de virulence conduisant pour l'instant à limiter le potentiel pathogène des souches ST398 MRSA circulants en France.

Les données de ces 2 enquêtes montrent que le SARM peut être présent chez le porc charcutier français et que les nombres de lots et d'animaux porteurs sont plus importants à l'abattoir qu'à l'élevage en fin d'engraissement. Ces résultats suggèrent une contamination croisée des porcs entre leur départ de l'élevage et le moment de l'abattage.

Collaboration CNR-AFSSA Lyon

Dans le cadre de la colonisation des animaux en contact avec l'homme (par l'élevage ou la nourriture), nous nous sommes intéressés en collaboration avec l'AFSSA de Lyon (Equipe de Jean-Yves Madec) au portage nasal de *Staphylococcus spp* par les veaux à l'abattoir. Le projet consistait à prélever par écouvillon nasal un minimum de 100 veaux provenant de divers élevages, avant sacrifice rituel à l'abattoir de Corbas (Lyon). Les staphylocoques ont été isolés après enrichissement sur un milieu sélectif pour les staphylocoques résistants à la méticilline (MRS) (Brillance MRSA, Oxoid). Les SARM ont été typés par *spa*-typing et analysés par la technique de micro-arrays, et les MRS ont été identifiés à l'espèce par séquençage du gène *tuf*.

En parallèle, le profil de tous les isolats a été déterminé par antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

Un total de 124 prélèvements ont été effectués sur 4 jours à l'abattoir de Corbas, et ont permis l'isolement de 8 SARM et de 47 MRS. Les résultats préliminaires montrent que les 8 SARM sont des ST398 (t899) et suggèrent que les MRS sont en grande majorité des *S. sciuri*. La presque totalité des souches présentent un profil de multi-résistance. La confirmation de ces résultats ainsi que des analyses complémentaires sont actuellement en cours.

Collaboration CNR – AFSSA – CHG Saint Briec

En collaboration avec le service de microbiologie de Centre Hospitalier de Saint Briec qui se situe dans une zone de forte concentration d'élevage porcin et dans laquelle des souches ST398 SARM ont été identifiées chez les porcs, nous avons cherché à évaluer la prévalence des ST398 SARM et ST398 SASM. L'ensemble des souches de *S. aureus* isolées sur une période de 6 mois (n=230, portage ou infection) ont été testées à l'aide d'une PCR spécifique ST398 (développée par nos collègues danois du Statens Serum Institut de Copenhague). Parmi les 71 SARM, aucune n'appartenait au clone ST398. Parmi les 159 SASM, 4 appartenaient au clone ST398. Ces résultats semblent indiquer que, dans la zone géographique et dans le bassin de population étudié, la prévalence des SARM ST398 est probablement faible dans les infections staphylococciques ou tout au moins si ces souches sont à l'origine de formes cliniques, celles-ci sont peu sévères et ne nécessitent pas d'hospitalisation. Des études en médecine communautaire et des études de portage plus ciblées pourraient permettre d'affiner notre connaissance sur la diffusion de ce clone.

Etude " Endémo-épidémie à *Staphylococcus capitis* résistants à la méticilline dans les services de néonatalogie en France"

Type de collaboration : CNR – Laboratoires Microbiologie CHU – Services de Néonatalogie

Dans le cadre de son activité d'expertise et de surveillance, le CNR a été amené à étudier une endémo-épidémie due à *Staphylococcus capitis* multi-résistant dans les services de Néonatalogie en France. Les staphylocoques à coagulase négative (ScoN) sont fréquemment responsables d'infections nosocomiales et en particulier de bactériémies chez les enfants hospitalisés en néonatalogie. *Staphylococcus capitis* n'est pas classiquement décrit comme l'espèce prédominante dans de telles infections. De janvier 2004 à juin 2009, dans le service de néonatalogie du Groupement Hospitalier Nord (GHN Lyon), 136 nouveau-nés ont présenté une bactériémie à *S. capitis*. La prévalence de cette espèce au sein des hémocultures positives a atteint 43% (54% des ScoN). Dans 99% des cas, la souche était multirésistante présentant à la fois une résistance à la méticilline et à la gentamicine. Par électrophorèse en champ pulsé

(ECP), nous avons comparé 17 de ces souches de *S. capitis* résistants à la méticilline (SCRM) avec : i) 22 SCRM isolées d'hémocultures de nouveau-nés dans d'autres hôpitaux français (Lyon, n=7; Limoges, n=7; Saint Etienne, n=3; Caen, n=2; Troyes, n=2; Nantes, n=1) et ii) 8 SCRM et 6 SCSM isolés chez des patients adultes. Les profils ECP obtenus pour les souches adultes étaient tous différents entre eux alors que ceux des souches provenant des services de néonatalogie de Lyon et de l'ensemble des autres hôpitaux français présentaient une homologie supérieure à 80%. Pour compléter cette observation, la cassette *SCCmec* de 15 SCMR a été analysée : les 7 souches isolées d'hémocultures de nouveau-nés provenant de différents hôpitaux français possédaient toutes une cassette *SCCmec* de type V alors que les 8 souches isolées d'adultes, non reliées épidémiologiquement aux précédentes, possédaient des cassettes toutes différentes.

Ces résultats indiquent la présence d'un clone unique endémo-épidémique diffusant dans le service de néonatalogie du GHN Lyon mais circulant aussi plus largement dans les services de néonatalogie français. Des études complémentaires sont en cours afin de comprendre quel est le réservoir de ce clone ainsi que les raisons et les mécanismes de sa diffusion.

Etude "Etude VIRSTA : facteurs associés à une localisation à l'endocardie au cours des bactériémies à *Staphylococcus aureus*: étude de cohorte prospective, nationale, multicentrique".

