

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2014

Thèse n° 2014-TOU3-2073

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance

du Mémoire du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

(conformément au décret n°90-810 du 10 septembre 1990 modifié par arrêté du 4 juillet 2003)

SOUTENU DEVANT LE JURY INTER-REGIONAL DU SUD-OUEST

par Guillaume VIEU

Le 26 Septembre 2014

Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse.

Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants.

JURY

PRESIDENT : Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN

ASSESEURS : Madame le Professeur Nicole MARTY

Monsieur le Docteur Erick GROUTEAU

Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN

DIRECTEUR DE THESE : Madame le Docteur Marie-Françoise PRERE

Remerciements

*A Madame le Professeur Christine Roques-Ceschin,
Vous avez bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Soyez assurée de ma sincère gratitude et de mon profond respect.*

*A Madame le Docteur Marie-Françoise Prère,
Pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Votre compétence et votre efficacité m'inspirent le plus grand respect. Travailler avec vous était aussi agréable qu'enrichissant, je n'oublierai pas votre gentillesse au quotidien et vos conseils précieux qui m'ont guidé tout au long de ce travail. Soyez assurée de ma profonde gratitude.*

*A Madame le Professeur Nicole Marty,
Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de rejoindre ce jury. Je vous en suis très reconnaissant.*

*A Monsieur le Docteur Erick Grouteau,
Votre expertise clinique m'a été d'une très grande aide pour l'étude des dossiers patient. Je vous remercie aussi pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu au service de réanimation pédiatrique durant les réunions avec le laboratoire de bactériologie. Merci d'avoir accepté de siéger à ce jury.*

*A Monsieur le Professeur Alexis Valentin,
Je suis ravi que vous ayez accepté de juger ce travail. Aujourd'hui encore, je me rappelle des cours de biologie animale et de parasitologie à la faculté de pharmacie. Mon passage au laboratoire de Parasitologie m'aura permis de découvrir votre activité hospitalière que vous exercez toujours avec le sourire. Votre humour et votre bonne humeur au quotidien sont pour moi un exemple.*

*A Françoise technicienne du secteur de biologie moléculaire de bactériologie,
Ton aide dans la réalisation des PCR, tes conseils et ton expertise ont été indispensables pour réaliser ce travail. Merci pour tout le travail accompli, pour ta gentillesse et ta patience lors de mon apprentissage de la biologie moléculaire.*

*Merci à Benoit Mantion, mon co-interne hygiéniste,
Toujours souriant depuis la 2^e année de fac, ton aide et ton expérience m'ont été indispensables pour l'étude du biofilm de *S. aureus*. Je n'oublierai pas cette journée entière que tu as passée avec moi pour extraire les souches et les passer au spectre de masse. Je n'oublie pas non plus tes exploits au foot sur la pelouse ou sur le baby de l'internat ! Encore merci.*

*A Melissa et Florianne stagiaires en BTS dans le secteur Hygiène,
Merci d'avoir accepté de travailler sur les biofilms de *S. aureus*. Je reste marqué par votre dynamisme et votre bonne humeur ! En espérant que vous ayez appris autant que moi lors de la réalisation de ce travail.*

Au Docteur Laurent Cavalié,

Pour vos conseils, votre expertise sur les différents complexes clonaux de S. aureus ainsi que sur les biofilms. Je vous remercie également pour toute l'aide que vous m'avez apporté au quotidien dans le service, votre disponibilité et votre gentillesse.

Au Docteur Damien Dubois,

Je vous remercie pour l'aide que vous m'avez apporté sur le spectromètre de masse. Je me souviens encore avec effroi de cette plaque, dont la préparation nous a pris la journée avec Benoit et qui refusait de passer à 19h jusqu'à votre intervention salvatrice. Merci aussi, pour tout ce que j'ai pu apprendre sur la bactériologie à vos côtés que ce soit en cours ou en validation.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHU de Toulouse,

Pour votre accueil chaleureux, votre disponibilité et tout ce que vous m'avez appris au cours de mon internat.

Et bien sur...

A ma famille,

Mon père, ma mère, mes deux frères et ma soeur qui me soutiennent depuis toujours.

A Jean Vignes,

Mon ami, binome depuis la faculté et que je vois avec toujours autant de plaisir. Je n'oublierai jamais les vacances, les soirées, les journées passées à bosser ensemble. Je suis certain que nous aurons encore bien d'autres moments d'anthologie après cette thèse.

A Yvan Tixador,

Mon cher co-interne et ami. Ton soutien, tes conseils m'ont énormément apporté pour rédiger cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de relire ce rapport, merci pour tous ces moments géniaux qu'on a vécu depuis ces 9 dernières années.

A Olivier, Magalie, Pauline, Pilo, Sophie, Claire ...

Mes amis avec qui j'ai passé tant de bons moments et qui m'ont tellement apporté durant toutes mes années de fac et celles qui ont suivi.

A mes co-internes,

Anne qui m'aura épaulé durant 2 ans d'internat ! Valentine, Marie, David mes premiers co-internes en bactériologie, Angèle, Yamen et Arnaud en hémato, Laura, Ana en Parasito. Merci à Caro ma référente niveau 2 d'hémato pour tous ses conseils ! Merci à Jon, Brice, Ludo qui ont perpétué glorieusement la tradition du baby foot à l'internat. Enfin merci à Benjamin, Manu, Alice-Anne, Shérazade et Saana que j'ai rencontré sur mes derniers semestres, je n'oublierai pas nos petits repas de service au centre-ville !

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
I. PREAMBULE	9
A. La leuocidine de Panton-Valentine	9
1. Historique	9
2. Origine et support génétique de la toxine de Panton-Valentine	11
3. Structure et mécanisme d'action	13
4. Physiopathologie et modèles proposés	15
B. Facteurs de pathogénicité de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1. Résistance aux antibiotiques	20
2. Résistances aux antiseptiques	22
3. Capsule polysaccharidique du staphylocoque	28
4. Biofilm bactérien	32
5. Les Phenol Soluble Modulins ou PSMs.....	38
6. Gène <i>sasX</i>	40
7. Les systèmes de régulation génique chez <i>S. aureus</i>	41
C. Epidémiologie des infections à <i>S. aureus</i> PVL+	46
1. Données épidémiologiques aux Etats-Unis	46
2. Prévalence estimée de la PVL en France	48
3. Facteurs de risque associés	49
D. Sémiologie clinique des infections à <i>S. aureus</i> sécréteurs de PVL	50
1. Infections cutanées.....	51
2. Pneumopathie nécrosante	52
3. Infections ostéo-articulaires.....	53
E. Détection biologique de la PVL	53
F. Stratégies thérapeutiques des infections à <i>S. aureus</i> PVL+	54
1. Infections cutanées.....	54
2. Infections pulmonaires	55

II.	ETUDE	56
A.	Objectifs de l'étude	56
B.	Matériel et méthode	57
1.	Population clinique étudiée	57
2.	Souches et caractères étudiés	58
3.	Gènes recherchés et techniques utilisées	61
4.	Recherche de résistance à la mupirocine	65
5.	Evaluation de la production de biofilm bactérien	65
6.	Analyse par spectrométrie de masse	67
C.	Résultats	69
1.	Dossiers retenus et caractéristiques démographiques	69
2.	Pathologie diagnostiquée et parcours de soins	69
3.	Antécédents cliniques et comorbidités	71
4.	Vaccinations et notion de voyage	71
5.	Etat clinique et biologie à l'admission	72
6.	Caractéristiques des souches	79
III.	DISCUSSION	87
A.	Présentation clinique des infections à <i>S. aureus</i> PVL+ en pédiatrie	87
B.	Etude de clonalité des souches	90
C.	Résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques	91
D.	Facteurs de virulence associés	92
E.	Caractère chronique de ces infections	93
	CONCLUSION	95
	BIBLIOGRAPHIE	96
	LISTE DES FIGURES	104
	LISTE DES TABLEAUX	106
	ABSTRACT	

Liste des abréviations

ACME : Arginine Catabolic Mobile Element	KO : Knock-Out
AGR : Accessory Gene Regulator	LBA : Liquide de lavage Broncho-Alvéolaire
AIP : AutoInducer Peptide	MLST : Multilocus Sequence Typing
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament	NaCl : Chlorure de Sodium
BHI : bouillon cœur-cerveille (Brain Heart Infusion)	NAG : N-AcétylGlucosamine
CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie	pb : paires de base
CCY : milieu additionné de caséine et d'extrait de levure	PCR : Polymerase Chain Reaction
CHG : Centre Hospitalier Général	Per Os : Voie orale
CHU : Centre Hospitalier Universitaire	PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice	PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin
CNR : Centre National de Référence	PLP2a : Protéine Liant les Pénicillines 2a
COS : gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton	PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
CP5/CP8 : polysaccharides de capsule type 5 / 8	PVL : Leucocidine de Panton-Valentine
CRP : Protéine C-Réactive	QAC : Quaternary Ammonium Compound
DNA ou ADN : Acide DésoxyriboNucléique	R&D : Recherche et Développement
DO : Densité Optique	RNA ou ARN : Acide RiboNucléique
DTPolio : Diphtérie – Tétanos - Poliomyélite	SARM : <i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	SA : <i>Staphylococcus aureus</i>
ERV : Entérocoque Résistant à la Vancomycine	SAS : <i>Staphylococcus aureus</i> Surface
GISA : <i>Staphylococcus aureus</i> de sensibilité Intermédiaire aux Glycopeptides	SSTIs : Skin and Soft Tissues Infections
HCSP : Haut Conseil de la Santé Publique	ST : Strain Type
ICT : Test ImmunoChromatographique	TBE : tampon Tris-Borate-EDTA
IL17 : Interleukine 17	UFC : Unité Formant Colonie
IV : voie IntraVeineuse	UV : rayonnements Ultra-Violets
	VS : Vitesse de Sédimentation

Introduction

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. Il fait partie des germes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. On le retrouve aussi bien dans les milieux communautaires qu'hospitaliers, il est au deuxième rang des infections nosocomiales derrière *Escherichia coli* et au deuxième des intoxications alimentaires après les salmonelles. Il intéresse un très grand nombre de sites infectieux et peut être isolé au laboratoire dans tous les types de prélèvements. On le retrouve dans des infections aussi bien locales qu'invasives dont l'issue clinique varie de la simple colonisation asymptomatique au décès rapide du patient.

Derrière cette variété de tableaux cliniques se cache une grande diversité génotypique et phénotypique des souches isolées au laboratoire. *Staphylococcus aureus* se caractérise des autres staphylocoques par l'expression d'un arsenal de toxines, de molécules d'adhésions, d'enzymes et autres facteurs de virulence qui lui permettent d'envahir son hôte et d'échapper à ses défenses immunitaires. Parmi ces toxines, la leucocidine de Panton-Valentine occupe une place particulière pour le microbiologiste et le clinicien. Retrouvée rarement parmi les isolats de *Staphylococcus aureus*, elle semble être à l'origine d'entités cliniques spécifiques notamment la redoutable pneumopathie nécrosante de l'adulte jeune. Les infections par ces staphylocoques intéressent souvent des enfants ou de jeunes adultes. Leur évolution est marquée par la chronicité ou la récurrence de l'infection malgré une antibiothérapie et un suivi adaptés. La leucocidine de Panton-Valentine jouerait un rôle important dans cette observation aux côtés d'autres facteurs comme la production de biofilm, la capsule polysaccharidique ou les Phenol Soluble Modulins récemment décrits.

Parallèlement au développement de l'antibiothérapie, des mécanismes de résistance sont apparus chez *S. aureus* jusqu'à l'émergence de staphylocoques dorés multi-résistants (SARM). Ces germes de traitement difficile étaient autrefois cantonnés au milieu hospitalier. Depuis le début des années 2000, les microbiologistes assistent à l'émergence rapide de souches de SARM communautaires notamment aux Etats-Unis où le nombre de ce type d'infection a considérablement augmenté en dix ans. Cette épidémie est marquée par la prédominance d'un clone de *Staphylococcus aureus* baptisé « USA300 » qui se propage rapidement aux Etats-Unis mais aussi en Europe notamment en Grèce et en Espagne. Ces SARM communautaires ont pour particularité d'exprimer fréquemment la leucocidine de Panton-Valentine qui peut donc servir de marqueur épidémiologique dans ce contexte.

Cette thèse s'articule en trois parties. La première est un travail bibliographique sur *Staphylococcus aureus*, la leucocidine de Panton-Valentine et les facteurs de virulence associés. Le but est de faire une synthèse sur les connaissances disponibles sur ces points sachant que de très nombreuses publications paraissent chaque année sur ce thème. Il subsiste de nombreuses interrogations sur la leucocidine de Panton-Valentine notamment son récepteur, son mécanisme d'action et le rôle précis qu'elle joue en physiopathologie humaine. En préambule, les données épidémiologiques disponibles aux Etats-Unis et en Europe ont été regroupées et analysées dans les sous-chapitres suivants. Cette partie se termine par les possibilités diagnostiques et thérapeutiques dont les professionnels de santé disposent à l'heure actuelle.

La deuxième partie concerne le travail réalisé dans le cadre de cette thèse. On y retrouve les objectifs de cette étude, l'analyse des dossiers cliniques de pédiatrie et les recherches réalisées sur les 95 souches de notre collection. Le principe des méthodes et les protocoles utilisés sont détaillés dans ce chapitre. Les résultats de ces recherches sont présentés en suivant, sous forme d'illustration, de schémas ou de tableaux.

La troisième et dernière partie est une discussion où sont mis en parallèle les résultats observés au CHU de Toulouse et les données retrouvées dans la littérature. Ce chapitre s'articule autour des particularités cliniques et épidémiologiques des souches productrices de leucocidine de Panton-Valentine.

I. PREAMBULE

A. La leucocidine de Panton-Valentine

1. Historique

En 1895, Denys et Van de Velde travaillent sur les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Ils développent des modèles animaux en injectant directement dans la cavité pleurale des suspensions de bactéries à des lapins et des chiens. Dans un de ces essais, ils observent une augmentation progressive du compte de leucocytes sur les liquides pleuraux. L'observation de ces cellules au microscope ne montre pas d'anomalie morphologique. Mais dans un autre essai, Van de Velde constate de nombreuses anomalies morphologiques sur les leucocytes recrutés ce qui témoigne d'une activité cytotoxique : cellules arrondies, noyaux condensés, pas de granules ou de pseudopodes et absence de mobilité. Cette activité leucotoxique était associée à une mortalité 20 fois plus importante pour l'animal et un compte de bactéries 1000 fois supérieur aux autres essais. Il en déduit que cette souche de staphylocoque sécrète une toxine de nature protéique capable de détruire les leucocytes qu'il nomme leucocidine.¹

Van de Velde n'avait cependant pas prouvé que la toxine était une protéine sécrétée par le staphylocoque. Ce travail est effectué en 1901 par Neisser M. et Wechsberg F. qui observent l'activité leucotoxique d'un filtrat stérile de *S. aureus*.² En parallèle, Kraus R. et Clairmont P. en 1900 mettent en évidence le pouvoir hémolytique du staphylocoque sur des globules rouges de lapin et l'attribuent à une « hémolysine ».³ Van de Velde avait aussi observé cette hémolyse sur du sang frais mais l'avait expliqué dans un premier temps par la consommation de l'oxygène par les bactéries. Ainsi au début du 20^e siècle, les actions cytolytiques *in vitro* de *S. aureus* sont bien connues mais il faut attendre 1922 pour que Julianelle L. A. démontre clairement que les activités leucotoxiques et hémolytiques sont le résultat de toxines différentes qui ne sont pas retrouvées dans toutes les souches.⁴

Ces travaux comportaient essentiellement des essais réalisés *in vitro* et sur l'animal, il restait encore à déterminer l'importance relative de ces différents facteurs en pathologie humaine. En 1932, Panton P. et Valentine F. publient une étude portant sur 22 cas de patients porteurs de lésions à *Staphylococcus aureus* variées : sycosis de la barbe, prostatite, ostéomyélite, panaris, furoncle et empyème. Cette étude confirme l'observation de Julianelle et semble indiquer que l'expression d'une leucocidine à un taux élevé (7 cas sur 22) est associée à des infections sévères chez l'humain.⁵

Quatre années plus tard en 1936, Valentine publie une nouvelle étude sur l'animal dans laquelle il montre que la leucocidine agit uniquement sur les polynucléaires, épargnant les lymphocytes et les globules rouges. Il observe aussi l'apparition d'une activité anti-leucocidine dans le sérum des patients atteints d'infections profondes. C'est au cours de cette même année que J. Wright emploie le terme de « leucocidine de Panton-Valentine » au cours d'une étude sur les différentes toxines des staphylocoques.⁶

En 1957, G.P. Gladstone and W.E. van Heyningen isolent des souches de *S. aureus* PVL+ et parviennent à produire la toxine en grande quantité dans un milieu CCY modifié. Cette technique est restée très longtemps utilisée dans les études qui ont suivi. Ils ont aussi montré que la PVL était fréquemment exprimée sur des sites d'infections (51% des échantillons) et moins fréquemment sur des prélèvements de portage nasal (2 échantillons seulement sur 10 au total). De plus, la leucocidine de Pantone-Valentine n'a jamais été retrouvée sur les staphylocoques coagulase négative commensaux.⁷

La toxine est finalement isolée et purifiée pour la première fois en 1959 par A. M. Woodin par chromatographie sur gel de carboxyméthylcellulose. Il découvre que celle-ci est composée de deux sous-unités qu'il baptise « Fast » et « Slow » en référence à leur vitesse de migration électrophorétique respective. L'identification des deux fractions a été confirmée par des techniques d'immunoprécipitation sur agar utilisant des antisérums spécifiques.⁸

L'origine de la toxine est découverte en 1972. Jan C. M. Van Der Vijver et son équipe montrent que la leucocidine peut être acquise suite à la conversion d'une souche de *S. aureus* par un bactériophage lysogénique, sans toutefois montrer que le phage est bien porteur des gènes codant pour chacune des sous-unités. Le mécanisme d'action de la PVL est également étudié au cours de cette période. Plusieurs tests utilisant des isotopes radioactifs sont mis au point, mettant en évidence l'action de la leucocidine de Pantone-Valentine sur la perméabilité des membranes des cellules phagocytaires.⁹ Toutefois, le mécanisme d'action moléculaire de la toxine n'est pas élucidé de même que son implication dans la physiopathologie des infections à *S. aureus*. Finck-Barbançon V. et son équipe ont proposé en 1993 le mécanisme qui est retenu aujourd'hui dans la littérature scientifique. La PVL serait une toxine capable de se fixer sur la membrane des polynucléaires et de former des pores provoquant la destruction de la cellule.¹⁰

Il faudra attendre les travaux de biologie moléculaire de Kamio Y. à l'université de Tohoku en 1992 pour connaître précisément la séquence des deux gènes codant pour chacune des sous-unités de la PVL. Ces gènes sont nommés *lukS-PV* et *lukF-PV*.^{11,12} Ces travaux ouvrent la voie permettant la détection de la leucocidine de Pantone-Valentine par biologie moléculaire sur les isolats de *S. aureus* en clinique. La première étude épidémiologique de distribution de ces souches est réalisée en 1995 par Prevost G. et son équipe. Ils montrent que la prévalence de la PVL parmi les souches de *S. aureus* est faible, de l'ordre de 2% et que sa présence est fortement associée à des infections primaires de la peau (furoncles dans 87% des cas).¹³

2002 marque une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie de la leucocidine de Pantone-Valentine chez l'humain. Yves Gillet et son équipe publient un article dans *The Lancet* qui démontre l'association entre la présence des gènes codant la toxine PVL et une forme rare de pneumopathie nécrosante à *S. aureus* associée à un très fort de taux de mortalité.¹⁴

Les différentes équipes travaillant sur ces souches particulières de *Staphylococcus aureus* se posent cependant la question du rôle de la leucocidine au cours des infections communautaires. Certains auteurs contestent le fait que la toxine PVL soit un facteur de virulence majeur au cours de ces infections. On peut citer notamment la publication de Voyich JM en 2006 qui étudie l'effet de la PVL sur un modèle murin.¹⁵ D'autres auteurs confirment cette observation qui n'est cependant retrouvée dans la littérature que chez la souris et le macaque.

Plusieurs zones d'ombre sur la leucocidine de Panton-Valentine persistent, notamment son mécanisme d'action moléculaire précis et son implication dans les infections communautaires à *S. aureus*. Il apparaît donc nécessaire de se demander si la toxine est un facteur conférant à lui tout seul une pathogénicité accrue à *S. aureus* ou si celle-ci s'accompagne de plusieurs autres facteurs restant à déterminer.

2. Origine et support génétique de la toxine de Panton-Valentine

De nombreux facteurs de virulence bactériens sont portés par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les phages ou les transposons. La PVL n'est produite que par 2% des souches de *S. aureus* isolés en France.¹³ Devant cette faible prévalence, il était probable que la transmission des gènes codant pour les sous-unités de la leucocidine de Panton-Valentine se fasse selon un mode horizontal par le biais d'un élément génétique mobile. Chez de nombreuses espèces bactériennes, les gènes codant les toxines sont portés par des phages. C'est le cas de *Corynebacterium diphtheriae*¹⁶, du streptocoque A¹⁷, de *Clostridium botulinum*¹⁸ ou encore de *Vibrio cholerae*.¹⁹

L'hypothèse de l'acquisition de la PVL par *S. aureus* par le biais d'un phage lysogénique a été postulée très tôt. Dès 1972, Jan C. M. van der Vijver a démontré que l'action d'un bactériophage sur une souche de staphylocoque pouvait amener celle-ci à produire une leucocidine sans toutefois préciser laquelle et sans mettre en évidence le transfert des gènes codant la PVL.²⁰ Ces gènes ont été mis en évidence dans le génome de plusieurs phages lysogéniques : Φ Sa2958, Φ Sa2MW, Φ PVL, 108PVL, Φ SLT, and Φ Sa2USA.²¹ Le mécanisme de conversion lysogénique par un phage porteur des gènes codant la PVL a été démontré en 2001 par Kamio et al. qui ont utilisé Φ SLT pour transformer une souche de *S. aureus* PVL- en souche productrice de leucocidine.

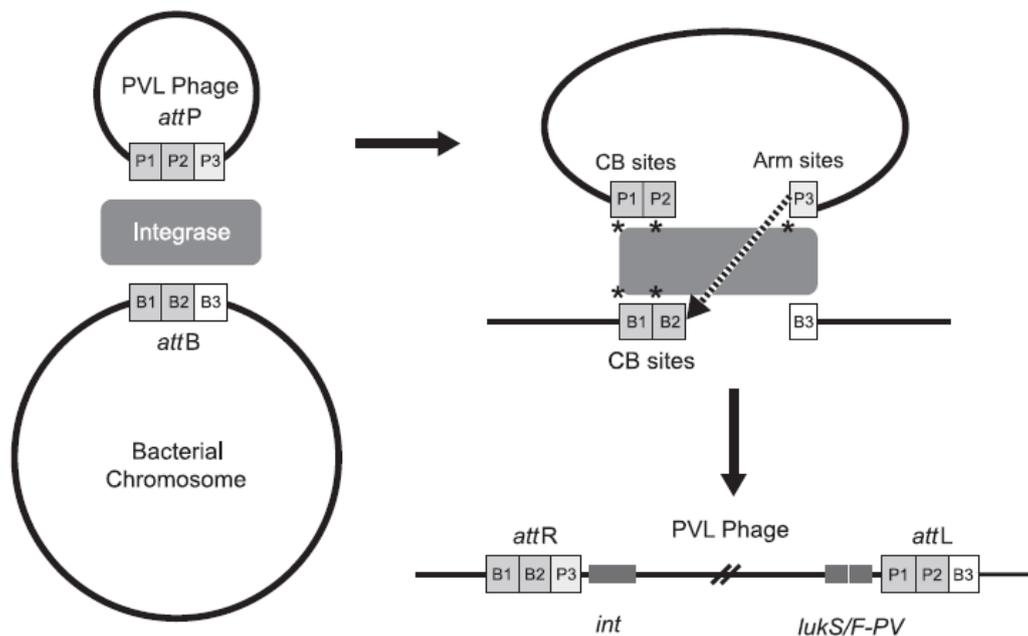


Figure 1 : mécanisme de recombinaison permettant l'insertion des gènes phagiques codant la PVL dans le génome bactérien. Le phage et la bactérie possèdent un site d'attachement spécifique (*attP* et *attB*). Une intégrase phagique est capable de couper le double brin d'ADN au niveau de ces sites puis d'effectuer une ligation selon le schéma détaillé ci-dessous. *Source : E. Boakes, A. M. Kearns, M. Ganner, C. Perry, R. L. Hill and M. J. Ellington. Journal Of Clinical Microbiology, Feb. 2011, p. 684–692*

Les génomes de ces différents phages partagent une structure très proche. On retrouve chez chacun d'entre eux les éléments génétiques nécessaires à l'intégration, la réplication et la synthèse du phage. La PVL est encodée par deux gènes cotranscrits correspondant aux sous-unités protéiques LukS-PV et LukF-PV.

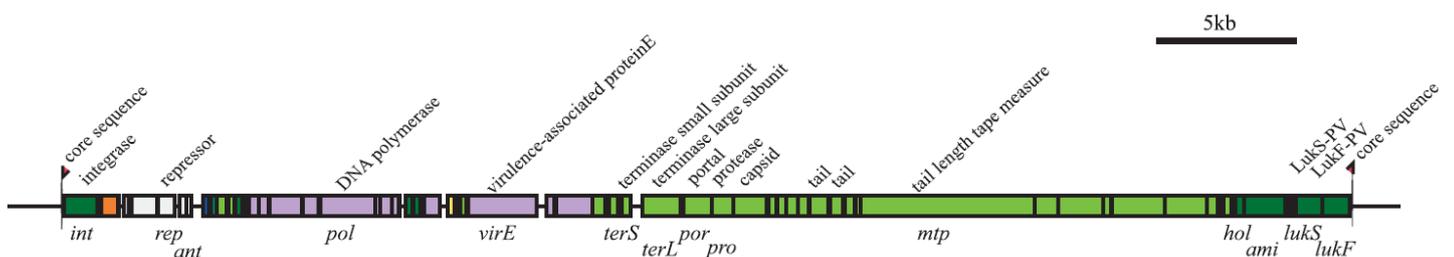


Figure 2 : Structure de Φ Sa2958. Les deux flèches aux extrémités marquent les sites d'attachement (*att*), les différents éléments sont schématisés sous forme de rectangles. *Source : Xiao Xue Ma, Teruyo Ito, Yoko Kondo, Moe Cho, Yukio Yoshizawa, Jun Kaneko, Atsuo Katai, Masato Higashiide, Shanshuang Li, and Keiichi Hiramatsu. Journal Of Clinical Microbiology, Oct. 2008, p. 3246–3258*

Ces séquences sont ainsi retrouvées au sein du génome des souches de *S. aureus* PVL+ sous forme de prophage. Ce mode de réplication virale est appelé cycle lysogénique, la bactérie n'est pas lysée lors de sa réalisation et le prophage est transmis lors de la division bactérienne. Sous certaines conditions, la réplication peut aussi se faire par un cycle lytique beaucoup plus rare (1 fois sur 100 000).²²

3. Structure et mécanisme d'action

La leucocidine PVL est une toxine synergohyménotrope composée de deux sous-unités protéiques : LukF-PV, 34 kDa et LukS-PV, 32 kDa.⁸ Ces deux composés sont capables de s'assembler en oligomères et de se fixer spécifiquement sur la membrane des cellules phagocytaires de l'humain et du lapin mais pas sur celles des rongeurs ou des macaques.²³

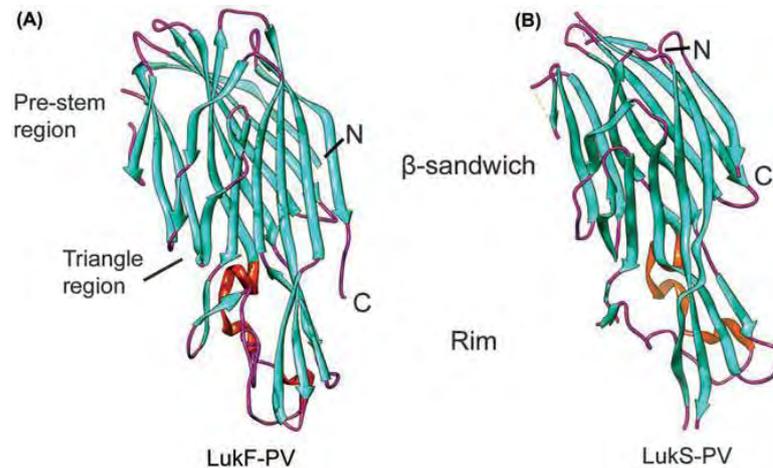


Figure 3 : représentation tridimensionnelle de la structure tertiaire des sous-unités LukF-PV et LukS-PV déterminée par cristallographie. On remarquera la richesse des structures en feuilletts β . Source : M. Javad A. et Al *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* Volume 28, Issue Number 1, (2010)

La toxine appartient à la famille des beta-PFTs (beta-barrel pore-forming toxins) comme les autres enzymes cytolytiques des staphylocoques, l' α -hémolysine par exemple. Ces molécules s'assemblent dans le milieu extérieur pour former de grands ensembles protéiques capables de s'enchâsser dans la bicouche phospholipidique des membranes après liaison avec un récepteur spécifique. Ces multimères forment des pores capables de laisser passer les ions calcium à travers les membranes des cellules. Ce mécanisme semble être la base de la cytotoxicité de la PVL.²⁴ Le complexe assemblé n'a pas été encore décrit mais plusieurs observations de ces pores ont été faites soit de manière directe (microscopie électronique) soit indirecte (mise en évidence du relargage d'un marqueur cellulaire). Le modèle le plus étayé est celui d'un octamère²⁵ composé de 4 sous-unités LukS-PV et de 4 LukF-PV s'alternant régulièrement autour d'un axe central. Ce complexe viendrait se fixer à la paroi des polynucléaires, des macrophages et des monocytes suggérant un récepteur d'origine myéloïde.²⁶

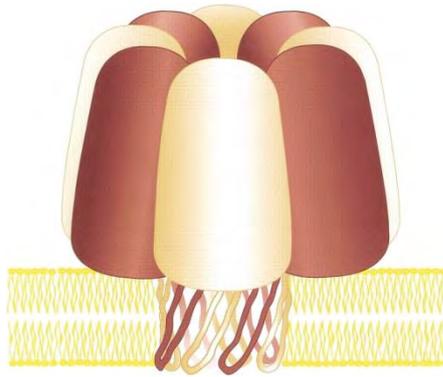


Figure 4 : Modèle du pore formé par la leucocidine de Pantone-Valentine sous forme d'octamère.
Source : Miles G, Movileanu L, Bayley H. Protein Sci. 2002 Apr;11(4):894-902.

L'assemblage et la fixation de la toxine se feraient selon un processus en plusieurs étapes : sécrétion des deux sous-unités LukS-PV et LukF-PV sous forme hydrosoluble, formation d'hétérodimères puis d'hétérotétramères (2S+2F) et assemblage en octamères (4S+4F). A ce stade, les sous-unités forment un pré-pore qui subit des changements de conformation majeurs encore mal connus. Ces dernières modifications provoquent l'ouverture du pore et le passage des composés de moins de 2 kD comme les ions calcium et potassium.²⁷ Ce passage incontrôlé des ions à travers les membranes des cellules aboutit à leur destruction.

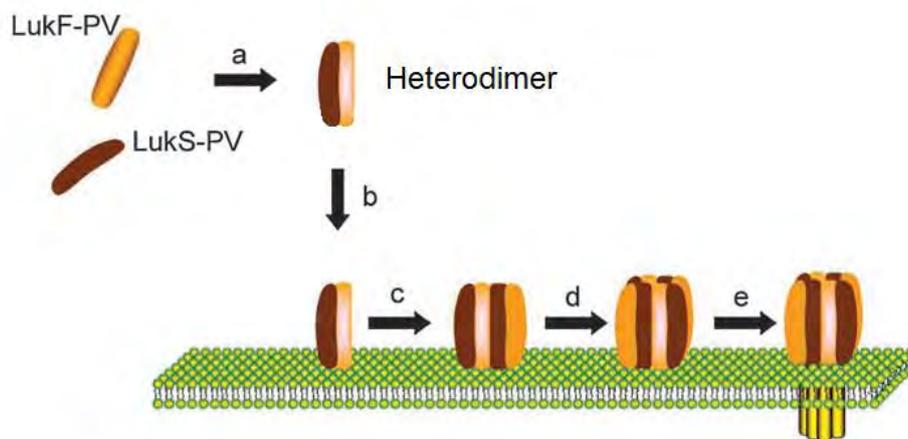


Figure 5 : séquence d'assemblage de la leucocidine de *S. aureus*. Version originale par : M. Javad A. et Al Journal of Biomolecular Structure & Dynamics Volume 28, Issue Number 1, (2010)

La fixation de la toxine se fait par le biais de la sous-unité LukS-PV qui reconnaît avec une forte affinité le récepteur de la fraction C5a du complément C5aR. La découverte de cette cible a permis de beaucoup mieux comprendre la spécificité de la leucocidine. En effet, le C5aR n'est présent en abondance que sur les polynucléaires, les macrophages et les monocytes. De plus, il présente des variations inter-espèces importantes ce qui explique l'échec des modèles murins utilisés par le passé et la résistance à la PVL des polynucléaires de souris et de macaques. La fraction LukS-PV est aussi capable de se lier au récepteur C5L2 (C5a anaphylatoxin chemotactic receptor) mais son rôle serait mineur par rapport à celui de C5aR.²³

La toxicité cellulaire de la PVL s'exprime de deux façons. A faible concentration, elle a essentiellement une activité pro-apoptotique sur les polynucléaires. L'apoptose est déclenchée par la voie mitochondriale par ouverture de pores directement sur les mitochondries. Pour des concentrations plus élevées, il semblerait que l'effet dominant de la PVL soit la nécrose.²⁸

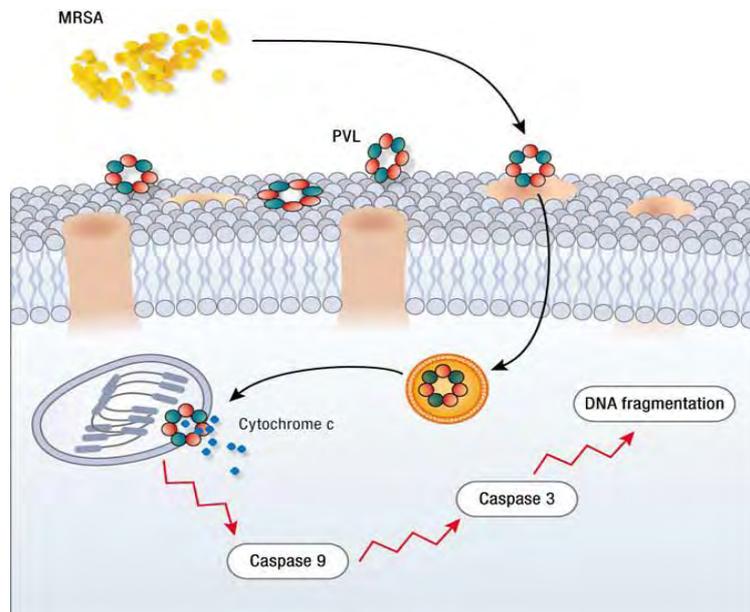


Figure 6 : déclenchement de l'apoptose par la toxine PVL. Source : Susan Boyle-Vavra and Robert S Daum. *Laboratory Investigation* (2007) 87, 3–9

La connaissance de ces mécanismes, ainsi que l'expérimentation sur des modèles animaux pertinents permettent de mieux comprendre le rôle de la leucocidine de Panton-Valentine dans les infections chez l'homme.