Type de collaboration : CNR – CHU Français dans le cadre d'un PHRC nationale coordonnée par Dr Vincent Le Moing (CHRU Montpellier)

L'objectif de ce protocole hospitalier de recherche clinique est de mettre en évidence les facteurs démographiques, cliniques et microbiologiques associés à une localisation à l'endocardie en cas de bactériémie à *S. aureus*. Il s'agit d'une étude de cohorte prospective multicentrique nationale sur une durée de 2 ans dans l'optique d'observer au moins 2400 cas de bactériémies (groupe contrôle) et au moins 100 cas d'EI à *S. aureus*. Une étude ancillaire de type cas témoins avec cas incidents est nichée dans la cohorte pour étudier les facteurs bactériologiques et génétiques associés aux endocardites. Pour chaque cas d'EI est sélectionné un témoin atteint de bactériémie sans EI apparié sur l'âge, le sexe et caractère lié au soin ou non de la bactériémie. Chaque cas et chaque témoin subit un prélèvement salivaire pour extraction de l'ADN. Une étude génétique sur gènes candidats et sur génome complet sera réalisée. Les souches de *S. aureus* des EI et des témoins appariés sont conservées puis centralisées par le Centre National de Référence des staphylocoques pour analyse génétique et analyse des facteurs de virulence, notamment les niveaux d'expression de certaines protéines (adhésine, toxines...). L'objectif de cette étude est d'améliorer : i) les connaissances de la physiopathologie des bactériémies et des endocardites à *S. aureus* ; ii) la prise en charge des bactériémies à *S. aureus* par une prise en charge plus précoce et mieux adaptée des

patients à risque d'endocardite.

Il est prévu d'inclure au total 100 patients atteints d'endocardite à *S. aureus* sur une période de deux ans. Vingt sept inclusions ont été réalisées depuis Septembre 2009 et l'analyse moléculaire de ces souches a débuté au sein du CNR.

Etude "Emergence de SARM communautaires en Espagne".

Type de collaboration : CNR – CHU Bilbao (Espagne) avec accueil d'une étudiante de thèse d'université européenne

Dans le cadre de nos collaborations européennes, nous avons accueilli au sein du CNR, Raquel Blanco Gonzalez (Thèse d'université européenne). Cette doctorante espagnole est venue de Bilbao afin de caractériser 40 souches de SARM communautaires producteur de LPV sélectionnées au sein d'une collection de 1334 souches isolées chez 1164 patients hospitalisés entre 2005 et 2008 à l'hôpital Basurto de Bilbao. Ces souches ont été analysées par champ pulsé, *spa*-typing, puces Vlondiag®, MLST, profil de résistance aux antibiotiques. Ce travail (Janvier-Avril 2009) a conduit à la rédaction d'un article actuellement soumis au Journal of Clinical Microbiology sur l'émergence et la diffusion dans cette région de l'Espagne de souches de SARM-C LPV+ appartenant au grand clone américain USA 300 mais ACME négatives.

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 - ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL :

5-1- Enseignement, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires :

Dauwalder O. Association des Biologistes de la Région Rhône Alpes (ABRA) - Quand faut-il demander une recherche de toxines de *Staphylococcus aureus*? Enseignement post universitaire [EPU]. Lyon, Hôpital Saint Joseph - Saint Luc, 15 janvier 2009.

Laurent F. Recherche des toxines de *Staphylococcus aureus*. Lesquelles ? Quand ? Comment ? Pourquoi ? Association des microbiologistes du Sud Ouest – Bordeaux, 5 Juin 2009

Laurent F. *Staphylococcus aureus*: une nouvelle épidémiologie. Probioqual – Lyon, 17 septembre 2009

Dauwalder O. Facteurs de virulences staphylococciques. Colloque de service clinique du Pavillon N à la destination des réanimateurs – Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France.

5-2- Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

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'envois, 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...)

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. 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 ont été remises en octobre 2009. Elles ont été validées par le CsSP, et devraient l'être prochainement par le HCSP.

6- TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE CU 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 translationnelle, 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. Plus récemment, notre équipe a été rejointe par la jeune équipe de Thomas Henry, immunologiste de formation et spécialiste de l'inflammasome. A l'occasion du nouveau contrat quadriennal (évalué par l'AERS en janvier 2010), nous avons décidé avec T. Henry de former un groupe plus large, dont la thématique est « Pathogénie Bactérienne et Immunité Innée ». Ce groupe est piloté par F. Vandenesch avec 3 investigateurs principaux : F. Vandenesch, G. Lina et Th. Henry. Le fil conducteur de notre projet actuel est que l'issue des infections bactériennes résulte de la balance entre les facteurs de virulence et la réponse de l'hôte. Nous nous intéressons aux interactions hôtes pathogènes dans trois modèles bactériens *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila* et *Francisella tularensis*, ces trois bactéries ayant en commun le poumon comme l'un des organes cibles¹. Trois axes de recherche sont développés : un axe clinique et deux axes de recherche fondamentale portant sur les facteurs de virulence bactériens et sur la réponse immunitaire de l'hôte. Notre recherche clinique porte sur l'épidémiologie, la pathophysiologie et la microbiologie de ces trois pathogènes. Cette recherche s'appuie sur le réseau clinico-biologique et les bibliothèques du Centre National de Référence des Staphylocoques et des Légionelles (Dir J. Etienne & S. Jarraud). L'objectif est de suivre l'épidémiologie, de détecter les phénomènes émergents, d'identifier les facteurs de pronostic favorable, notamment thérapeutiques, et les facteurs génétiques de susceptibilité de l'hôte. Sur un versant bactérien plus fondamental, 3 thématiques sont développées : (i) l'étude de la régulation de l'expression des facteurs de virulence, (ii) l'identification des ARN non-codants chez *S. aureus* et *L. pneumophila* et l'étude de leur rôle dans la virulence bactérienne, (iii) l'analyse des stratégies d'adhésion de *L. pneumophila* et de *S. aureus* aux héparanes sulfates des cellules hôtes. Du côté de l'hôte, nous caractérisons le rôle antitumoral des superantigènes de *S. aureus* et leur effet de conversion des cellules T régulatrices en Th17 et son implication possible dans des pathologies autoimmunes. Finalement, nous étudions la réponse immunitaire innée des cellules épithéliales et myéloïdes vis-à-vis de *S. aureus* (PVL+) et des bactéries intracellulaires *Legionella* et *Francisella*. Nous cherchons à identifier les facteurs bactériens et les facteurs d'hôte conduisant

¹ En particulier dans le cas des pneumonies nécrosantes à *S. aureus* producteurs de PVL, de la légionellose dont le poumon est l'organe cible et de *Francisella tularensis* utilisée en aérosol dans le cadre de la menace bioterroriste.