4. Physiopathologie et modèles proposés

Les souches de *S. aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine sont retrouvées sur la plupart des prélèvements biologiques. Ceci n'implique pas cependant que la toxine exerce un rôle majeur dans la pathogénicité de la bactérie. Dans la littérature, les associations entre les infections staphylococciques et le portage des gènes codant la PVL reposent essentiellement sur des études épidémiologiques. Ces travaux mettent en évidence deux grandes entités pathologiques associées à la leucocidine de Panton-Valentine : les infections de la peau et des tissus mous (SSTIs – Skin and Soft Tissues Infections)^{29,30,31 et 32} et les pneumopathies nécrosantes.¹⁴

Les lésions nécrotiques semblent être le point commun des différentes infections impliquant la leucocidine de Panton-Valentine.³³

a) Rôle de la PVL dans les infections cutanées

Il n'existe pas à ce jour de modèle physiopathologique complet qui décrit le rôle de la PVL dans les infections de la peau et des structures cutanées. De plus, le rôle de la leucocidine en tant que facteur de virulence majeur dans les infections de la peau et des tissus mous reste controversé.^{34,35 et 36} Il y aurait néanmoins une association épidémiologique probante entre ces infections et la présence de la PVL.^{37,38,33 et 13}

Plusieurs auteurs rapportent cependant des arguments en faveur d'un rôle de la PVL dans ces infections. Yu F. et Al ont montré que le niveau d'expression de l'ARNm du gène codant pour LukS-PV était plus élevé dans les prélèvements cutanés que dans les hémocultures. Il était aussi plus élevé chez les enfants que chez les adultes.³⁹ Un modèle cellulaire In Vitro a été proposé en 2013 par Chia-Yu Chi et son équipe pour étudier la physiopathologie des infections cutanées à *S. aureus* PVL+. Le kératinocyte (lignée RHEK-1, cellules épithéliales humaines immortalisées) a été retenu comme modèle à cause de son rôle dans la défense immunitaire innée des infections staphylococciques. En effet, les kératinocytes sont capables de former des endosomes, de détruire les bactéries par ce biais et donc de limiter la prolifération bactérienne intracellulaire. La leucocidine est capable de former des pores dans les membranes des endosomes limitant leur action. Il est important de noter que d'autres toxines staphylococciques possèdent cette capacité notamment l' α -toxine. Ce mécanisme permet à la bactérie d'échapper à la destruction par les endosomes.⁴⁰

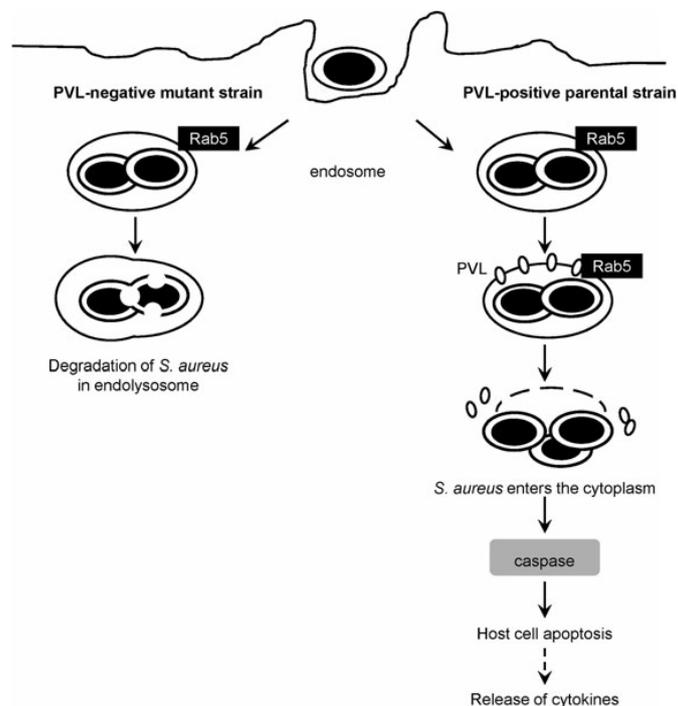


Figure 7 : hypothèse physiopathologique In Vitro proposée pour les infections cutanées à *S. aureus* PVL+. Source : Chia-Yu Chi, Chia-Chun Lin, I-Chuang Liao, Yi-Chuan Yao,2 Fan-Ching Shen, Ching-Chuan Liu, and Chiou-Feng Lin. Journal of Infectious Diseases. 15 jan 2014

La deuxième hypothèse documentée sur l'effet de la PVL est son action indirecte sur les polynucléaires. La leucocidine en lysant les polynucléaires provoquerait la libération de nombreux facteurs cytotoxiques qui attaqueraient les cellules épithéliales. Cette hypothèse est bien corrélée aux observations histologiques des biopsies. On retrouve sur les coupes tissulaires des lésions nécrotiques avec un afflux puis une lyse des polynucléaires sur le site de l'infection. Peu de résultats sont disponibles pour ce mécanisme dans les nécroses cutanées. Cette action indirecte de la PVL a surtout été décrite dans les pneumopathies nécrosantes, nous détaillerons donc ce mécanisme dans le chapitre correspondant.

Le modèle animal le plus pertinent pour explorer la physiopathologie de la PVL dans les infections cutanées semble être le lapin puisque ses polynucléaires sont très sensibles à l'action de la leucocidine comme le sont ceux de l'humain. Lipinska et al ont administré une souche de *S. aureus* PVL+ et la souche KO correspondante à des lapins au niveau du derme et du muscle. Les lapins ayant reçu la PVL ont développé des lésions nécrotiques de plus grande taille que ceux ayant reçu la souche KO. Ces animaux ont aussi produit des anticorps dirigés contre la toxine.⁴¹ Les articles parus sur le modèle du lapin sont cependant peu nombreux et certains résultats pourraient être expliqués par l'impact d'un autre facteur : l' α -hémolysine du staphylocoque.⁴²

b) Rôle de la PVL dans les pneumopathies nécrosantes

La toxicité de la leucocidine s'exprimerait aussi par la lyse des polynucléaires. Cette hypothèse est plus ancienne, elle découle directement du mécanisme d'action de la toxine et de son affinité pour les polynucléaires humains. En 1995, B. Konig et G. Prevost ont étudié l'effet de la PVL sur la libération In Vitro de différents médiateurs de l'inflammation par les granulocytes.⁴³ Ils ont observé une libération importante de plusieurs composés :

- L'histamine par les polynucléaires basophiles et les mastocytes qui est un facteur vasodilatateur majeur,
- Des enzymes contenues dans les granules des polynucléaires (lysozyme et β -glucuronidase),
- Du leucotriène B₄, composé dérivé de l'acide arachidonique pro-inflammatoire et puissant chémo-attractant,
- De l'interleukine 8 qui participe à la formation d'un gradient chimiotactique nécessaire au recrutement des polynucléaires sur le site de l'infection,
- Des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène qui ont une action bactéricide.

Ce sont ces produits et non la leucocidine qui entraîneraient les lésions tissulaires observées. Dans ce modèle, la PVL agit par un effet indirect.

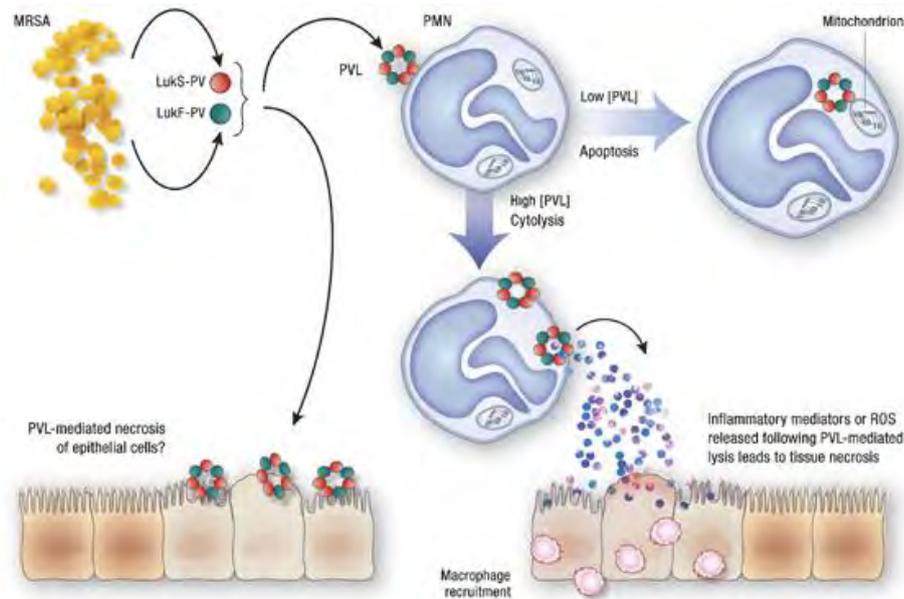


Figure 8 : hypothèse physiopathologique In Vitro. Mécanisme indirect de toxicité de la PVL par lyse des polynucléaires et relargage de médiateurs. *Source : Susan Boyle-Vavra and Robert S Daum. Laboratory Investigation (2007) 87, 3–9*

Tout comme pour les infections cutanées, le lapin semble être le meilleur candidat pour étudier les effets de la PVL sur le poumon. Le modèle le plus complet sur cet animal a été décrit dans une publication de 2010 par Diep et al.⁴⁴ Ils ont comparé l'effet de l'inoculation par voie endotrachéale d'une souche de *S. aureus* PVL+ (SF8300) et de son équivalent KO pour la PVL à différentes doses. La mortalité a été significativement plus importante dans le groupe ayant reçu la souche PVL+ que dans le groupe KO confirmant le rôle de la PVL en tant que facteur de virulence majeur dans cette localisation. De plus, le dosage de la fraction LukS-PV dans les poumons des animaux a montré que celle-ci était produite en concentration toxique sur le site de l'infection.

La présence de la toxine est donc un facteur important pour le pronostic vital des animaux. Cet effet observé peut cependant être expliqué par deux hypothèses :

- La PVL est un facteur de virulence indépendant qui provoque la nécrose tissulaire par le biais de la lyse des polynucléaires,
- La diminution des polynucléaires sur le site de l'infection réduit les défenses innées de l'hôte et permet à la bactérie de survivre et de se multiplier plus rapidement.

Pour répondre à cette question les auteurs ont évalué le nombre de bactéries à des intervalles de temps réguliers sur des biopsies pulmonaires des deux groupes test. Il n'y avait pas de différence en termes d'inoculum bactérien entre les deux groupes suggérant un effet indépendant de la PVL. De plus, sur les LBA du groupe ayant reçu la souche PVL+, le taux des protéines totales (origine plasmatique) était significativement plus important ce qui est en faveur d'une destruction des cellules épithéliales alvéolaires. La mesure des taux d'IL-8 et de MCP-1 sur ces mêmes liquides montre des résultats allant dans le sens d'une infiltration et d'une lyse plus importante des polynucléaires dans le groupe ayant reçu la PVL.

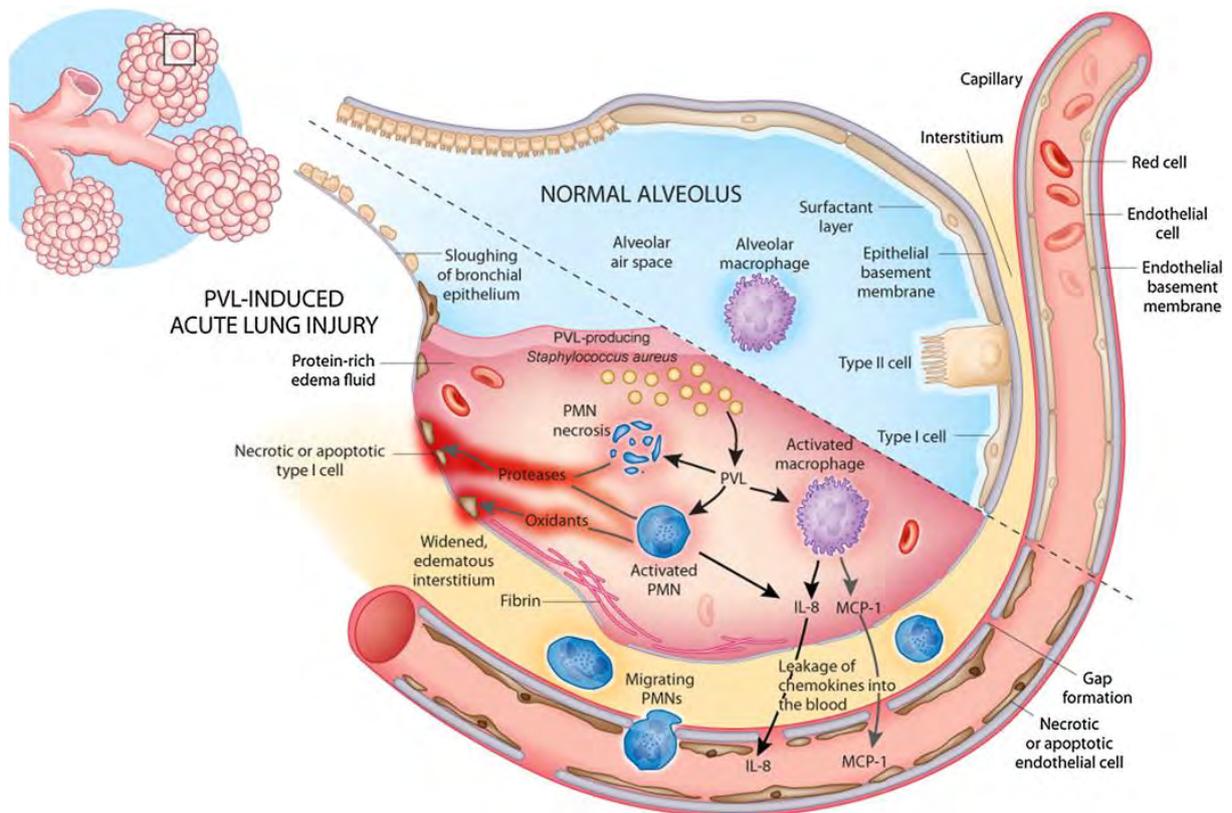


Figure 9 : modèle physiopathologique chez le lapin des pneumopathies nécrosantes associées à *S. aureus* sécrétant de la leucocidine de Pantone-Valentine. Les flèches noires indiquent des séquences argumentées, les flèches grises sont des hypothèses. *Source : Binh An Diep, Liana Chan, Pierre Tattevin, Osamu Kajikawa, Thomas R. Martin, Li Basuino, Thuy T. Mai, Helene Marbach, Kevin R. Braughton, Adeline R. Whitney, Donald J. Gardner, Xuemo Fan, Ching W. Tseng, George Y. Liu, Cedric Badiou, Jerome Etienne, Gerard Lina, Michael A. Matthay, Frank R. DeLeo, and Henry F. Chambers. PNAS | March 23, 2010 | vol. 107 | no. 12 | 5591*

B. Facteurs de pathogénicité de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une des bactéries les plus fréquemment retrouvée en pathologie humaine. C'est un germe commensal des flores cutanées et digestives, il est retrouvé au niveau des fosses nasales de manière persistante chez environ 20% des individus et de manière transitoire chez 30% de la population générale.⁴⁵

Il est impliqué dans une très grande variété d'infections communautaires ou nosocomiales : furoncles, abcès, fasciites, arthrites septiques, ostéomyélites, septicémies, pneumopathies, diarrhées infectieuses, endocardites, méningites etc. Ce pouvoir pathogène s'explique par la présence d'un très grand nombre de facteurs de virulence qui permettent à *S. aureus* de coloniser, de persister au sein des flores et d'échapper au système immunitaire de ses hôtes. Il est de plus capable de résister à l'action d'un très grand nombre d'antibiotiques et d'antiseptiques.

La leucocidine de Pantan-Valentine est un facteur de virulence indépendant. Cependant les souches de *S. aureus* PVL+ peuvent aussi exprimer d'autres facteurs qui peuvent contribuer à une pathogénicité accrue de ces souches. L'association de ces différents éléments permet de mieux comprendre les tableaux cliniques observés aussi bien en milieu hospitalier qu'en communautaire.

1. Résistance aux antibiotiques

Le staphylocoque doré ne possède aucune résistance naturelle aux antibiotiques. L'utilisation massive des pénicillines G et V a conduit dès 1941 à l'émergence de bactéries résistantes à ces molécules. *S. aureus* possède une très grande plasticité génétique. Sous la pression de sélection des antibiotiques, il a très rapidement acquis des gènes portés par des plasmides codant pour des pénicillinases.⁴⁶ Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le cycle bêta-lactame des pénicillines G, V et A. Le traitement des infections causées par ces souches est simple. Il repose sur l'utilisation de pénicillines semi-synthétiques stables à l'action des pénicillinases type oxacilline ou alors d'amoxicilline additionnée d'un inhibiteur de bêta-lactamase type acide clavulanique. La détection de ce phénotype est aisée en laboratoire. Elle peut se faire soit à l'aide d'un test utilisant un réactif chromogène type Céfinase® (Biomérieux) ou indirectement par la détermination de la CMI à la pénicilline G (système automatisé, disque ou e-test). Actuellement, plus de 90% des souches isolées sont résistantes à la pénicilline G.

Moins d'un an après l'introduction de la méticilline (pénicilline M) dans les hôpitaux en 1959, des souches résistantes de *S. aureus* sont apparues. Elles étaient non seulement résistantes à la méticilline mais également à l'ensemble des antibiotiques de la classe des bêta-lactamines. Ces souches baptisées SARM sont capables de produire une protéine liant les pénicillines modifiée, de faible affinité pour les bêta-lactamines nommée PLP2a. Elle est codée par le gène *mecA*, lui-même porté par un élément génétique mobile, la cassette staphylococcique ou SSCmec. Cette cassette comporte, en plus du gène *mecA* :

- Des gènes régulateurs de l'expression de la PLP2a : *mecI* gène répresseur et *mecR1* qui code une protéine capable de détecter la présence de bêta-lactamine par son domaine extracellulaire puis de dégrader *MecI*,

- Des gènes de résistance à d'autres antibiotiques de manière variable selon le type de cassette (cf. tableau ci-dessous) : kanamycine, tobramycine, érythromycine et tétracycline,
- Des gènes permettant à la bactérie de survivre dans des milieux contenant des métaux lourds comme le cadmium ou le mercure,
- Les gènes *ccr* qui codent pour des recombinases, un ou deux gènes selon le type de cassette. Ils permettent l'intégration et l'excision de la cassette au sein du génome de *S. aureus*.⁴⁷

Tableau I : Les différents types de SSCmec.

Type SCCmec	Complexe <i>mec</i>	Complexe des gènes de recombinases <i>ccr</i>	Taille (kb)	Autres résistances
I	Classe B	1 (<i>ccrA1B1</i>)	34	K, T
II	Classe A	2 (<i>ccrA2B2</i>)	52	K, T, Ery, Sp
III	Classe A	3 (<i>ccrA3B3</i>)	66	K, T, Ery, Tet, Cd, Hg
IV	Classe B	2 (<i>ccrA2B2</i>)	20 à 24	-
V	Classe C2	5 (<i>ccrC</i>)	28	-
VI	Classe B	4 (<i>ccrA4B4</i>)	22	-
VII	Classe C1	5 (<i>ccrC</i>)	33	-
VIII	Classe A	4 (<i>ccrA4B4</i>)	32	Ery

Source : International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec. 2009, p. 4961–496.

L'origine de l'acquisition de la cassette par *S. aureus* est encore inconnue. On suppose que les premières souches de *S. aureus* *metiR* ont acquis SSCmec par transfert horizontal de la cassette d'un staphylocoque d'une autre espèce.⁴⁸ Aujourd'hui les souches résistantes sont largement répandues dans la population. Elles peuvent transférer leurs éléments de résistance aux souches de *S. aureus* sensibles, favorisant le développement de ce mécanisme de résistance.

Face aux souches résistantes aux bêta-lactamines, il est nécessaire d'avoir recours à d'autres classes d'antibiotiques. Aujourd'hui, trois classes d'antibiotiques sont utilisées en routine pour le traitement des infections à SARM : les glycopeptides (vancomycine et téicoplanine) majoritairement, les oxazolidinones (linézolide) et la daptomycine (lipopeptide antibiotique). Sous la pression de sélection, des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) ont très rapidement émergé partout dans le monde. La première souche de GISA a été isolée chez un patient japonais en 1996.⁴⁹ Le mécanisme de cette sensibilité diminuée n'est pas connu⁵⁰, il n'est pas associé à la présence des gènes *vanA*, *vanB* ou *vanC* comme chez les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)⁵¹. Il existe de rares cas de SARM résistants à la vancomycine après transfert horizontal d'un gène d'ERV mais ces souches sont encore peu répandues.⁵² La diminution de sensibilité des souches de *S. aureus* aux antibiotiques est une tendance générale à laquelle le linézolide et la daptomycine n'échappent pas non plus. Des cas d'échec de traitement par daptomycine⁵³ et par linézolide⁵⁴ existent et sont rapportés dans la littérature.

Ces multiples phénotypes de résistance aux antibiotiques contribuent à la diffusion des souches de *S. aureus*, aussi bien en milieu hospitalier que communautaire. La difficulté de traitement a un impact direct sur le pronostic de ces infections d'où l'importance de détecter et caractériser ces résistances.

2. Résistances aux antiseptiques

a) Classes d'antiseptiques utilisées en milieu hospitalier

La résistance aux antibiotiques n'est pas le seul facteur du succès de la propagation de *S. aureus* dans les milieux communautaire et hospitalier. Les antiseptiques sont très largement utilisés dans les structures de soins et l'industrie agro-alimentaire où l'hygiène est un élément fondamental de la prévention des infections. De nombreuses familles chimiques d'antiseptiques sont disponibles sur le marché et utilisées dans les centres hospitaliers. Les caractéristiques principales de ces composés sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Classes d'antiseptiques et spectre d'activité.

Famille	Spectre d'activité							
	GRAM+	GRAM-	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nus	Virus enveloppés	Spores
Dérivés halogénés	+	+	+	+	+	+	+	+
Biguanides	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	-
QAC	+	+/-	-	+	+	+/-	+	-
Alcools	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
Aldéhydes	+	+	+	+	+	+	+	+
Agents oxydants	+	+	+	+	+	+	+	+

Source : Recommandations de bonnes pratiques d'utilisation des antiseptiques et des désinfectants en milieu hospitalier. C.CLIN Paris-Nord - Mai 2000

b) Mécanisme d'action des composés à groupement ammonium quaternaire

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes de résistance impliquant les ammoniums quaternaires ou QAC (Quaternary Ammonium Compounds) chez les bactéries du genre *Staphylococcus*. En effet, cette famille est très utilisée au CHU de Toulouse et dans les structures hospitalières en général pour décontaminer les surfaces et nettoyer la peau saine et les muqueuses (hygiène des mains notamment). Les premières résistances des staphylocoques aux ammoniums quaternaires ont été étudiées en même temps que celles aux antibiotiques dès la fin des années 1960.⁵⁵ Les premières études ont montré une diminution de l'absorption des ammoniums quaternaires par les bactéries conduisant rapidement à évoquer un mécanisme d'efflux.⁵⁶

Les QAC sont des composés amphiphiles capables de s'adsorber sur les membranes cellulaires puis de s'insérer au sein des bicouches phospholipidiques. Un modèle de leur mécanisme d'action a été proposé par Gilbert et Moore en 2005.⁵⁷ Ce mécanisme est détaillé dans la figure 10.

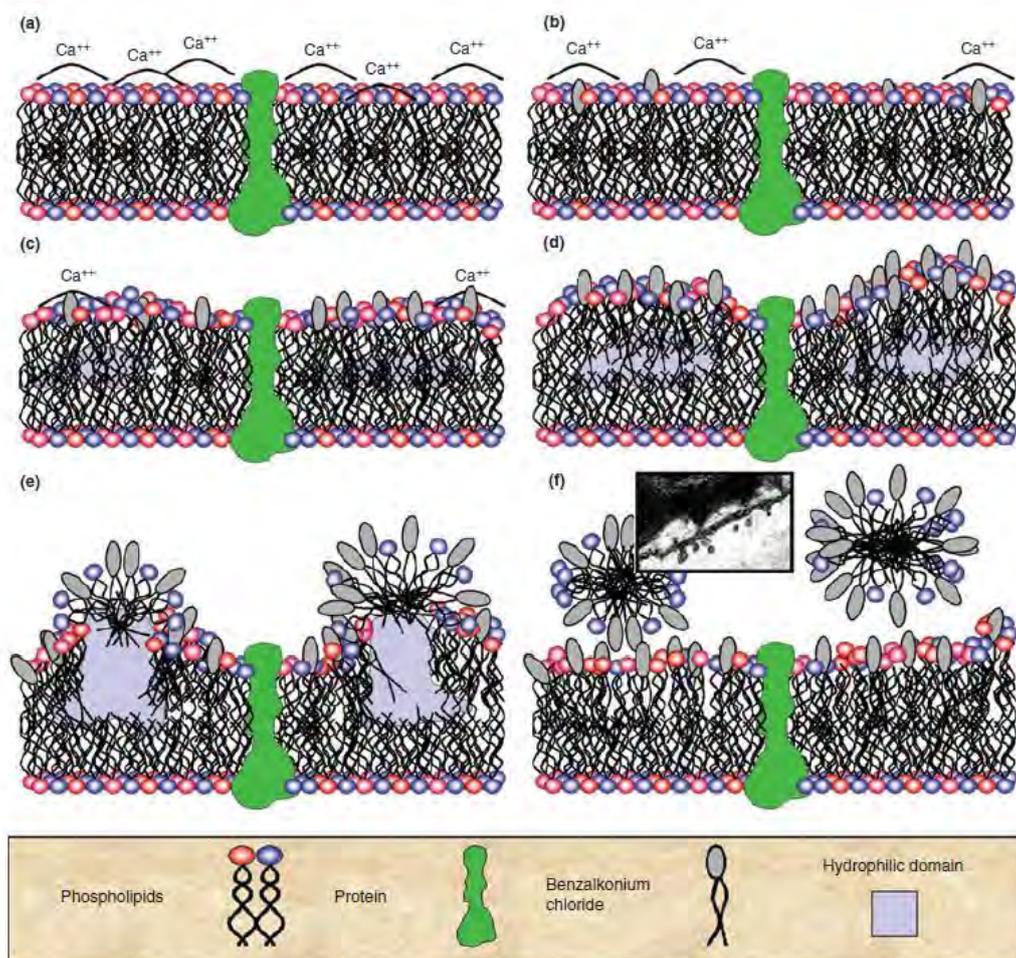


Figure 10 : modèle du mécanisme d'action des antiseptiques de la famille des ammoniums quaternaires.

(a) Représentation schématique de la bicouche phospholipidique fonctionnelle. (b) Insertion progressive de molécules de QAC dans la couche supérieure ce qui entraîne une baisse de la fluidité de la membrane et une augmentation de la température de changement d'état de la membrane. (c) et (d) Aux concentrations minimales inhibitrices, la membrane passe d'un état fluide à un état cristallin, elle se déstructure et perd ses fonctions de régulation osmotique entraînant une fuite d'ions notamment les ions potassium. Pour des concentrations intermédiaires, les fonctions physiologiques des protéines membranaires sont perturbées notamment la respiration, les transporteurs transmembranaires et la synthèse de la paroi bactérienne. (e) A de fortes concentrations en antiseptique, les QAC ont une action détergente. Les phospholipides sont solubilisés et la membrane se fragmente en libérant des micelles. Ces trois actions sont à l'origine du pouvoir bactéricide des QAC. Source : P. Gilbert and L.E. Moore. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Manchester, Manchester, UK. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 703–715.

Sur le plan pharmacodynamique, les ammoniums quaternaires peuvent inhiber la pousse des bactéries ainsi que la germination des spores bactériennes. Leur effet bactéricide est cependant souvent surestimé dans les études car les bactéries survivantes peuvent subir l'effet bactériostatique d'une quantité résiduelle de QAC. Leur action est fortement dépendante de l'environnement de la bactérie, elle est réduite pour les inocula forts ainsi qu'en présence de composés organiques comme le biofilm. Leur effet augmente avec la température et le temps d'exposition. La pharmacocinétique est peu documentée, on sait cependant que les QAC sont peu métabolisés et peuvent persister longtemps dans le milieu extérieur du fait de leur faible biodégradabilité. Sur des essais menés dans les années 70, la chlorhexidine pouvait être retrouvée dans la bouche plusieurs jours après application.⁵⁸

c) Mécanismes de résistances de *S. aureus* aux QAC

L'usage massif de ces antiseptiques au sein des hôpitaux entraîne une pression de sélection sur les bactéries favorisant l'émergence de populations résistantes. Il a été démontré que l'exposition des bactéries à des concentrations en antiseptique inférieures aux CMI peut être à l'origine du développement de résistances. On distingue trois mécanismes principaux :

- Résistance non spécifique par production d'un biofilm qui entoure et protège la bactérie,
- Modifications des phospholipides membranaires,
- Acquisition de pompes d'efflux.

Ce dernier mécanisme représente la stratégie la plus couramment utilisée par les bactéries pour résister à l'action des QAC.⁵⁸ On connaît à ce jour, cinq grandes familles de pompes d'efflux chez *S. aureus*, elles sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : synthèse des différentes classes de pompes d'efflux et de leurs substrats.

Famille	MFS	SMR	MATE	RND	ABC
Dénomination	Major Facilitator Superfamily	Small Multidrug Resistance	Multidrug And Toxic compound Extrusion	Resistance-Nodulation-cell Division	ATP-Binding Cassette
Mécanisme	Antiport – H ⁺	Antiport – H ⁺	Antiport – H ⁺ , Na ⁺	Antiport – H ⁺	Transport actif primaire utilisant l'ATP
Principaux représentants	QacA, QacB , NorA, NorB, NorC, MdeA, LmrS, SdrM	QacC/D , QacG, QacH, QacJ, QacE-Δ1, SepA*	MepA	Aucun seulement chez les bactéries GRAM négatif.	MrsA Vga(A) , Vga(B) AbcA
Résistances aux antibiotiques associées	NorA, NorB, NorC : FQ MdeA : FQ, MUP, FA LmrS : LZD, C, TMP, E, K, FA SdrM : FQ	QacC/D : β-lactamines	FQ, TC	Sans objet	MrsA : macrolides, streptogramines Vga : streptogramines, lincosamides AbcA : β-lactamines

*L'appartenance à la famille SMR n'est pas prouvée formellement pour SepA

Les pompes d'efflux sont des systèmes physiologiques qui ont pour rôle d'éliminer les molécules néfastes pour la bactérie en les expulsant dans le milieu extérieur. Elles peuvent toucher des toxiques environnementaux comme les métaux lourds ou des molécules produites par l'hôte telles que les sels biliaires, les acides gras, les hormones et les toxines.⁵⁹ QacA/B et QacC touchent plus spécifiquement les antiseptiques et sont codées par des gènes plasmidiques favorisant leur dissémination. On peut s'attendre à une prévalence importante en milieu hospitalier ce qui rend leur recherche intéressante dans l'évaluation de nos pratiques d'asepsie.

d) Support génétique de l'expression des protéines Qac

L'expression de ces pompes passe par l'acquisition des gènes *qacA/B* (*qacA* et *qacB* ne diffèrent que par 7 nucléotides) et *qacC/D*. Il arrive que ces pompes touchent d'autres molécules ce comme, par exemple, la pompe codée par *qacC* qui entraîne aussi une résistance aux bêta-lactamines.⁵⁷ Ces gènes sont portés par des plasmides notamment de la famille des pSK. Le gène *qacA*, 1542 pb, est porté par le plasmide pSK1 chez lequel on retrouve aussi des gènes codant pour des résistances aux aminosides⁶⁰ (kanamycine, tobramycine et gentamicine), à la pénicilline G⁶¹ et au triméthoprime⁶². Il est possible aussi de retrouver *qacA* directement dans le génome de *S. aureus* probablement après intégration du plasmide.⁶³ Le gène *qacB* est très proche de *qacA*, on le retrouve aussi sur des plasmides notamment ceux conférant une résistance aux métaux lourds comme pSK23. Par analogie, *qacC* et *qacD* sont aussi très proches bien que les plasmides qui les portent soient très différents.

Il existe d'autres gènes *qac* chez *S. aureus* codant aussi pour des protéines d'efflux : *qacG*, *qacH*, *qacJ* et *qacE-Δ1*. Ces gènes ne sont habituellement pas retrouvés dans les souches hospitalières de *S. aureus*.^{64,65,66}

Les séquences des gènes *qac* sont connues. Leur présence peut donc être facilement détectée par PCR simple ou multiplex ce qui permet de suivre l'évolution du pourcentage de souches résistantes aux QAC au CHU.

e) Structure et rôle des protéines Qac dans la résistance aux ammoniums quaternaires

QacA et QacB sont des protéines transmembranaires de 14 segments enchâssées dans la membrane cytoplasmique des bactéries GRAM+. Elles ne diffèrent que d'un seul acide aminé et leurs gènes ne diffèrent que de 7 nucléotides.⁶⁷ Cet acide aminé, situé en position 323, est cependant essentiel car QacA confère un niveau de résistance plus élevé que QacB aux diamidines et aux biguanides. Cette différence d'activité semble indiquer que l'acide aminé en position 323 joue un rôle important dans la reconnaissance de la structure ammonium. La structure de la protéine QacA est détaillée dans la figure 11.

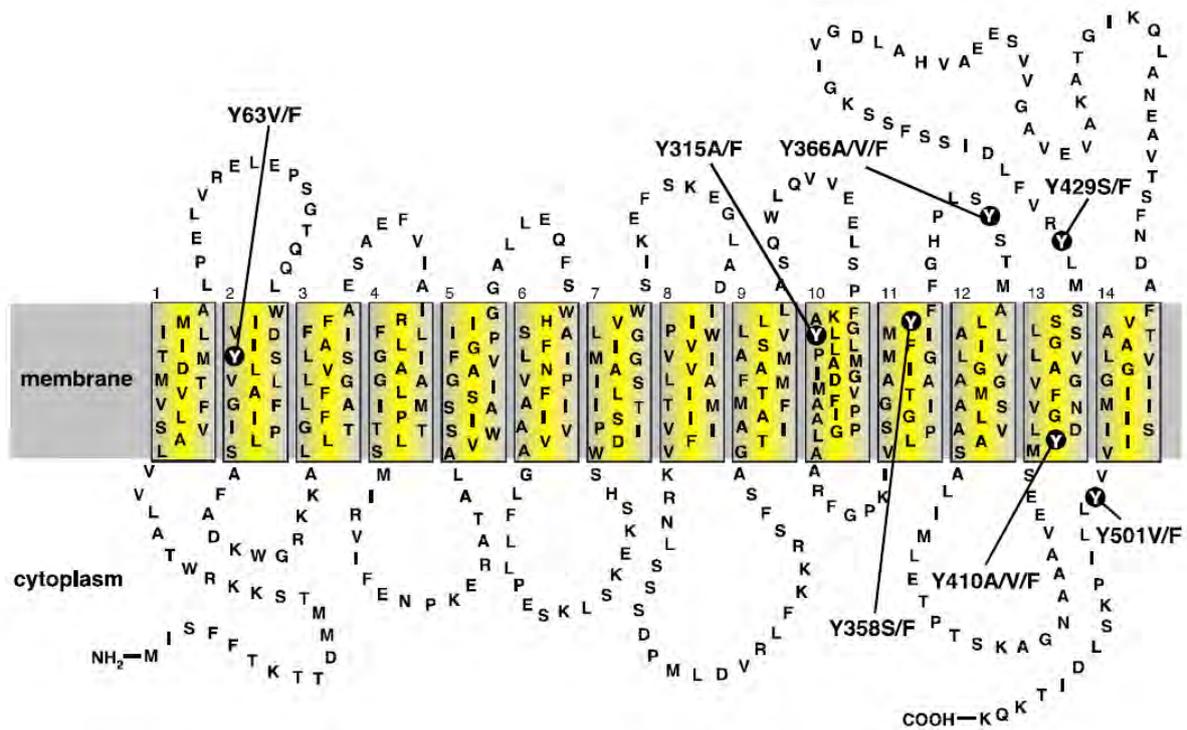


Figure 11 : représentation de la structure primaire et secondaire de QacA. Ce schéma est transposable pour QacB. *Source : Wu et al. BMC Microbiology 2008 8:147 doi:10.1186/1471-2180-8-147*

La structure de QacC est différente des deux précédentes. Cette pompe appartient à la famille des Small Multidrug Resistance (SMR) qui sont capables de prendre en charge de très nombreux substrats y compris des antibiotiques.