à l'activation et à la régulation de l'inflammasome, une voie de signalisation de l'immunité innée, importante dans la lutte contre les infections bactériennes.

Ainsi, par nos 3 niveaux de recherche (clinique, microbiologique et immunologique), nous développons des thématiques intégrées du patient jusqu'aux mécanismes cellulaires et moléculaires de la maladie. 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 Valentine,² et à montrer que ce phénomène se produisait au niveau mondial avec des clones différents apparaissant comme spécifiques de continents³. 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 étude⁵ 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

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. A histidine-to-arginine substitution in Panton-Valentine leukocidin from USA300 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* does not impair its leukotoxicity. Infect Immun. 2010 Jan;78(1):260-4. Epub 2009 Oct 12.

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. La question du potentiel épidémique accru de la souche USA300 en comparaison par exemple de la souche de SARM-communautaire européenne ST80, reste donc entière. Néanmoins, une étude observationnelle récente effectuée en Algérie en collaboration avec le CNR révèle que le potentiel épidémique du SARM-CO ST80 pourrait être largement aussi important qu'USA300 avec une prévalence de 35% de SARM (dont une très large majorité de ST80 PVL+) parmi les souches le *S.aureus* responsable d'infections communautaires⁹.

Clinique et physiopathologie des pneumonies nécrosantes à *S.aureus* producteurs de la leucocidine de Panton Valentine. Notre travail publié en 2002¹⁰ 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 décès¹¹. 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 aiguë des échanges gazeux), d'autre part induit une mort des polynucléaires par un effet pro-apoptotique et nécrotique dose dépendant¹². Sur le plan de la physiopathologie, un modèle de pneumonie nécrosante a été mis au point en collaboration avec G. Bowden (Houston, Texas) et des souches isogéniques pour la PVL ont été testées dans ce modèle. Nous avons confirmé le rôle déterminant de la PVL dans la

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 Pantón-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.

9 Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A, Ziane H, Djennane F, Neggazi M, Benhabyles B, Bes M, Tazir M, Etienne J, Ramdani-Bouguessa N. [High prevalence of community and hospital acquired infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing Pantón-Valentine leukocidin gene in Algiers.]. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Oct 27.

¹⁰ 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 Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002 Mar 2;359(9308):753-9.

¹¹ 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 Pantón-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2007;45:315-21.

¹² 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* Pantón-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*. 2005 Nov;115(11):3117-27.

constitution de la pneumonie chez la souris, y compris en utilisant la souche USA300 et son dérivé isogénique délété dans luk-PV^{13,14}. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de pneumonie chez le lapin à l'occasion d'un travail en collaboration avec H. Chambers (San Francisco, Californie)¹⁵. Par ailleurs, 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-positives à la surface de l'épithélium respiratoire et à la matrice extracellulaire. 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 épithéliums¹⁶.

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 nécrosante¹⁷ ; 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*^{18,19}. D'un point de vue translationnel, ces résultats nous ont conduit à mettre au point en collaboration avec bioMérieux, un test de détection rapide de la PVL dans les échantillons pathologiques. Ainsi, un test immuno-chromatographique sur

¹³ 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.

¹⁴ Brown EL, Dumitrescu O, Thomas D, Badiou C, Koers EM, Choudhury P, Vazquez V, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Bowden MG. The Panton-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Feb;15(2):156-64

¹⁵ Diep B. et al. Polymorphonuclear Leukocytes Mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin-Induced Lung Inflammation and Injury. *PNAS* 2010.

¹⁶ 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 Sep 25;4(9):e7204

¹⁷ 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.

¹⁸ 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

¹⁹ Verkaik NJ, Dauwalder O, Antri K, Boubekri I, de Vogel CP, Badiou C, Bes M, Vandenesch F, Tazir M, Hooijkaas H, Verbrugh HA, van Belkum A, Etienne J, Lina G, Ramdani-Bouguessa N, van Wamel WJ. Immunogenicity of toxins during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2010 Jan 1;50(1):61-8

membrane a été développé et son évaluation révèle une excellente performance globale de ce test (cf. chapitre 2)²⁰.

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-lactamines²¹. 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 linézolide²²; les données cliniques confirmant qu'une prise en charge rapide incluant des antibiotiques anti-toxiniques est associée à une issue favorable²³. 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.

20 Badiou C, Dumitrescu O, George N, Forbes AR, Drougka E, Chan KS, Ramdani-Bouguessa N, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Hsu LY, Tazir M, Spiliopoulou I, Nimmo GR, Hulten KG, Lina G. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin by enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2010 Feb 3.

21 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.

22 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.

23 Rouzic N, Janvier F, Libert N, Javouhey E, Lina G, Nizou JY, Pasquier P, Stamm D, Brinquin L, Pelletier C, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Gillet Y. Prompt and successful toxin-targeting treatment of three patients with necrotizing pneumonia due to *Staphylococcus aureus* strains carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *J Clin Microbiol.* 2010 Feb 3.