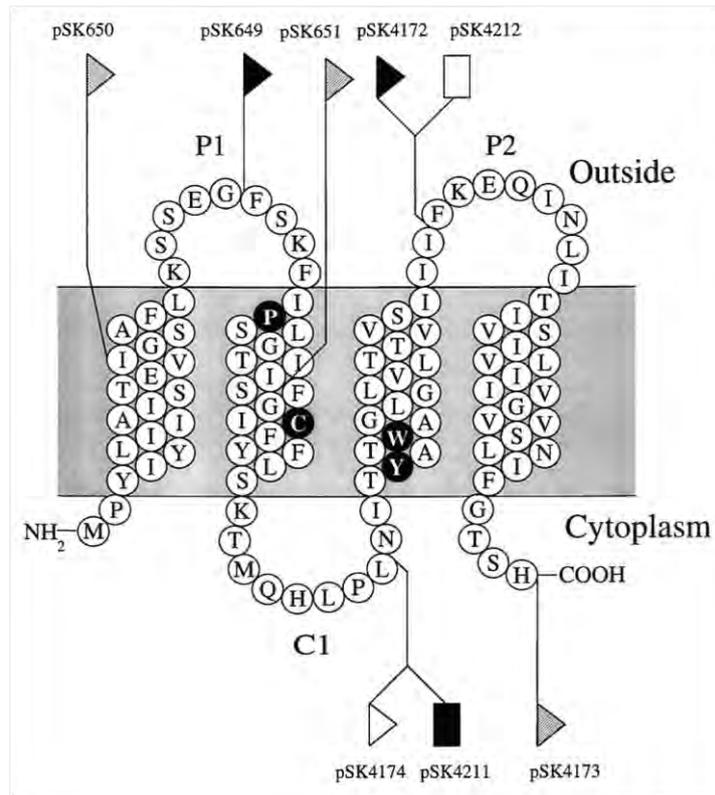


Figure 12 : représentation de la structure primaire et secondaire de QacC/D. Source : I T Paulsen, M H Brown, S J Dunstan and R A Skurray. Journal of Bacteriology.1995, 177(10):2827.

L'expression de ces protéines par *S. aureus* aboutit à une augmentation significative des CMI des antiseptiques ammoniums quaternaires. Cependant il n'a pas été observé de diminution d'activité de ces composés aux concentrations usuelles. En effet les concentrations usuelles des produits antiseptiques commercialisés se situent entre 50 et 100 mg/L ce qui correspond à des concentrations de l'ordre de 100 à 1000 fois les CMI mesurées sur les souches de *S. aureus* sensibles aux antibiotiques. Les résistances observées aboutissent à une élévation par un facteur 2 ou 3 des CMI.⁵⁷

De plus, des essais de décontamination de souches sensibles de *S. aureus* porteurs de gènes de résistance ont été réalisés sur un volontaire sain. La chlorhexidine est restée efficace pour décontaminer le bras lors des prises de sang.⁶⁸

Le problème peut se poser pour la décontamination des surfaces où les concentrations résiduelles après application peuvent être beaucoup plus faibles, proches des CMI ce qui peut entraîner la persistance du staphylocoque au sein des services hospitaliers.

f) Distribution géographique et prévalence de ces résistances en France chez *S. aureus*

Les données disponibles sur la prévalence et la répartition géographique de ces résistances chez *Staphylococcus aureus* sont parcellaires, il est difficile de l'estimer aujourd'hui. La dernière étude réalisée au CHU de Toulouse à ce sujet date de 1997 où *qacA/B* avait été recherché sur des isolats de *S. aureus* du service de réanimation infantile et il apparaissait que la prévalence dépassait les 50% : 66% de l'ensemble des *S. aureus* et la quasi-totalité des SARM possédaient le gène *qacA/B*.

3. Capsule polysaccharidique du staphylocoque

Les bactéries responsables d'infections invasives sont souvent capables de produire une capsule polysaccharidique. Les premières techniques de laboratoire pour la mettre en évidence se basaient sur des méthodes indirectes : absence de coloration à l'encre de chine, morphologie des colonies sur gélose ou l'absence apparente de clumping factor. Ces techniques ne détectent la capsule que sur les souches de sérotype 1 et 2, mucoïdes et fortement productrices. Les techniques immunologiques utilisant des antisérums de lapin utilisées dans les années 80 ont permis de définir les 11 sérotypes communément reconnus aujourd'hui. Il est également possible de rechercher les gènes nécessaires à la production de la capsule par PCR ou de la visualiser en microscopie électronique. On peut aussi détecter et typer les capsules par spectrométrie infrarouge de manière très fiable mais cette technique est réservée à des laboratoires de recherche.⁶⁹

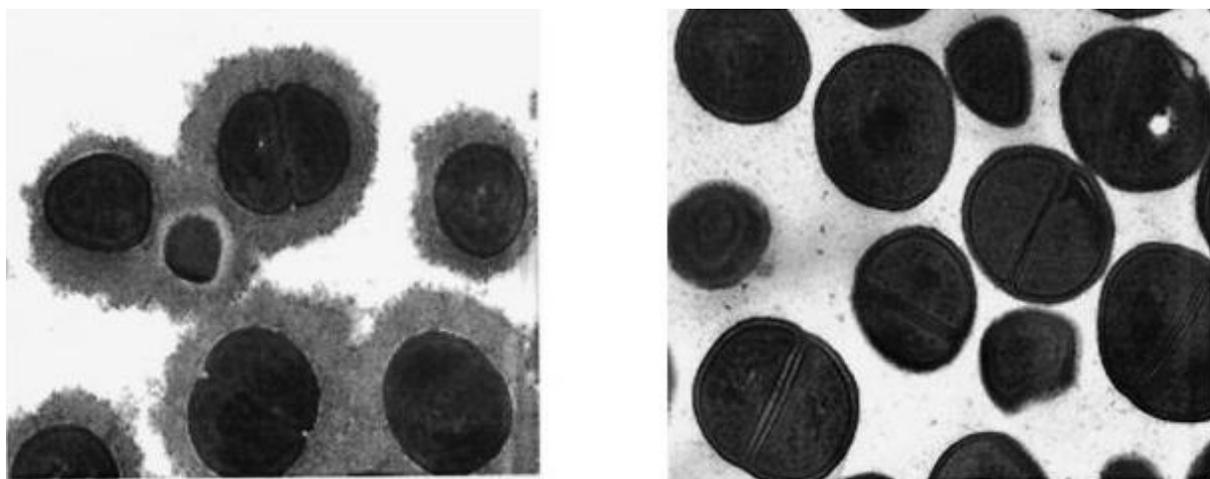


Figure 13 : photos en microscopie électronique à transmission d'une souche de *S. aureus* capsulée (à gauche) et d'un mutant non capsulé (à droite). Les deux souches ont été préalablement incubées avec des anticorps anti-CP5 de lapin pour stabiliser et visualiser la capsule. *Source : Katherine O'Riordan and Jean C. Lee. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Jan. 2004, p. 218-234 Vol. 17, No. 1.*

a) Répartition et structure des différents sérotypes

Environ 90% des souches de *Staphylococcus aureus* produisent une capsule appartenant à l'un de ces 11 sérotypes⁷⁰, les 10% restants étant soit non typables soit non capsulées. Sur les isolats humains, les sérotypes les plus répandus sont le 5 et le 8 ; 25% des souches sont cap5 et 50% sont cap8.⁷¹ La composition biochimique de ces structures est connue pour les sérotypes courants, partiellement pour les sérotypes rares. On retrouve dans sa composition des dérivés osidiques (galactose, mannose, fucose et leurs dérivés principalement) ainsi que des acides aminés comme la taurine. Les molécules qui assurent la liaison entre la capsule et la paroi bactérienne sont encore inconnues.

Les autres sérotypes sont retrouvés plus rarement dans les isolats humains. Les sérotypes 1 et 2 ont été les premiers mis en évidence car les colonies qui les expriment ont un aspect mucoïde sur les géloses. Ces souches sont fortement productrices de capsule mais ne sont que rarement retrouvées en clinique. La prévalence des sérotypes autres que 5 et 8 peut varier d'une région à l'autre, par exemple, une étude de 2007 menée sur des souches issues de laboratoires allemands montre la présence d'environ 13% de sérotype 336.⁷² La détection de la capsule peut aussi être biaisée par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire. En effet, il existe des souches de *S. aureus* qui possèdent les gènes correspondant à cap5 ou cap8 mais qui sont incapables de produire une capsule fonctionnelle. Les mécanismes de cette absence d'expression sont multiples, il s'agit principalement de mutations épigénétiques au niveau des promoteurs.⁷³

a) Production In Vivo et In Vitro de la capsule

La production des enzymes nécessaires à la synthèse des polysaccharidiques de capsule de *S. aureus* est fortement dépendante des conditions du milieu extérieur. Les modèles les plus étudiés concernent les sérotypes 5 et 8 qui sont les plus répandus. On sait que la capsule est exprimée de manière très hétérogène d'une souche à l'autre. Poutrel et al. ont même démontré par cytométrie en flux que des bactéries issues d'une même souche (colonies différentes sur gélose) pouvaient avoir des niveaux d'expression différents.⁷⁴ Plusieurs études s'accordent à dire que la production de la capsule est faible en phase de croissance exponentielle puis maximale en phase post-exponentielle.^{75,76} Cette observation est la conséquence de la régulation opérée par le système *agr* qui module la production de nombreux facteurs de virulence chez *S. aureus* en fonction de la phase de croissance.⁷⁷

On sait que les conditions de culture In Vitro sont très importantes. La production de la capsule est augmentée en cas de culture sur milieu solide pauvre en fer. A contrario, elle est inhibée en présence d'extraits de levure, sur milieu alcalin et en anaérobiose. Le taux de CO₂ influe lui aussi sur la production de la capsule. Cet effet est variable selon le sérotype, pour le 5 une atmosphère riche en CO₂ (5%) inhibe sa production.⁷⁸ Pour le sérotype 8, les résultats discordent entre les études. Sur certaines souches, on n'observe aucune influence du CO₂, pour d'autres l'effet est inhibiteur alors que sur une souche particulière (Becker) un auteur a observé une augmentation de la production de capsule de type 8.⁷⁹ L'explication de ces résultats tiendrait à la présence de facteurs de transcription exprimés différemment selon les souches employées dans les études.

La production de la capsule In Vivo a été démontrée dans plusieurs modèles animaux. On peut citer les travaux de Lee et de son équipe qui ont évalué la production du polysaccharide CP8 sur un modèle animal (lapin) d'endocardite à *S. aureus*. Les bactéries recueillies au niveau des végétations sur les valves expriment la capsule à des niveaux similaires à ceux observés sur milieu solide suggérant un rôle physiopathologique important dans ce type d'infection.⁸⁰ Cette observation n'est cependant pas transposable à toutes les infections staphylococciques. Une étude portant sur des patients atteints de mucoviscidose a montré que les souches de *S. aureus* isolées au niveau des poumons et du nez produisent des niveaux très faibles de cap5. On a retrouvé dans ces deux tissus des niveaux élevés de CO₂ (>4%) ce qui rejoint les observations faites In Vitro.⁷⁸

Les résultats de ces études confirment que les conditions environnementales exercent un effet régulateur majeur sur l'expression de la capsule notamment du sérotype 5 et ce, aussi bien In Vitro qu'In Vivo.

b) Support génétique

La synthèse des polysaccharides composant la capsule nécessite l'action de nombreuses enzymes qui sont codées par des gènes situés sur le chromosome bactérien. Les gènes sont regroupés sur un locus d'environ 17,5 kb et sont organisés en opéron. Les loci *cap5* et *cap8* comportent 16 gènes numérotés de A à P dont 12 sont quasi-identiques entre les deux sérogroupes. La transcription est régulée par le biais de promoteurs situés en amont de chaque gène. Le plus important est celui situé en amont du gène A, les autres sont plus faibles ce qui suggère que tous ces gènes sont principalement transcrits sous forme d'un seul ARNm de très grande taille.⁸¹

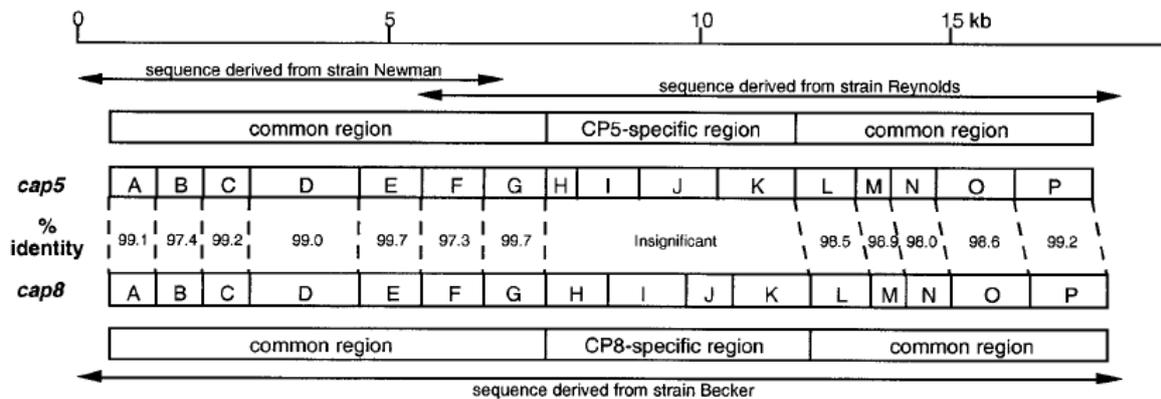


Figure 14 : comparaison des deux groupes de gènes encodant les enzymes nécessaires à la production de cap5 et cap8. Seule la région centrale diffère, les extrémités étant communes aux deux sérogroupes.

Source : Katherine O'Riordan and Jean C. Lee. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, Jan. 2004, p. 218–234 Vol. 17, No. 1.

Contrairement à de nombreux promoteurs de gènes bactériens celui de *capA* n'est pas directement régulé par un facteur Sigma (σ). Deux loci ont été décrits comme étant nécessaires à la production de la *cap5* (régulation positive), il s'agit du système de régulation ArlRS et de *yabJ-spoVG*. Les deux sont sous la dépendance du facteur σB et leurs effecteurs viennent se lier au promoteur du gène *capA* permettant sa transcription.⁸² On sait aussi que de nombreuses autres protéines encore inconnues peuvent se lier à ce promoteur et exercer un effet modulateur sur la synthèse du gène *capA* notamment le système *agr* dont l'effecteur reste à trouver.⁷⁷

c) Rôle physiopathologique

La contribution précise de la capsule en termes de virulence est difficile à apprécier en raison du nombre de facteurs y contribuant chez *S. aureus*. L'étude la plus contributive à ce sujet a été menée en 2005 par Watts et al. sur des souches modifiées par génie génétique. Ils ont pris pour point de départ la souche de *S. aureus* Reynolds qui sert de prototype pour toutes les études sur la capsule sérotype 5. Le génome de cette bactérie a été modifié de manière à obtenir 3 souches qui ne diffèrent que par la nature de leur capsule : une souche CP5, une souche CP8 et un mutant non capsulé. Ces isolats ont ensuite été inoculés chez la souris afin d'observer la contribution respective des différents phénotypes. Il apparaît que les souches capsulées induisent des bactériémies plus importantes et plus persistantes que le mutant isogénique non capsulé. Cet effet était plus important avec la souche Reynolds CP5 qu'avec la souche Reynolds CP8⁸³. La quantité de bactéries dans le sang de ces souris a été influencée par une propriété connue depuis longtemps des microbiologistes : la capacité de la capsule à conférer une résistance à la phagocytose aux souches de *S. aureus*.⁸⁴ Cette résistance s'expliquerait par une diminution de l'activité des deux principales opsonines :

- Les anticorps, IgG principalement, seraient moins efficaces de par la nécessité pour l'hôte d'en produire spécifiquement dirigés contre un sérotype de capsule particulier,
- La capsule diminue la quantité de fraction C3b du complément fixé sur la bactérie, de plus elle gêne sa reconnaissance par le récepteur du complément CR1.⁸⁵

Selon le type d'infection, la présence de la capsule n'est pas toujours associée à une augmentation de la virulence. Les exopolysaccharides présents tout autour de la bactérie vont masquer les adhésines nécessaires à l'adhésion avec les cellules endothéliales. Ainsi dans un modèle d'endocardite chez le rat, les souches capsulées ont montré une virulence plus faible que le mutant non capsulé.⁸⁶

Le système immunitaire humain est capable de reconnaître des antigènes polysaccharidiques notamment ceux de la capsule de *S. aureus*. Les mécanismes impliqués dans les réponses immunitaires des infections à staphylocoques sont encore mal élucidés. Habituellement, les sujets sains possèdent des anticorps dans leur sérum dirigés contre les composants de la paroi bactérienne comme le peptidoglycane, les acides téichoïques et les polysaccharides des capsules 5 et 8 mais les titres sont faibles. Des essais In Vitro de phagocytose par les polynucléaires neutrophiles ont montré que moins de 50% des bactéries d'un inoculum standard était opsonisées par les anticorps présents dans ces sérums. Ce taux monte à 95% quand on utilise le sérum d'un sujet à qui on a administré un vaccin anti-CP5.⁸⁷ Ces expériences démontrent l'importance du pouvoir antigénique de la capsule de *S. aureus* et ont amené les chercheurs à envisager la production d'un vaccin pour prévenir les infections chez les sujets à risque.

d) Développement d'un vaccin anti-staphylocoque

Les polysaccharides de capsule représentent une cible de choix pour l'élaboration d'un vaccin comme le sont les antigènes de la capsule du pneumocoque. Le développement d'un vaccin universel contre *S. aureus* a longtemps été envisagé, cependant tous les essais menés par les laboratoires se sont soldés par un échec notamment en phase III dans l'évaluation de l'efficacité de la protection conférée par ces candidats. Les causes de ces échecs sont multiples : mauvais choix de l'antigène, production d'anticorps sans activité bactéricide, mécanismes d'échappements de la bactérie, absence de corrélation entre le modèle animal et l'homme... Il a récemment été mis en évidence que la réponse anticorps n'est pas la seule composante à prendre en compte pour obtenir une réponse immunitaire satisfaisante contre *S. aureus*. Les patients atteints du syndrome de Jobs présentent une déficience en STAT3, une protéine de signalisation nécessaire au développement des lymphocytes Th17 qui sécrètent l'interleukine 17. Ces personnes développent fréquemment des infections cutanées à *S. aureus* soulignant le rôle essentiel de l'IL17 dans la défense innée contre ce germe.

Les tentatives de développement d'un vaccin dirigé contre les antigènes capsulaires ayant échouées, il apparaît nécessaire de se tourner vers d'autres cibles ou d'autres voies comme les lymphocytes T pour obtenir une protection efficace chez les personnes à risque.

4. Biofilm bactérien

Parmi les espèces bactériennes productrices de biofilm impliquées dans les infections, les espèces du genre *Staphylococcus* sont majoritaires.⁸⁸ Le biofilm joue un rôle très important dans la physiopathologie de certaines infections staphylococciques notamment dans la résistance aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte. Il est possible de détecter au laboratoire par des méthodes simples la capacité d'une souche à produire du biofilm.

a) Structure et organisation du biofilm chez *S. aureus*

Le biofilm se définit comme étant « un ensemble de bactéries agrégées et entourées par une matrice polymérique autoproduite pouvant contenir des molécules de l'hôte »⁸⁹. Les composants du biofilm se répartissent ainsi :

- 10 à 25% de bactéries pouvant appartenir à plusieurs espèces différentes,
- 75 à 90% de matrice extracellulaire composée d'un mélange de polysaccharides, d'acides téichoïques, de protéines, de lipides et d'acides nucléiques.

Ces composés s'organisent en couches multiples au sein desquelles les microcolonies de *S. aureus* peuvent se développer. Ce mode de vie offre de nombreux avantages aux bactéries qui deviennent plus résistantes aux variations de pH, aux UV et aux forces de cisaillement. L'aspect macroscopique de ces biofilms est souvent celui d'une excroissance en forme de champignon.⁹⁰ Cette structure est traversée par un réseau dense de canaux remplis d'un milieu aqueux qui permet la diffusion des nutriments notamment pour les bactéries situées dans les couches les plus profondes du biofilm. L'activité bactérienne au sein du biofilm est variable selon leur position. En périphérie les cellules bactériennes sont très actives et se multiplient rapidement alors qu'au centre règne un environnement anaérobie où les germes ont une activité métabolique ralentie.⁹¹

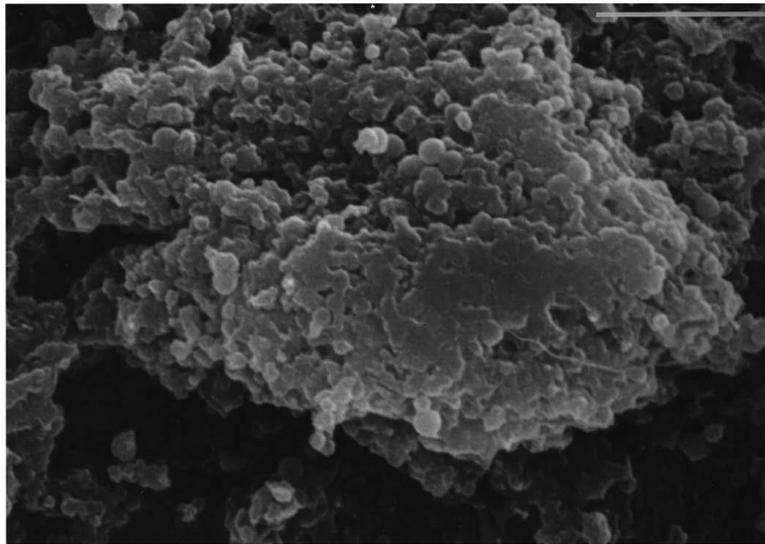


Figure 15 : photographie en microscopie électronique à balayage de la surface d'un implant retiré à 5 jours montrant un grand nombre de cocci agglutinés au sein d'un biofilm. *Source : Nathan K. Archer et al. Virulence 2:5, 445-459; Septembre/Octobre 2011; © 2011 Landes Bioscience*

La matrice extracellulaire est capable de fixer un grand nombre de molécules d'eau par liaisons hydrogène ce qui permet à la bactérie de lutter efficacement contre la dessiccation dans l'environnement extérieur. Ce phénomène est un mécanisme clé de la survie de *S. aureus* sur les surfaces abiotiques sur de longues périodes.

b) Formation du biofilm

L'étude de la production du biofilm In Vitro et In Vivo a montré que sa formation se faisait selon une séquence programmée, en plusieurs étapes.

La première étape correspond à la détection d'une surface par les cellules bactériennes. Cette étape a été déduite de l'observation de cellules bactériennes au microscope dont le déplacement et la disposition sur la surface varie selon les espèces. Les signaux moléculaires qui permettent à la bactérie de repérer une surface propice à la colonisation sont encore mal connus.⁹² In vivo, cette étape est essentielle dans la physiopathologie des infections associées au biofilm, la surface en cause peut être artificielle (dispositif médical implantable) ou naturelle (tissu nécrosé).

Staphylococcus aureus est capable d'exprimer de nombreuses protéines qui vont permettre l'adhésion qui représente la deuxième étape de la formation du biofilm. Ces adhésines sont regroupées sous l'appellation de MSCRAMMs pour Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, elles ont la capacité de lier de nombreuses protéines humaines comme la fibronectine ou le fibrinogène ce qui permet à *S. aureus* de se lier de manière covalente aux surfaces biotiques. En ce qui concerne les surfaces abiotiques, la liaison se fait par l'intermédiaire de liaisons chimiques non spécifiques (liaisons hydrogènes, forces de Van Der Waals, interactions hydrophobes et interactions acide-base) ainsi que par liaison aux protéines de l'hôte fixées sur la surface.⁹³

Une fois les premières bactéries fixées sur la surface, l'étape suivante est une phase de maturation caractérisée par la multiplication et l'agglutination des cellules bactériennes. C'est durant cette phase que le biofilm acquiert sa structure tridimensionnelle. La principale molécule permettant l'adhésion est un polysaccharide initialement décrit chez *S. epidermidis* appelé PIA pour Polysaccharide Intercellular Adhesin.⁹⁴ Le PIA est un polymère de β 1-6-N-Acétyl-Glucosamine partiellement déacétylé (20% environ) qui associé aux acides téichoïques et aux protéines staphylococciques forme ce qu'on a longtemps appelé « slime » et qui est en fait la matrice extracellulaire composant le biofilm.⁹³ Sa production n'est pas exclusive à *S. aureus* ni même au genre *Staphylococcus*, on le retrouve chez de nombreuses bactéries pathogènes productrices de biofilm.⁹⁵

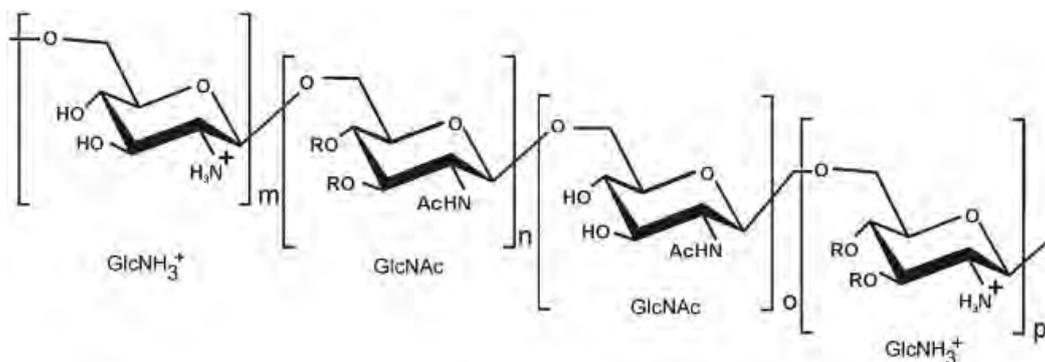


Figure 16 : structure moléculaire du PIA. Source : Holger Rohde, Stephanie Frankenberger, Ulrich Zähringer, Dietrich Mack. European Journal of Cell Biology 89 (2010) 103–111

La déacétylation du PIA joue un rôle biologique majeur. Au pH In Vivo, les groupements amine libre du PIA sont chargés positivement alors que la surface de la membrane de *S. aureus* est chargée négativement principalement par les acides téichoïques. Ces groupements permettent au PIA de fixer les membranes bactériennes comme une « glue » par liaison électrostatique.⁹⁶

La voie de formation du biofilm dépendante du PIA est régulée par le locus *ica*. Cet opéron est constitué de cinq gènes codant pour deux NAG-transférases (*icaA* et *icaD*), une PIA déacétylase (*icaB*), un transporteur présumé (*icaC*) et un gène régulateur (*icaR*). Ce système est régulé par plusieurs facteurs notamment la teneur en oxygène du milieu.⁹⁷ L'anaérobiose induit une régulation positive de l'opéron par le biais du système SrrAB (Staphylococcal respiratory response regulator). Le produit de ce système, la protéine SrrA, se lie à une séquence de 100 paires de base située en amont du locus *ica* ce qui induit l'augmentation de la transcription de *icaA* et la répression de celle de *icaR*.⁹⁸

L'isolement de *S. aureus* In Vitro se fait le plus souvent en condition aérobie ce qui induit une modification phénotypique des souches isolées.

En culture sur milieu solide, la bactérie va orienter sa production d'exopolysaccharides vers les polysaccharides de capsule plutôt que vers ceux responsables de la formation du biofilm. La protéine de régulation du biofilm Rbf joue aussi un rôle important en diminuant la transcription de *icaR* ce qui induit l'augmentation globale de la transcription des autres gènes *ica*.⁹⁹ D'autres facteurs sont aussi capables d'exercer une régulation sur *ica* notamment le glucose, l'éthanol, la température et certains antibiotiques comme les tétracyclines.

Le PIA est sans doute un élément important dans la formation du biofilm mais il n'est cependant pas indispensable. *S. aureus* est capable de produire du biofilm selon des voies indépendantes du PIA comme en témoignent certaines souches productrices de biofilm chez lesquelles on ne retrouve pas l'opéron *ica*. En l'absence de PIA, l'adhésion cellulaire se fait essentiellement par le biais de protéines dont la nature varie d'une souche à l'autre. Les différentes études portant sur des souches de *S. aureus* *ica* muté ont mis en évidence plusieurs adhésines, généralement liées à la membrane, pouvant contribuer à former du biofilm parmi lesquelles Bap, les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPs), *sasG*, la protéine A (SpA) et les protéine de la famille des sdr.¹⁰⁰ La matrice du biofilm est un mélange de lipides, de protéines mais aussi d'acides nucléiques extracellulaires. Sa présence et son rôle ont d'abord été documentés chez *P. aeruginosa*. Plusieurs auteurs ont apporté des éléments appuyant cette hypothèse. En 2002, une équipe a montré par une expérience In Vitro qu'il est possible d'éliminer un biofilm immature en ajoutant une DNase.¹⁰¹ De plus, des essais thérapeutiques chez des patients atteints de mucoviscidose ont montré que l'administration de DNase conjointe aux antibiotiques apportait un bénéfice chez ces patients dans la prévention des colonisations à *P. aeruginosa*.¹⁰² Enfin la présence de DNase sur la peau empêcherait le développement de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* au sein d'un biofilm.¹⁰³

Les mécanismes permettant l'élaboration de la structure tridimensionnelle du biofilm chez *S. aureus* sont encore inconnus. Chez d'autres genres bactériens notamment *Pseudomonas* on sait que la structuration du biofilm passe par l'action de biosurfactants appelés rhamnolipides.¹⁰⁴ Ces agents sont sous la dépendance d'un système de quorum-sensing et permettent de préserver des canaux fluidiques autour des macrocolonies. Pour d'autres genres producteurs de PIA, la structuration du biofilm passe par une dégradation enzymatique qui n'est vraisemblablement pas retrouvée chez *S. aureus*.

Le détachement des bactéries est la dernière étape de développement du biofilm. Cette phase est essentielle car elle permet aux bactéries de disséminer dans l'organisme et de coloniser d'autres sites infectieux. Cette étape est assurée par des enzymes et des peptides surfactants (PSMs) identiques à ceux décrits plus haut pour la maturation du biofilm. Leur expression est aussi sous la dépendance du système de régulation *agr*.

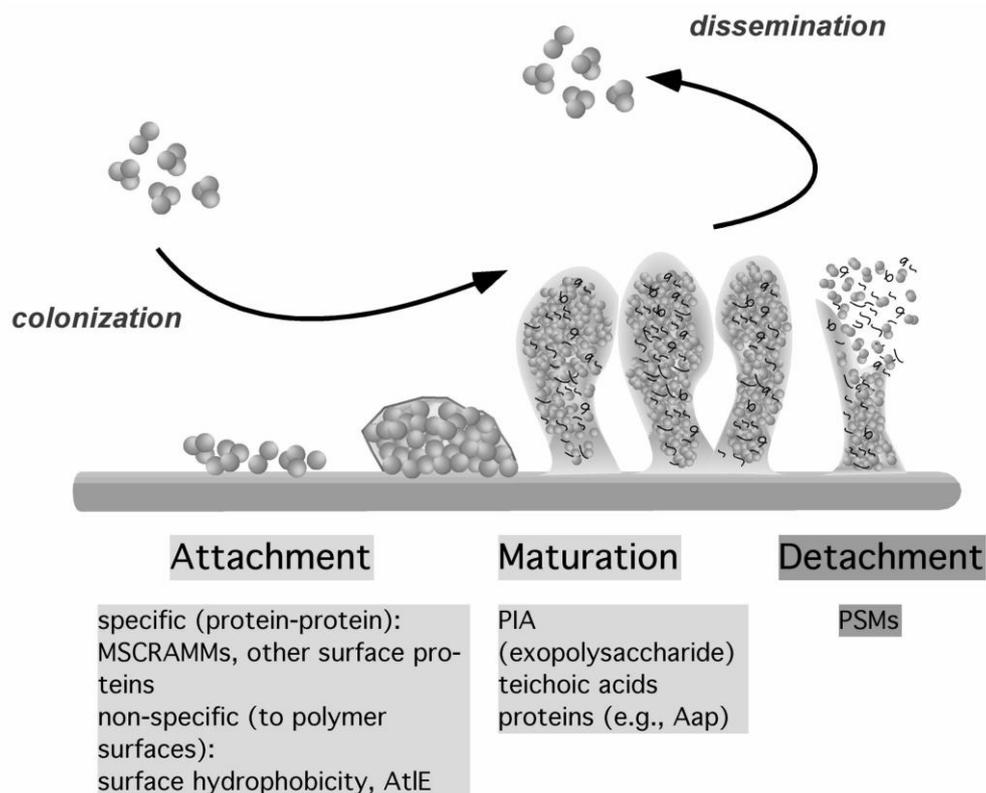


Figure 17 : schéma décrivant les différentes phases de formation du biofilm bactérien de la colonisation à la dissémination. *Source : Nathan K. Archer et al. Virulence 2:5, 445-459; Septembre/Octobre 2011; © 2011 Landes Bioscience*

c) Infections associées à la production de biofilm

Le mode de vie adopté par *S. aureus* -planctonique ou associé au biofilm- dépend de la localisation du foyer infectieux. Ce choix est généralement conditionné par la présence ou non d'une surface inerte propice à la colonisation et à la formation du biofilm.

Les ostéomyélites à *S. aureus* sont particulièrement révélatrices de l'implication du biofilm dans la chronicité et la difficulté de traitement de ces infections. Elles peuvent être causées par un large éventail de bactéries et de champignons mais *S. aureus* est le pathogène le plus fréquemment isolé.¹⁰⁵ L'atteinte de l'os par la bactérie peut se faire par deux voies différentes :

- diffusion hématogène à partir d'un foyer infectieux existant ou non,
- inoculation directe lors d'une chirurgie ou d'un traumatisme.¹⁰⁶

Dans les ostéomyélites, la colonisation se fait en plusieurs étapes :

1. *S. aureus* sous forme planctonique dans le sang surexprime les protéines d'adhésion aux protéines de l'hôte (adhésines).
2. Une fois amené par la circulation dans l'os, il s'attache préférentiellement au niveau de zones lésées et entame une phase de multiplication.
3. La production d'un biofilm immature débute pendant que la bactérie continue de se multiplier.