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 primitives²⁴ et les infections ostéo-articulaires²⁵ sont associées à des souches productrices de PVL. Nous avons conduit avec P. Del Giudice (service de dermatologie infectieuse de l'hôpital de Fréjus) un travail prospectif entre juillet 2003 et juin 2008, visant à étudier la prévalence de la PVL dans les souches responsables d'abcès cutanés primitifs et secondaires. Ce travail révèle une prévalence du gène de la PVL dans 92.7% des abcès primitifs contre seulement 12.5% des secondaires²⁶. Ces résultats très catégoriques ont été obtenus grâce à des définitions très strictes du caractère primitif vs secondaire de l'infection et à l'implication systématique d'un dermatologue sénior pour l'inclusion des patients. Concernant les infections ostéo-articulaires pour lesquelles les données cliniques sont en faveur d'une contribution de la PVL à la sévérité des infections²⁷, nous avons établi en collaboration avec le Dr Anne-Claude Crémieux, un modèle d'infection ostéo-articulaire chez le lapin afin de tester le rôle de la PVL dans 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-osseuses²⁸⁻²⁹, ainsi qu'à l'ampleur de l'inflammation systémique, rejoignant ainsi les observations humaines. Le projet actuel vise à utiliser ce modèle en vue de tester différentes stratégies thérapeutiques telles que les antibiotiques à activité anti-toxinique ainsi que les immunoglobulines polyvalentes.

²⁴ 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.

²⁵ 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 Nov;26(11):1042-8.

²⁶ del Giudice P, Blanc V, de Rougemont A, Bes M, Lina G, Hubiche T, Roudière L, Vandenesch F, Etienne J. Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains. *Dermatology*. 2009;219(4):299-302

²⁷ 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 Nov;26(11):1042-8.

²⁸ 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

²⁹ Crémieux AC, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Ct JF, Muffat-Joly M, Lilin T, Etienne J, Vandenesch F, Saleh-Mghir A. Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS One*. 2009 Sep 25;4(9):e7204.

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 Vbeta du récepteur TCR2, au niveau des parties constantes de la portion variable de certains types de chaînes Vbeta. 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 Vbeta des récepteurs TCR2. Une exploration complète de la spécificité Vbeta des 20 SAG de *S. aureus* a été réalisée et permet d'établir le pattern Vbeta caractéristique de chaque SAG³⁰. Par ailleurs la comparaison des transcriptomes des PBMC exposés SEG vs SEA, confirme que seule SEA est capable d'induire une réponse pro-inflammatoire précoce, majoritairement lymphocytaires T et plus faiblement monocytaires. Par ailleurs, nous identifions la mise en place d'une réaction anti-inflammatoire simultanée, comme précédemment observée lors de sepsis bactérien³¹. Pour confirmer nos résultats, nous avons débuté une étude de la réponse inflammatoire/anti-inflammatoire chez les patients développant un choc toxique staphylococcique.

Relation structure fonction de l'ARN régulateur de la virulence (ARNIII) de *S.aureus* et des nouveaux ARN non codants. 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 inhibiteurs³². 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 régulation³³. 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

30 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 May;77(5):2043-50

31 Dauwalder O, Pachot A, Cazalis MA, Paye M, Faudot C, Badiou C, Mouglin B, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Monneret G. Early kinetics of the transcriptional response of human leukocytes to staphylococcal superantigenic enterotoxins A and G. *Microb Pathog*. 2009 Sep;47(3):171-6.

32 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

33 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.

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 RNaseIII³⁴. 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^{35,36}. 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 Blanc).

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 dizaines de candidats dont l'expression a été vérifiée *in vivo* par Northern blot. La caractérisation des onze meilleurs ARN candidats (conjointement entre les laboratoires de Lyon et Strasbourg) a été débutée en utilisant différentes approches (cartographie en solution, invalidation, transcriptome, protéome, etc), ce qui a donné lieu à une première publication³⁷. L'un de nos objectifs actuels 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-

34 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.

35 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.

36 Clément Chevalier, Sandrine Boisset, Benoit Masquida, Cédric Romilly, Pierre Fechter, Thomas Geissmann, François Vandenesch and Pascale Romby. Staphylococcus aureus RNAIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA dégradation. *PLOS Pathogen*, in press

37 Geissmann T, Chevalier C, Cros MJ, Boisset S, Fechter P, Noirot C, Schrenzel J, Francois P, Vandenesch F, Gaspin C, Romby P. A search for small noncoding RNAs in Staphylococcus aureus reveals a conserved sequence motif for régulation. *Nucleic Acids Res.* 2009 Nov;37(21):7239-57

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. Les premiers résultats, obtenus avec une série de patients mucoviscidosiques révèlent une expression différentielle des petits ARN entre les conditions *in vivo* et *in vitro*, certains ayant une expression *in vivo* > *in vitro*, d'autres au contraire étant réprimés *in vivo*.

7 - LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

7-1- Liste des publications

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. 2009;63:420-421.

Maugat S; de Rougemont A, Aubry-Damon H, Reverdy ME, Georges S, Vandenesch F, Etienne J, Coignard B.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among a network of French private-sector community-based medical laboratories.

Med Mal Infect. 2009;39:311-318.

Brown EL, Dumitrescu O, Thomas D, Badiou C, Koers EM, Choudhury P, Vazquez V, Etienne J, Lina G; Vandenesch F; Bowden MG.

The Panton-Valentine Leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300.

Clin Microbiol Infect. 2009;15:156-64.

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;15:144-148.

Thomas D, Dauwalder O, Brun V, Badiou C, Ferry T, Etienne J, Vandenesch F, Lina G.
Staphylococcus aureus superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns.
Infect Immun. 2009;77:2043-2050.

Tristan A, Benito Y, Montserret R, Boisset S, Dusserre E, Penin F, Ruggiero F, Etienne J,
Lortat-Jacob H, Lina G, Bowden MG, Vandenesch F.
The signal peptide of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin LukS component
mediates increased adhesion to heparin sulfates.
PLoS ONE. 2009;4:5042

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 Vbeta signature in two forms of
streptococcal toxic shock syndrome.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28:671-676.

Del Giudice P, Blanc-Amrane V, Bes M, Lina G, Hubiche T, Counillon, Vandenesch F, Etienne J.
A case of indigenous skin infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
USA300 in France.
Ann Dermatol Venereol. 2009;136:541-542.

Dauwalder O, Pachot A, Cazalis MA, Paye M, Faudot C, Badiou C, Mouglin B, Vandenesch F,
Etienne J, Lina G, Monneret G.
Early kinetics of the transcriptional response of human leukocytes to staphylococcal
superantigenic enterotoxins A and G.
Microb Pathog. 2009;47:171-176.

Del Giudice P, Blanc V, de Rougemont A, Bes M, Lina G, Hubiche T, Roudière L, Vandenesch F, Etienne J.
Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive
Staphylococcus aureus strains.
Dermatology. 2009;219:299-302.

Crémieux AC, Dumitrescu O, Lina G, Vallée C, Côté JF, Muffat-Joly M, Lilin T, Etienne J, Vandenesch F, Saleh-Mghir A.

Panton-Valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis.

PLoS One. 2009;4:e7204.

Geissmann T, Chevalier C, Cros MJ, Boisset S, Fechter P, Noirot C, Schrenzel J, François P, Vandenesch F, Gaspin C, Romby P.

A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation.

Nucleic Acids Res. 2009 Sep 28.

Chiquet C, Maurin M, Thuret G, Benito Y, Cornut PL, Creuzot-Garcher C, Rouberol F, Pechinot A, Lina G, Romanet JP, Bron A, Vandenesch F.

Analysis of diluted vitreous samples from vitrectomy is useful in eyes with severe acute postoperative endophthalmitis.

Ophthalmology. 2009;116:2437-2441.

Vandenesch F, Lina G, Gillet Y, Etienne J, Crémieux AC.

The end of the controversy : Panton Valentine is the culprit.

Med Sci. 2009;25:984-986.

Gallon O, Guillet-Caruba C, Lamy B, Laurent F, Doucet-Populaire F, Decousser JW; Collège de Bactériologie Virologie Hygiène Study Group (ColBVH).

In vitro activity of daptomycin against Staphylococci isolated from bacteremia and community-onset skin and soft tissue infections in France: data from two nationwide studies.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 28:1209-15.

Etienne J, Dumitrescu O.

Panton-Valentine leukocidin associated *Staphylococcus aureus* infections.

BMJ. 2009;339:b4083.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) including F. Laurent and J. Etienne.

Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements.

Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec;53(12):4961-7.

Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A, Ziane H, Djennane F, Neggazi M, Benhabyles B, Bes M, Tazir M, Etienne J, Ramdani-Bouguessa N.

High prevalence of community and hospital acquired infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin gene in Algiers.

Pathol Biol (Paris). 2009 Oct 27. French.

Zribi M, Etienne J, El Euch D, Zribi H, Bes M, Meugnier H, Masmoudi A, Osman AB, Fendri C.

Detection of the first strain of glycopeptide intermediary *Staphylococcus aureus* in Tunis Rabta hospital. Pathol Biol (Paris). 2009 Nov 24. French.

7-2- Communications orales et présentations affichées à des congrès

Dumistrescu O, Badiou C, Benito Y, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G.

Beta-lactams targeting septum formation increase Panton-Valentine leukocidin expression by *Staphylococcus aureus*.

Présentation affichée : ESCMID. Helsinki (Finlande), 16-19 mai 2009.

Raulin O, Durand G, Croze M, Bes M, Meugnier H, Vandenesch F, Gillet Y, Lina G, Laurent F, Etienne J.

Molecular characterization of *S. aureus* involved in Varicella superinfections in France.

Communication orale : ESCMID. Helsinki (Finlande), 16-19 mai 2009.

Rasigade JP, Trouillet S, Ferry T, Tigaud S, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F.

Influence of daptomycin and rifampicin on the survival of *Staphylococcus aureus*-infected osteoblast-like MG-63 cells.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Boisset S, Freydière AM, Meugnier H, Bes M, Bergeron M, Gardon C, Courtier C, Spinelli C, Bouveyron C, Baida N, Benito Y, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Dauwalder O.

Identification des staphylocoques par spectrométrie de masse MALDI-TOF (AXIMA SARAMIS SIRWEB-MALDI-TOF) : comparaison aux identifications du Centre National de Référence des Staphylocoques.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Saleh-Mghir A, Dumitrescu O, Lina G, Vallée C, Coté JF, Muffat-Joly M, Lilin T, Etienne J, Vandenesch F, Crémieux AC.

Panton-Valentine leucocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Badiou C, Dumitrescu O, Nimmo G, Ramdani-Bouguessa N, Hulten K, Spiliopoulou I, Hsu LY, Ratat C, Bes M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Lina G.

Détection rapide de la leucocidine de Panton Valentine de *Staphylococcus aureus* dans des échantillons cliniques par test ELISA et immuno-chromatographique.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Dauwalder O, Benito Y, Carbonnelle E, Bes M, Meugnier H, Etienne J, Lina G, Nassif X, Vandenesch F.

Spectrométrie de masse et détection de la leucocidine de Panton-Valentine de *Staphylococcus aureus*.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Perrier G, Ratat C, Bes M, Badiou C, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Freydière AM.

Détection rapide de la leucocidine de Panton-Valentine de *Staphylococcus aureus* à partir de colonies à l'aide d'un test immuno-chromatographique.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Raulin O, Fournier D, Bonfils M, Bes M, Meugnier H, Salord H, Roure-Sobas C, Grando J, Picaud JC, Vandenesch F, Tigaud S, Laurent F.