4. Les niveaux d'AIP (AutoInducing Peptide) augmentent progressivement avec la population bactérienne jusqu'à l'activation du système de régulation agr.
5. *S. aureus* va alors produire de nombreux facteurs de virulence qui vont lui permettre d'échapper aux défenses immunitaires innées de l'hôte qui tente d'éliminer le biofilm et le foyer infectieux naissant.
6. De nombreux composés bactériens exercent une activité pro-inflammatoire qui se manifeste par un afflux de polynucléaires vers le site de l'infection mais ceux-ci sont en partie lysés par les toxines de *S. aureus*. De plus des facteurs d'échappement au système immunitaire de la bactérie empêchent la mise en place d'une opsonisation par le complément et d'une phagocytose efficaces.
7. La libération de radicaux libres oxygénés par les polynucléaires lysés et de protéases originaires de l'hôte et de la bactérie provoque une destruction des tissus avoisinants ce qui fournit à *S. aureus* une surface propice à son développement et à la maturation du biofilm.
8. Une fois installé, *S. aureus* développe une infection sur un mode chronique très difficile à éradiquer avec une probabilité importante de diffusion hématogène vers d'autres sites de l'hôte.⁹⁰

L'efficacité des antibiotiques sur ce type d'infection est limitée de par la présence du biofilm mais aussi à cause de la physiologie vasculaire osseuse. Il est nécessaire chez l'adulte d'éliminer chirurgicalement le foyer bactérien ainsi que les tissus endommagés qui servent de support au biofilm en plus de l'administration d'un traitement antibiotique. Ce constat n'est pas transposable pour les enfants qui sont capables de résorber le tissu osseux nécrosé et de guérir seulement avec l'antibiothérapie ce qui est rare pour une infection associée à un biofilm.¹⁰⁵

Les infections sur matériel implantable sont pour les cliniciens la deuxième grande problématique liée au biofilm des staphylocoques. Quasiment tous les dispositifs médicaux implantables sont concernés ce qui s'explique par le fait que ces matériaux offrent une surface très propice à la colonisation. Dès leur implantation, les surfaces inertes de ces dispositifs se recouvrent de protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte or *S. aureus* synthétise de nombreuses adhésines capables de se fixer dessus avec une très forte affinité.¹⁰⁷ Comme pour l'ostéomyélite, le seul moyen d'éliminer complètement ce genre de foyer bactérien est de retirer le matériel infecté en plus d'une antibiothérapie adaptée. Cette prise en charge peut s'avérer extrêmement lourde pour le patient en termes de morbidité quand il s'agit de matériel type valve cardiaque ou prothèse osseuse.

Le biofilm est aussi impliqué dans les infections de plaie chroniques qu'on rencontre très fréquemment au niveau des ulcères de pied chez les patients diabétiques. On retrouve *S. aureus* dans 88 à 93.5% des cultures réalisées sur des prélèvements d'ulcères de jambe liés à une insuffisance veineuse.¹⁰⁸

Les endocardites à *S. aureus* sont connues pour leur taux de mortalité très élevé, supérieur à 50%.⁹⁰ La production de biofilm au niveau des végétations a été démontrée dans plusieurs études y compris dans les cas d'endocardites avec hémocultures négatives. Dans ce dernier cas, les bactéries restent à l'intérieur du biofilm et leur détection passe par des techniques de biologie moléculaire comme l'analyse en PCR des gènes codant pour l'ARN16s.¹⁰⁹ Contrairement aux ostéomyélites, il est possible de traiter avec succès ces infections par une antibiothérapie seule car la formation de biofilm au niveau des valves est limitée par les grandes forces de cisaillement qui y règnent.

La production de biofilm est une problématique complexe. Sa présence est corrélée à des infections chroniques, difficiles à traiter. La leucocidine de Panton-Valentine participe aussi à l'élaboration d'un foyer infectieux persistant, notamment dans les phases précoces de développement du biofilm, en aidant le germe à échapper aux défenses immunitaires innées de l'hôte.

5. Les Phenol Soluble Modulins ou PSMs

Les PSMs forment une famille de toxines découverte plus récemment et qui semble jouer un rôle majeur dans la pathogénicité des bactéries du genre *Staphylococcus*. Elles ont été découvertes en 1999 chez *S. epidermidis* et ont d'abord été décrites par les auteurs comme un « complexe polypeptidique pro-inflammatoire ». ¹¹⁰ La nomenclature de ces molécules est basée sur leurs propriétés biochimiques mises en évidence par extraction à chaud par le phénol. Il existe trois groupes de PSMs chez *S. aureus* : quatre peptides α numérotés de 1 à 4, deux peptides β et un peptide γ communément appelé toxine δ . Les gènes encodant ces toxines sont situés sur le chromosome bactérien, ils sont organisés pour les groupes α et β en opérons dénommés *psm α* et *psm β* . Le gène codant la toxine δ est lui situé au sein de la séquence qui code pour l'ARNIII molécule effectrice du système de régulation agr. Les PSM α comportent entre 20 et 25 acides aminés contre 40 (environ) pour les β . La production de ces peptides est directement régulée par le système agr. ¹¹¹

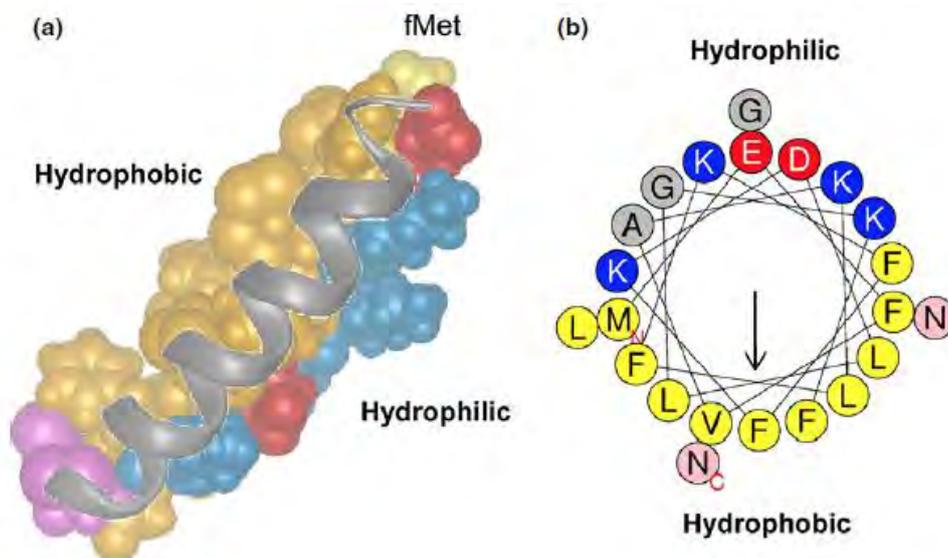


Figure 18 : structure du PSM α 3, les acides aminés hydrophiles et hydrophobes se distribuent chacun à l'opposé de la structure en hélice α conférant à ce peptide un très fort caractère amphiphile. *Source :* Andreas Peschel and Michael Otto. *Nature Review Microbiology*. Volume 11 October 2013

Ces peptides possèdent un très fort caractère amphipathique qui est à l'origine de leur rôle physiopathologique dans les infections staphylococciques. Ce sont de puissants surfactants capables de désorganiser les membranes phospholipidiques des cellules ou d'émulsifier les substances lipidiques. Leurs propriétés biochimiques leur confèrent de nombreux rôles :

- Emulsifier les nutriments et faciliter le développement de la bactérie dans des milieux très lipophiles comme la peau humaine,
- Formation de canaux au sein des biofilms, les PSMs seraient les agents permettant la structuration de la matrice du biofilm,
- Action cytolytique directe sans médiation par un récepteur qui permet à la bactérie de lyser les cellules de l'hôte notamment les polynucléaires,
- Activité antibactérienne (limitée) de certains peptides.

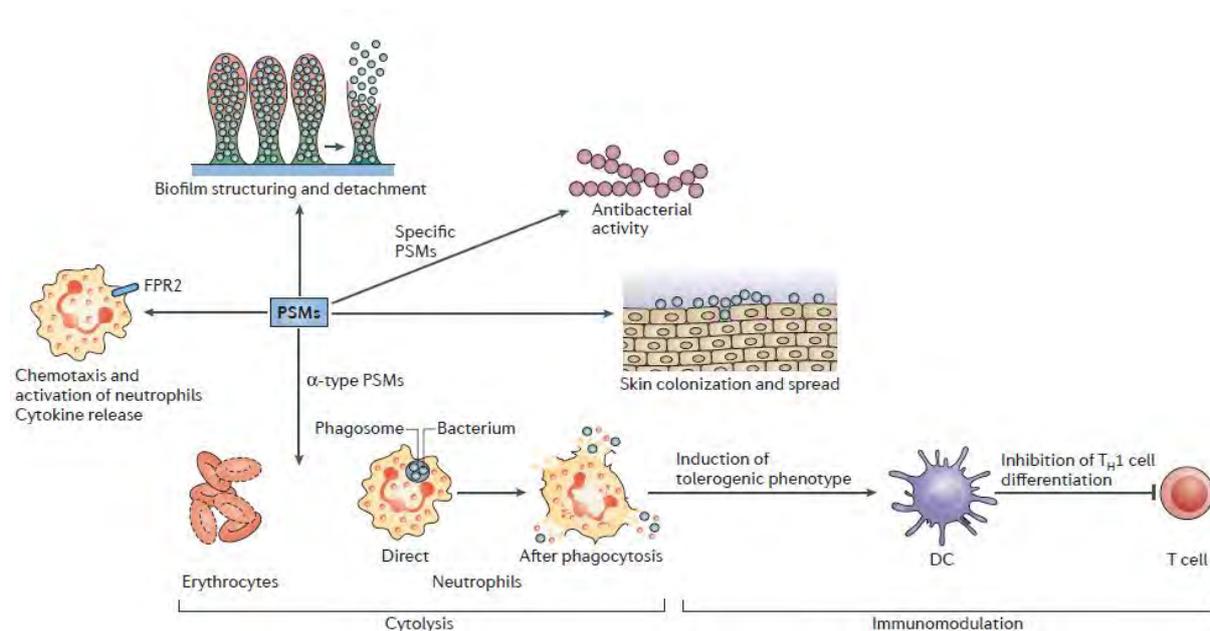


Figure 19 : Fonctions des PSMs. Source : Andreas Peschel and Michael Otto. Nature Review Microbiology. Volume 11 October 2013

Le mécanisme d'échappement à la phagocytose par les polynucléaires ressemble à celui décrit pour les leucocidines. L'action des PSMs se ferait au sein du phagosome plutôt qu'en extracellulaire. Ce phénomène s'explique par le mode d'activation du système agr qui est la résultante d'une « diffusion limitée » de l'AIP (Auto Inducer Peptide). L'export des PSMs se fait par le biais d'un transporteur transmembranaire de type ABC appelé Pmt. Cette protéine est un partenaire essentiel de l'action des PSMs, elle permet non seulement leur export mais aussi de protéger la bactérie de l'action cytolytique des PSMs sécrétés par la bactérie elle-même ou celles avoisinantes.

Les PSMs s'inscrivent en tant que facteurs de virulence majeurs aux côtés des leucocidines. Il est cependant difficile de déterminer les contributions respectives de ces deux groupes In Vivo, les résultats étant différents selon les études et les modèles étudiés.¹¹¹

6. Gène *sasX*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sécrètent de très nombreux facteurs qui leur confèrent leur pouvoir pathogène. Il existe aussi d'autres molécules qui ne sont pas sécrétées dans le milieu extérieur mais ancrées dans la paroi bactérienne et qui jouent un rôle physiopathologique important. Ces protéines partagent des caractéristiques moléculaires communes au niveau des extrémités de leur chaîne d'acides aminés. Leur extrémité N-terminale est un peptide de signal nécessaire pour la sécrétion par le biais de la protéine Sec, la C-terminale contient un signal d'ancrage à la paroi par la sortase. Le signal d'ancrage contient un motif d'acides aminés conservé appelé LPXTG (Leucine-Proline-acide aminé X-Thréonine-Glycine) qui est reconnu et clivé par la sortase qui lie de manière covalente la protéine à la paroi. La sortase est une transpeptidase liée à la membrane codée par le gène *srtA*.¹¹² Les protéines liées de manière covalente à la paroi et leurs gènes correspondant sont dénommées par la nomenclature SAS pour *Staphylococcus aureus* Surface.¹¹³

SasX est une protéine appartenant à cette famille qui a été mise en évidence en mai 2012 par une équipe sino-américaine en tant que facteur de virulence et de dissémination majeur chez *S. aureus* en Chine. Alors que la présence du gène *sasX* était initialement décrite comme exceptionnelle¹¹⁴, l'augmentation de sa prévalence au cours des années 2000 s'est avérée être corrélée à la diffusion sur un mode épidémique du complexe clonal ST239 en Chine. L'analyse des séquences en amont et en aval du gène a montré que celui-ci a toujours été acquis par transfert horizontal du phage Φ SPP β -like dont le génome a été intégré sous forme de prophage.

Cette protéine possède de multiples fonctions ce qui est fréquent pour les protéines de surface de *S. aureus*. Parmi ces rôles on peut notamment citer :

1. Facteur d'adhésion à l'épithélium nasal, elle aide à la colonisation des fosses nasales et donc à la diffusion des souches porteuses,
2. Formation d'agrégats bactériens selon une voie indépendante de l'opéron *ica* ce qui contribue à la formation du biofilm,
3. Facteur d'adhésion aux surfaces abiotiques nécessaire aussi à la formation du biofilm,
4. Augmentation de l'échappement et de la résistance à la phagocytose (observation faite par comparaison avec un mutant *sasX* KO).

Les auteurs de l'étude concluent que la protéine SasX est un facteur majeur dans la diffusion de SARM en Asie et qu'il faut s'attendre à sa propagation au niveau international. Ils préconisent aussi de développer des approches thérapeutiques ciblées sur cette protéine pour prévenir la colonisation et les infections par les SARM.¹¹⁵

7. Les systèmes de régulation génique chez *S. aureus*

Les bactéries pathogènes, aussi bien GRAM positives que négatives, ont besoin d'exprimer tout un arsenal de facteurs de virulence pour envahir et se multiplier à l'intérieur de l'hôte. L'expression de ces facteurs nécessite une coordination délicate qui est assurée par des systèmes de régulation spécifiques. Les bactéries « communiquent » entre elles, par l'intermédiaire de peptides dénommés AIs pour AutoInducers dont la concentration est dépendante de la densité bactérienne et des caractéristiques du milieu environnant.¹¹⁶ Quand cette concentration atteint un seuil critique, les systèmes de régulation s'activent et coordonnent la transcription des gènes codant les facteurs de virulence.¹¹⁷ Ce mode de fonctionnement est appelé Quorum Sensing en référence à la taille de la population bactérienne nécessaire à l'activation des systèmes de régulation. Toutefois, le terme de Quorum est controversé, ce n'est pas directement la population bactérienne qui est critique mais la concentration en peptides AI. Les différents systèmes de régulation peuvent s'activer même pour une seule cellule bactérienne si elle est confinée dans un milieu où les molécules de signal ne diffusent pas ou très peu. Cette nuance est importante In Vivo où la bactérie peut être enfermée dans une structure comme l'endosome. Ainsi d'autres dénominations ont été suggérées comme Diffusion Sensing ou Efficiency Sensing.¹¹⁸

a) Le système *agr*

S. aureus possède plusieurs systèmes de Quorum-Sensing. L'accessory gene regulator ou *agr* joue un rôle important dans la physiopathologie des infections à staphylocoque. Ce système a été identifié en 1986 par l'étude d'une souche de *S. aureus* mutée sur le locus *agr* suite à l'insertion du transposon Tn551 qui confère une résistance à l'érythromycine. L'expression d'un ensemble de protéines de virulence a été évaluée In Vitro sur cette souche. Les taux des hémolysines, de la toxic shock syndrome toxin (TSST-1), de la staphylokinase était 50 fois moins élevés par rapport à la souche non mutée. A contrario la production de protéine A était 20 fois plus élevée.¹¹⁹ A partir de cette observation, une hypothèse de rôle In Vivo a été formulée pour ce locus. L'*agr* ne s'active pas dans les premières phases de colonisation de l'hôte, la production protéique de la bactérie s'oriente vers des protéines de surface notamment des adhésines. Quand le foyer infectieux est établi, l'*agr* s'active et induit la production de facteurs permettant d'attaquer les tissus de l'hôte et d'échapper à ses défenses immunitaires.¹²⁰

Le locus *agr* est constitué de deux opérons dénommés P2 et P3. Le premier, P2, possède 4 cadres de lecture listés de A à D. Le second, P3, possède deux cadres de lecture dont l'un correspond au 26 acides aminés de l'hémolysine- δ . Les transcrits issus de ces opérons sont nommés RNAII et RNAPIII. Un modèle de l'activation d'*agr* a été proposé :

- Le précurseur de l'AIP est produit à partir du gène *agrD*,
- Ce propeptide de 7 à 9 résidus est hydrolysé par la protéine transmembranaire AgrB avec formation d'un cycle thiolactone au sein de la chaîne d'acides aminés,

- AgrB porte aussi un transporteur de type ABC qui va sécréter l'AIP formé à partir du précurseur,
- L'AIP dans le milieu extérieur va se fixer sur le récepteur spécifique AgrC soit sur la même bactérie soit sur une bactérie voisine,
- AgrC est un complexe transmembranaire avec activité histidine kinase qui phosphoryle la protéine AgrA suite à la fixation de l'AIP,
- AgrA se lie aux promoteurs des opérons P2 et P3 et induit la production de RNAII et RNAIII,
- RNAIII est à la fois régulateur et effecteur de ce système.¹¹⁶

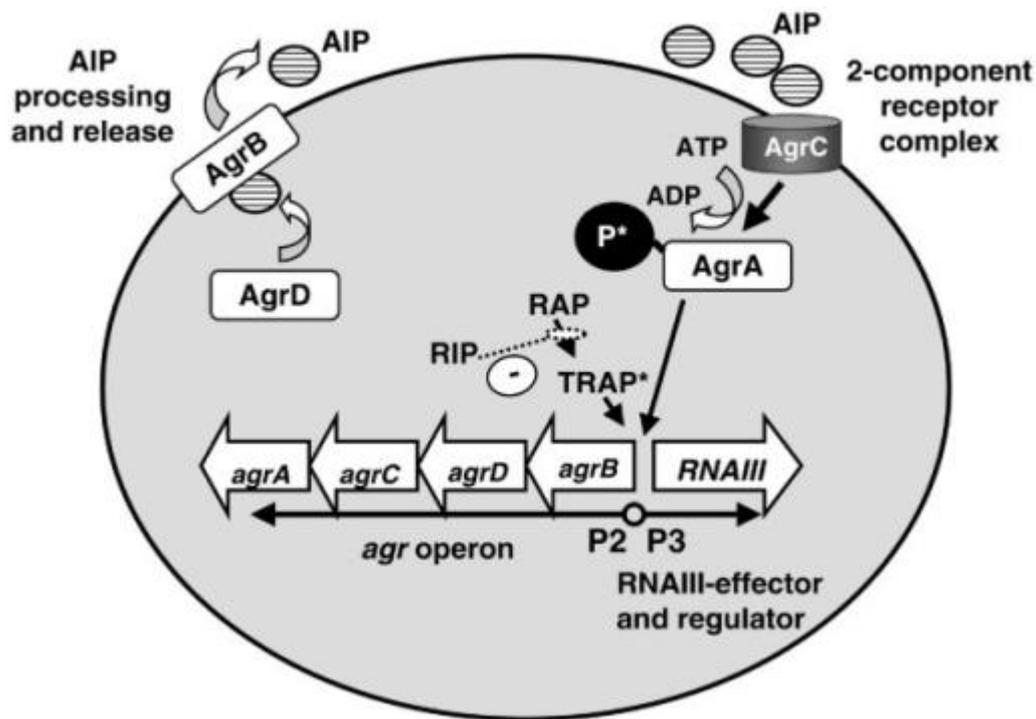


Figure 20 : Fonctionnement du système agr chez *S. aureus*. Source : Shadaba Asad and Steven M Opal Critical Care 2008, 12:236

RNAIII fait partie de la famille des sRNA ou small regulatory RNA. Il est constitué de 514 paires de base organisées sous forme d'une structure à 14 boucles. De nombreuses études portent sur les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de virulence par cet ARN. Il est capable de moduler la transcription des ARN messagers en s'appariant avec eux. Deux cibles directes ont été identifiées : l'ARNm codant l'hémolysine- α et celui codant la protéine A. L'effet de cet appariement est variable selon l'ARNm cible. Pour l'ARNm codant la protéine A, RNAIII est capable de se fixer par son extrémité 3' sur le site de liaison au ribosome de l'ARNm de la protéine A et donc d'empêcher sa traduction. On sait aussi que la formation d'ARN double brin rend celui-ci plus sensible à l'action de la RNaseIII ce qui diminue la durée de vie du messageur.¹²¹ A contrario, l'hybridation de RNAIII avec l'ARNm de l'hémolysine- α empêche la formation d'une boucle intramoléculaire au sein de cet ARN ce qui dévoile le site d'initiation de la traduction. Dans ce cas, l'ARN « antisens » (RNAIII) joue le rôle d'activateur de la traduction.¹²² On sait aussi que RNAIII peut agir sur l'expression des gènes de manière indirecte en interagissant avec d'autres systèmes de régulation. C'est le cas du facteur de transcription *rot*, RNAIII est capable d'inhiber la traduction de son ARNm par hybridation.¹²³

Ces mécanismes servent d'exemples et ne sont cependant pas exhaustifs, l'action de RNAIII sur les autres facteurs de virulence reste inconnue.