Endémo-épidémie à *Staphylococcus capitis* résistants à la méthicilline dans les services de néonatalogie en France.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Raulin O, Rasigade JP, Parmeland L, Freydiere AM, Roure Sobas C, Salord H, Etienne J, Tigaud S, Laurent F. La résistance à la méticilline en 5 minutes : nouveau test immunochromatographique sur isolement primaire de *Staphylococcus spp*.

Communication orale : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Laurent F, Dumitrescu O, Célard M, Bes M, Tatevin P, Reverdy ME, Tristan A, Doco-Lecompte T, Meugnier H, Lina G, Etienne J, Vandenesch F.

Species distribution, genomic diversity and antibiotic susceptibility patterns among staphylococci causing infective endocarditis : Analysis of a one-year survey in France (EI 2008).

Présentation affichée : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Dumitrescu O, Reverdy ME, Bes M, Meugnier H, Ploton C, Freydière AM, Reix P, Bellon G, Vandenesch F, Etienne J.

Etude phénotypique et génotypique de 9 souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides, isolées chez des enfants atteints de mucoviscidose.

Présentation affichée : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Zribi M, Etienne J, El Euch D, Zribi H, Bes M, Meugnier H, Masmoudi A, Osman AB, Fendri C. Détection de la première souche de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides à l'hôpital la Rabta de Tunis.

Présentation affichée : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy ME, Etienne J, Vandenesch F, Lina G.

L'effet modulateur des antibiotiques actifs sur *S. aureus* résistant à la méticilline sur l'expression des exotoxines staphylococciques.

Présentation affichée : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Rouzic N, Janvier F, Libert N, Javouhey E, Lina G, Nizou JY, Stamm D, Brinquin L, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Gillet Y.

Pneumonies nécrosantes à *S. aureus* producteurs de PVL : à propos de 3 cas et de l'intérêt d'une antibiothérapie anti-toxinique précoce.

Présentation affichée : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

Rasigade JP, Bes M, Gillet Y, Hubert P, Lina G, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F.

The emerging threat of livestock-associated *Staphylococcus aureus* : first case report of lethal necrotizing pneumonia caused by a Panton-Valentine leukocidin-positive ST398 strain.

Présentation affichée : 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 3-4 décembre 2009.

7-3- Communications sur invitation à des congrès

Vandenesch F. Panton Valentine Leukocidin : more than just a pore. Fondation FINOVI, Journée d'échanges sur le thème de la virulence. Institut de Biologie Structurale, Grenoble, 8 janvier 2009

Vandenesch F. Panton Valentine Leukocidin from *Staphylococcus aureus* : more than just a pore. INRA-Japan Society for the Promotion of Science workshop. Paris, 30 janvier 2009

Etienne J. What do we know about the pathogenesis of CA-MRSA infections? 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, Finland 16-19 May 2009.

Lina G. *Staphylococcus aureus* et leucocidine de Panton-Valentine. « Des bactéries, la résistance... et l'homme dans tout ça... ». Nancy, juin 2009.

Etienne J. *Staphylococcus aureus* and toxin-associated diseases. 27th annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases. Bruxelles, Belgique, 9-13 juin 2009.

Etienne J. Leucocidine de Panton Valentine : un marqueur de gravité des infections à *Staphylococcus aureus*. 10^{es} Journées Nationales d'Infectiologie. Lyon, France, 10-12 juin 2009.

Laurent F. Etude ONERBA - SARM PVL et TSST1. 10^{es} Journées Nationales d'Infectiologie. Lyon, France, 10-12 juin 2009.

Vandenesch F. Panton Valentine Leukocidin from *Staphylococcus aureus*. European Workshop on Bacterial Protein Toxins. Obernai – France. 27th June - 02nd July 2009

Vandenesch F. The signal peptide of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin LukS component mediates increased adhesion to extracellular matrix components through an heparan sulfate bridge. 6th International Proteoglycan Meeting, Aix les Bains, 13-17 septembre 2009

Laurent F. Physiopathologie et épidémiologie des infections staphylococciques. Symposium Sanofi. Toulouse, 22-23 octobre 2009

Dauwalder O. Facteurs de virulence staphylococciques : les toxines de *Staphylococcus aureus*. Congrès annuel Société Tunisienne de Microbiologie. Hotel Abous Nawas - Hammamet, Tunisie, 31 octobre 2009

Laurent F. Mise au point sur le biofilm. 29e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 4 décembre 2009

Lina G. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin. Seminaire of Microbiology. Cardiff, Royaume-Uni, décembre 2009.

8 - PROGRAMME D'ACTIVITE N+1 ET N+2

• Analyse « Vbeta »

La détermination des « répertoires Vbeta » du TCR des LyT est un des rares outils de diagnostic et de confirmation des CTS disponibles. Cependant, cet outil reste imparfait :

- Il nécessite des cellules mononuclées du sang périphérique [PBMC] acheminé en moins de 24h et non du sang total. L'utilisation de tubes de prélèvements effectuant la séparation cellulaire (*i.e.* tubes Becton Dickinson CPT®) pourrait permettre d'augmenter le temps entre le prélèvement sanguin et la réalisation de l'analyse. Une mise au point et une validation de la méthodologie de détermination des « répertoires Vbeta » du TCR pourrait être réalisée au cours de l'année prochaine afin de rendre cette technique accessible à l'échelle régionale voire nationale.

- La détermination des « répertoires Vbeta » actuellement réalisée par le CNR-Staph est parcellaire, couvrant les principaux répertoires Vbeta humains (environ 75%). L'extension de cette méthodologie aux autres répertoires pourrait contribuer à augmenter la spécificité de la méthodologie permettant de réduire la redondance de certaines signatures toxiques.