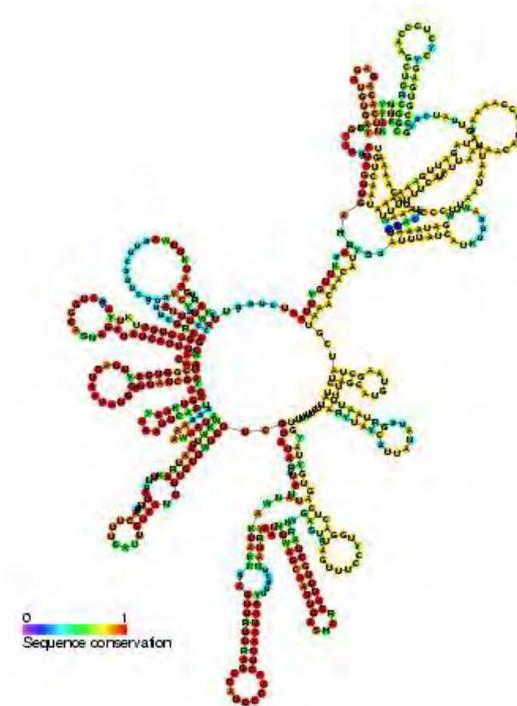


Figure 21 : Structure secondaire prédite et conservation du transcrite RNAIII. Source : base de données RFAM consultable en ligne sur <http://rfam.xfam.org/>

Quatre grands groupes de système agr ont été définis selon la séquence d'acides aminés qui constitue l'AIP, ils sont numérotés de I à IV. Le type agr est une caractéristique génotypique d'une souche donnée. Ces peptides ont la particularité d'exercer une inhibition croisée les uns sur les autres. Trois sous-groupes d'inhibiteurs peuvent être définis : AIP I et IV, AIP II et AIP III. L'addition d'AIP sur une souche d'un type agr différent induit l'inhibition du système agr. Ce phénomène d'inhibition croisée est aussi retrouvé entre les différentes espèces de staphylocoques. Un mécanisme hypothétique a été proposé : l'activation serait le résultat d'une liaison covalente de l'AIP au complexe AgrC par transacylation tandis que l'inhibition serait un phénomène de compétition entre les différents AIPs par liaison non covalente. Une observation intéressante est que l'effet inhibiteur exercé par *S. aureus* serait moins important que celui exercé par *S. epidermidis* ce qui contribuerait à sa persistance sur la peau.¹²⁰

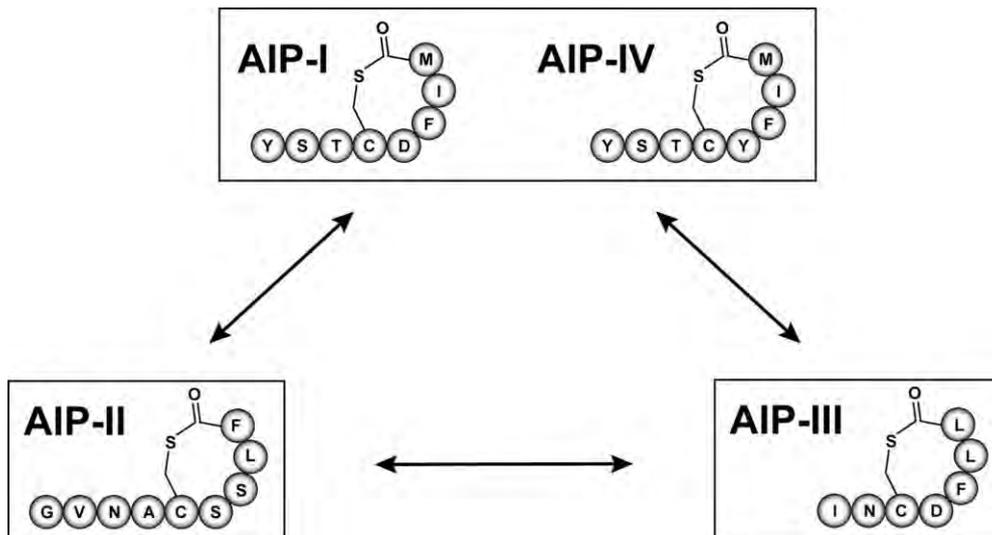


Figure 22 : Les différents types d'AIPs et groupes d'inhibition croisée (représentés par une flèche)
 Source : Cheryl L. Malone, Blaise R. Boles, and Alexander R. Horswill. *Appl Environ Microbiol.* Oct 2007; 73(19): 6036–6044.

L'inhibition croisée des différents AIPs est une piste dans le développement de nouveaux agents anti-staphylococciques. L'objectif serait d'empêcher *S. aureus* de produire son arsenal d'exoprotéines responsable du développement de l'infection.¹²⁰ En 1999, une équipe a testé sur un modèle murin les effets de l'administration d'AIP-II au niveau d'un abcès causé par une souche de *S. aureus* de type agr I. L'administration concomitante d'AIP inhibiteur a provoqué une diminution très importante de la taille des lésions par rapport aux souris sans AIP.¹²⁴ Malgré cette première observation prometteuse, cette approche thérapeutique a subi de nombreux revers. Dans certains cas d'épidémie de SARM, la balance de régulation génique peut pencher en faveur de la production d'adhésines et non de toxines favorisant plutôt la colonisation que les infections aiguës.¹²⁵ D'autre part, il existe des souches de *S. aureus* qui sont *agr* négative. Bien qu'étant moins virulentes, elles conservent leur pouvoir infectieux et ont même montré une production de biofilm augmentée. Il a même été montré que la présence concomitante de *S. epidermidis* augmente l'adhésion de *S. aureus* sur une surface de polystyrène.¹²⁶ L'augmentation de la production de biofilm pourrait aboutir à la persistance chronique de l'infection. Enfin l'inhibition étant spécifique d'une souche de *S. aureus*, l'administration de ces peptides pourrait conduire à la sélection de sous-groupes de bactéries plus résistantes. En considérant ces facteurs, l'utilisation d'analogues synthétiques d'AIPs en thérapeutique doit d'abord passer par l'élaboration de modèle animaux pour évaluer l'augmentation de production de biofilm.¹²⁰

b) Autres systèmes de Quorum Sensing

Il existe au moins trois autres systèmes de régulation des facteurs de virulence chez *S. aureus*. Ils semblent interagir ensemble et former un réseau complexe de transduction des signaux environnementaux.

Le deuxième système de régulation identifié a été dénommé *sae*. Il est constitué de deux protéines SaeR et SaeS. L'étude de mutant *sae* négatif a mis en évidence un rôle important de ce dernier dans la production de nombreuses exoprotéines notamment les hémolysines α et β ainsi que de la coagulase.¹²⁷ Les deux loci ont une action intriquée de manière complexe comme l'a montré l'étude de double mutants *sae* et *agr*.¹²⁸ La transduction du signal se ferait en fonction de la concentration saline, du pH, du taux de glucose et de la présence d'antibiotiques.¹²⁹ Le troisième se dénomme ArlRS, il est aussi composé de deux protéines ArlR et ArlS. Son action semble s'opposer à celle d'*agr* et favoriser l'agglutination des bactéries ainsi que la formation de biofilm selon une voie dépendante de l'ica.¹³⁰ Enfin le dernier système découvert est SrrAB qui s'oppose lui aussi à l'*agr* en inhibant le RNAIII, ce système régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique de la bactérie.¹³¹

c) Les protéines de liaison à l'ADN

Cette famille est représentée par le staphylococcal accessory regulator ou SarA et ses homologues. Cette protéine est nécessaire à la transcription des gènes du système *agr*. Elle affecte la transcription de très nombreux gènes de facteurs de virulence, parfois en contresens du système *agr* en diminuant l'expression de certaines exoprotéines. Son action est aussi sous l'influence de paramètres environnementaux.

C. Epidémiologie des infections à *S. aureus* PVL+

Les caractères génotypiques et phénotypiques des souches de *S. aureus* isolées au laboratoire varient de manière très importante d'un pays à l'autre. La prévalence des gènes codant la leucocidine de Panton-Valentine est très variable selon le pays et la population étudiée. L'analyse épidémiologique des staphylocoques producteurs de leucocidine doit nécessairement prendre en compte l'origine géographique des patients.

1. Données épidémiologiques aux Etats-Unis

Dans la littérature, la leucocidine de Panton-Valentine est rarement recherchée en tant que facteur de virulence indépendant sur les souches américaines. Sa détection a été réalisée afin d'étudier le « background » génétique des isolats de *Staphylococcus aureus*. Les auteurs limitant souvent leur recherche aux seuls SARM d'origine communautaire ou hospitalière. F. Patrick O'Hara et son équipe sont à l'origine d'une étude rétrospective portant sur un échantillon statistiquement représentatif de 1066 souches isolées sur des patients de 2004 à 2008. Ces isolats proviennent de plus de 200 laboratoires différents répartis sur tout le territoire américain.

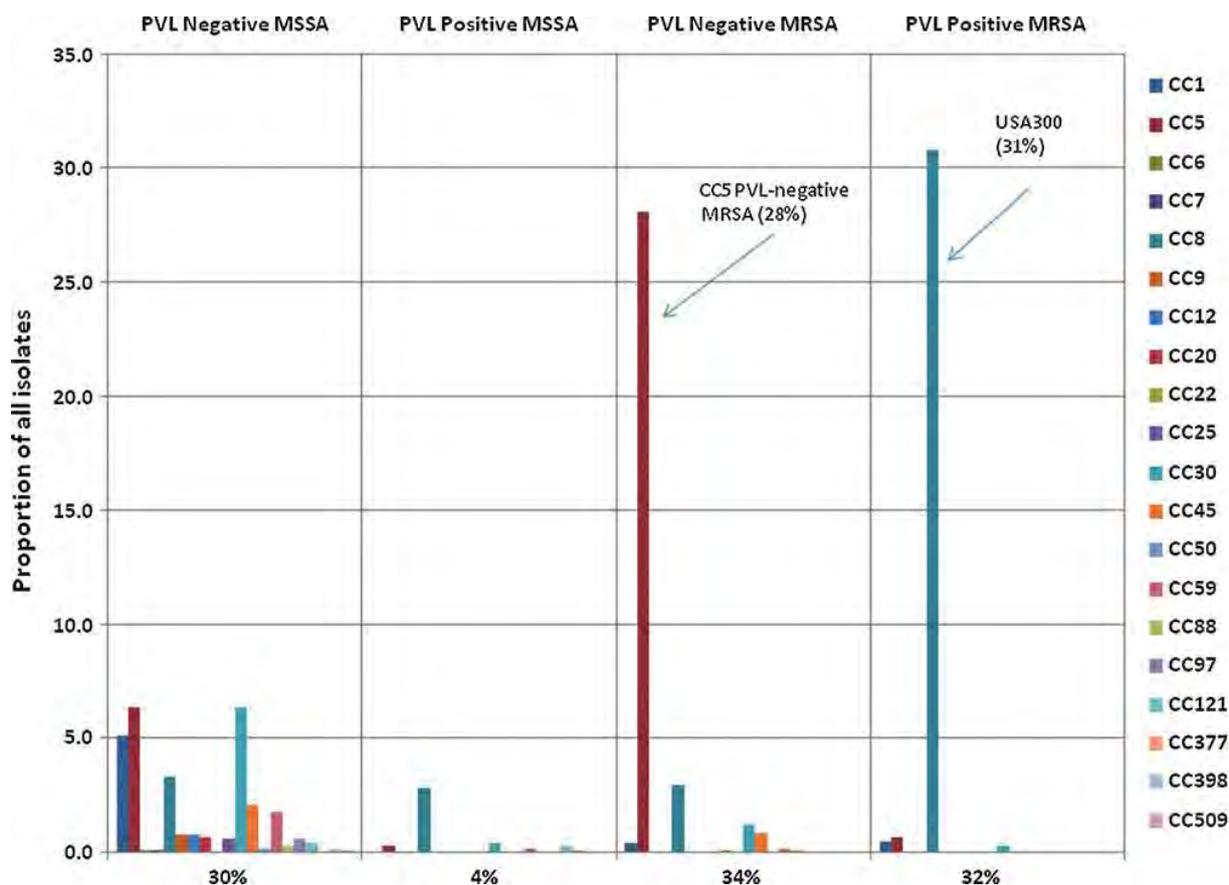


Figure 23 : graphique montrant la répartition des différents complexes clonaux de *S. aureus* aux USA et la prévalence de la leucocidine de Pantone-Valentine au sein de chacun de ces complexes (pourcentages calculés sur la période 2004 à 2008). *Source : F. Patrick O'Hara, Heather Amrine-Madsen, Robertino M. Mera, Megan L. Brown, Nicole M. Close, Jose A. Suaya, and Camilo J. Acosta. Microbial Drug Resistance. December 2012, 18(6): 555-561.*

On constate dans le graphique ci-dessus que le pourcentage de souches PVL+ est très élevé (36%) et concerne surtout des SARM (89% des souches PVL+). Deux complexes clonaux semblent dominer le territoire américain d'un point de vue épidémiologique. Le premier est généralement désigné par son profil en PFGE (Electrophorèse sur Gel en Champs Pulsés) baptisé USA300 ou par l'appartenance au complexe clonal 8 (ST8) déterminé par MLST (Multi Locus Sequence Typing). L'implication de ce clone dans les infections staphylococciques a considérablement augmenté au cours des années 2000 passant de 12% en 2004 à 38% en 2006. Le deuxième appartient au complexe clonal 5, il correspond à un SARM PVL négatif nommé USA100 dont la prévalence est restée stable ces dernières années. Les SASM sont en minorité et présentent une grande diversité génétique.¹³²

Dans une autre étude, prospective, sur une collection de 4131 souches constituée du 1^{er} Juillet au 31 décembre 2011, DJ. Diekema et son équipe retrouvent un pourcentage du profil USA300 de 30,7% et de 8,9% pour USA100. La proportion de SARM était de 2093 souches soit 51% dans cette étude. Cette étude montre aussi que deux complexes clonaux majoritaires sont responsables de la plupart des infections à *S. aureus* aux Etats-Unis.

2. Prévalence estimée de la PVL en France

La leucocidine de Panton-Valentine n'est pas recherchée de manière systématique mais plusieurs études de caractérisation génotypique des staphylocoques dorés ont été menées en France. La recherche des gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* est souvent réalisée à cette occasion et permet donc d'avoir une estimation de la prévalence de ces gènes sur les souches de *S. aureus* isolées au laboratoire.

Les premiers chiffres français ont été apportés par l'étude menée par Gilles Prévost et son équipe en 1995. La phase préliminaire portait sur 309 souches de *S. aureus* isolées consécutivement au CHU de Strasbourg sans distinction sur l'origine de prélèvement. La PVL n'a été retrouvée que pour 5 de ces isolats soit 1,6% du total. La deuxième phase, prospective, a porté sur des souches isolées d'hémocultures, de prélèvement des fosses nasales et d'infections cutanées. Sur les 346 souches testées, 58 étaient positives dont 57 issues des prélèvements cutanés. Cette étude a montré que la toxine de Panton-Valentine était rare chez *S. aureus* et qu'elle se retrouvait surtout dans les infections cutanées.¹³

Tableau IV : résultats de l'étude de Gilles Prévost sur la prévalence des toxines synergohyménotropes au sein de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

	Type de prélèvement	Total souches	Souches PVL+	
Phase I	Hémocultures	20	0	
	Lavages broncho-alvéolaires	15	0	
	Aspirations trachéales	106	2	
	