- La détermination des « répertoires Vbeta » n'est pas un outil de diagnostic précoce des CTS-M ou CTS-NM, un délai de 48-72h étant parfois nécessaire à l'observation de l'expansion clonale induite par les superantigènes. L'association de la détermination des « répertoires Vbeta » du TCR et d'un marqueur lymphocytaire d'activation précoce (*i.e.* CD69) pourrait augmenter la sensibilité de cet outil diagnostic. La mise au point, la détermination des valeurs usuelles chez l'individu normal (adulte et enfant) et la validation de la méthodologie pourrait être réalisée au cours de l'an prochain.

- **Evaluation de l'immunodépression au cours du choc toxique staphylococcique**

Nos données préliminaires montrent l'évolution indépendante entre l'expression du HLA-DR monocytaire, utilisé comme marqueur de gravité des patients en choc toxique staphylococcique et l'expansion clonale des « répertoires Vbeta » du TCR des lymphocytes T détectée dans le sang. De plus, une augmentation de la numération (pourcentage et valeur absolue) en LyTreg semble être observée nécessitant des études complémentaires visant à : *i)* confirmer ces données sur une plus grande série de patients en CTS ; *ii)* explorer la fonctionnalité suppressive de ces LyTreg en réalisant un test de suppression « *ex vivo* » après purification des Ly Treg ; *iii)* évaluer l'expression des « répertoires Vbeta » du TCR exprimés par ces LyTreg et *iv)* évaluer la réponse cytokinique induite par cette sous entité lymphocytaire après marquages intra-cytoplasmiques (TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17).

- **Evaluation de la spectrométrie de masse MALDI TOF pour la détection de la leucocidine de Panton et Valentine [PVL]**

Nos résultats montrent que la spectrométrie de masse [SM] MALDI TOF ne permet pas la détection des souches productrices de PVL. Cependant, cette approche méthodologique reste d'intérêt et nécessite des travaux complémentaires. Dans un premier temps, la protéine recombinante, formée de ses deux sous unités (LukF et LukS) sera analysée par SM à la recherche de pics spécifiques. Dans un second temps, les sensibilités et spécificités des pics précédemment identifiés seront validées sur une collection de souches isogéniques puis cliniques appartenant à des clones de ST différents.

- **Evaluation de la spectrométrie de masse MALDI TOF pour la détection de la toxine du choc toxique staphylococcique [TSST-1]**

La détection précoce de la TSST-1 au cours du processus d'identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI TOF représenterait une approche intéressante. En utilisant une démarche similaire à celle de la PVL, l'étude des spectres obtenus après analyse de la protéine recombinante pourrait permettre l'identification de pics spécifiques, pics dont la spécificité et la sensibilité seraient alors validées sur une collection de souches isogéniques puis cliniques

possédant ou non la TSST-1 et appartenant à des clones de ST différents.

- **Etude "Etude VIRSTA : facteurs associés à une localisation à l'endocarde au cours des bactériémies à *Staphylococcus aureus*: étude de cohorte prospective, nationale, multicentrique"**.

Type de collaboration : CNR – CHU Français dans le cadre d'un PHRC nationale coordonnée par Dr Vincent Le Moing (CHRU Montpellier)

Ce protocole (voir description ci-dessus) se poursuivra jusqu'en Septembre 2011.

- **Etude "Etude PVL-STA : leucocidine de Panton Valentine : facteur indépendant de gravité des pneumonies à *Staphylococcus aureus*"**

Type de collaboration : CNR – CHU et CHG Français dans le cadre d'un PHRC nationale coordonné par Pr François Vandenesch (Hospices Civils de Lyon – CNR des Staphylocoques)

L'objectif de ce travail est de confirmer le rôle de la PVL comme facteur de gravité indépendant des pneumonies à *S. aureus* en comparant un groupe de patients hospitalisés en réanimation pour une pneumonie communautaire à *S. aureus* PVL+ avec un groupe de patients hospitalisés en réanimation pour une pneumonie communautaire à *S. aureus* ne produisant pas la PVL. Les groupes seront analysés en termes de survie et de gravité (scores de gravité, durée de séjour en réanimation et en hospitalisation, etc.). Les objectifs secondaires seront : i) de comparer les groupes de patients atteints de pneumopathies sévères à *S. aureus* PVL + avec évolution favorable et le groupe avec évolution défavorable (décès attribuable) afin d'identifier les facteurs associés au bon pronostic (antibiotiques à activité anti-toxinique versus sans activité anti-toxinique, utilisation des immunoglobulines polyvalentes ; ii) étudier la proportion de SARM parmi les souches de *S. aureus* PVL + et étudier la distribution clonale des souches SARM et non SARM ; iii) évaluer l'état immunitaire du patient vis à vis de la PVL au moment de la maladie : un prélèvement de sérum pour recherche d'anticorps anti-PVL sera réalisé à l'inclusion de tous les patients ; iv) rechercher une prédisposition génétique de type Mendélienne conduisant à une dysfonction de l'immunité innée. Ceci s'oppose aux prédispositions complexes détectées par des « *single nucleotid polymorphisms* » et nécessitant l'analyse de grandes séries de patients.

Le protocole vise à organiser et centraliser les prélèvements des patients et de leurs familles au sein du Centre de Biotechnologie Cellulaire (Dr M.T. Zobot) du Centre de Biologie et Pathologie Est du CHU de Lyon. L'exploitation des échantillons à des fins d'analyse immuno-génétique sera réalisée dans un second temps et sur un budget spécifique (ANR, FINOVI ou autre), par le laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses à la faculté Necker à Paris (GHMI-INSERM-U550) et pour la partie transcriptomique par le Baylor Institute for Immunology

Research (Dallas, Texas, USA, Dir Jacques Banchereau). La stratégie générale suivra celle qui a permis au GHMI de découvrir les mutations impliquées dans la susceptibilité Mendélienne à développer des infections mycobactériennes disséminées, les infections invasives à pneumocoque, et plus récemment dans les encéphalites herpétiques [Bustamante et al. 2008 ; von Bernuth et al. 2008].

Tous les patients de l'étude auront si possible un bilan immunologique standard comprenant un dosage pondéral des IgG, A et M ; un dosage des IgE et une exploration de la voie classique du complément. De plus, chez certains patients pédiatriques (âgés de moins de 15 ans) et les patients issus de parents consanguins, une approche « circuit candidat » sera réalisée à la recherche de défauts fonctionnels dans certains circuits immunitaires impliqués dans la réponse à *S. aureus*, notamment les gènes impliqués dans l'immunité phagocytaire, les gènes impliqués dans la reconnaissance des bactéries et dans la réponse immunitaire innée. Ces défauts seront explorés sur les cellules sanguines +/- fibroblastes des patients suivant des méthodes dépendant des circuits à étudier. D'autres voies pourront être étudiées en fonction de l'évolution de projets de recherche actuellement en cours dans le laboratoire, notamment de la découverte de nouvelles voies de signalisation contrôlant l'immunité contre les bactéries pyogènes chez l'homme.

Le second axe de cette stratégie est une approche par criblage complet du génome qui permet de détecter l'effet de gènes dont le rôle était *a priori* inconnu. Cette approche sera possible si l'étude des caractéristiques des familles recueillies lors de notre étude permet d'identifier certaines familles avec un mode particulier de transmission génétique (en particulier des familles consanguines). Nous calculerons les valeurs attendues de lod-score dans le cadre d'une analyse de liaison génétique sur les familles ainsi identifiées, et, si l'approche par criblage complet se révèle possible, nous proposerons le projet au Centre National de Génotypage. Il est à noter que dans un contexte de familles consanguines, les méthodes d'analyse de liaison génétique par '*homozygosity mapping*' sont très puissantes et peuvent être envisagées avec un très petit nombre de familles (3 à 4 familles) [Lander et al. 1987]. Pour les patients n'appartenant pas à des familles informatives pour la liaison génétique, deux approches complémentaires explorant le génome entier seront développées. La première fait appel à une étude pan-génomique du transcriptome de patients sélectionnés ayant présenté une pneumonie nécrosante à *S. aureus*. Cette stratégie a déjà été appliquée avec succès chez des patients présentant des déficits de l'immunité innée identifiés sur le plan moléculaire (déficits en IRAK-4, MyD88, NEMO, TLR3 et Unc93B) qui pourront servir de contrôles [von Bernuth et al. 2008]. La deuxième approche sera d'explorer les patients par un séquençage complet de leur exome (ensemble des régions codantes du génome). Il s'agit d'une nouvelle technique qui sera très bientôt disponible à une large échelle et qui est très performante pour identifier des mutations rares dans les maladies mendéliennes [Ng et al. 2009]. Tous les outils et concepts

d'épidémiologie génétique requis pour ce projet sont disponibles au laboratoire de GHMI et l'institut Baylor qui a une grande expérience et une expertise internationalement reconnue dans ce domaine.

- **Projet ANR TOXAUREUS "Virulence et propagation de *Staphylococcus aureus* : une approche globale pour la santé humaine et animale"**

Type de collaboration : CNR – AFSSA – CNRS – INRA dans le cadre d'un projet ANR coordonné par Pr Gilles Vergnaud (CNRS – Paris Orsay)

Le projet proposé tire parti de deux technologies dont le coût et les performances permettent d'envisager un typage systématique de tout isolat. La première technologie dite MLVA utilise le polymorphisme des répétitions en tandem de façon comparable à ce qui est utilisé pour réaliser les empreintes génétiques humaines. La seconde utilise la technologie des microarrays. Les deux technologies sont suffisamment matures pour avoir abouti chacune à des développements industriels et commerciaux. L'approche MLVA cible le génome essentiel et permet de réaliser très efficacement des comparaisons de souches, l'approche « microarray » cible le génome accessoire.

Ces technologies rendent possible des études de grande ampleur. Le projet vise à étudier des collections de souches d'origine animale, humaine, ainsi que issue de la filière alimentaire. Plus de 2500 souches seront étudiées, à raison de respectivement 1000, 1000 et 500 par filière. L'investigation « souches d'origine humaine » permettra d'étudier avec un suivi au cours du temps l'évolution des souches présentes dans une communauté humaine fermée, avec ou sans pression antibiotique. Les investigations « souches animales » et « filière alimentaire » tireront parti de collections existantes, et permettront d'étudier précisément l'évolution temporelle de ces souches et les échanges entre les 3 filières.

Le consortium pluridisciplinaire rassemblé pour ce projet est idéalement placé pour réaliser une étude d'une telle envergure, puisqu'il compte les acteurs français majeurs de chacun des différents aspects qui seront abordés (CNR des staphylocoques, AFSSA, INRA, CNRS). Il associe également comme sous contractant majeur une TPE de biotechnologie qui développe actuellement le premier service de typage MLVA de *S. aureus*.

Dans le cadre de ce projet, le CNR des Staphylocoques prendra en charge l'analyse de 500 à 600 souches par microarrays.

- **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 *Staphylococcus aureus* 2006-2007 seront caractérisés 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 2010-2011 : 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 réalisée de façon identique (protocole et technique de caractérisation (*spa*-typing)) et simultanée (1er Septembre 2010 – 28 Février 2011) dans 27 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.

- **Caractérisation de 90 nouveaux cas de pneumonie nécrosante.**

La dernière publication rapportant une série clinique de 50 cas a été publiée en 2007 et a porté sur des données cliniques rassemblées jusqu'en 2005. Depuis cette date, 90 nouveaux cas de pneumonie nécrosante ont été signalés au CNR. Chaque signalement a été associé à une fiche clinique remplie par les cliniciens. L'objectif 2010 est d'analyser cette nouvelle série clinique et d'évaluer notamment les tendances démographiques et épidémiologiques (évolution de l'âge médian, de la mortalité, de la fréquence de la résistance à la méticilline, de la survie en fonction du taux de leucocytes, etc...).
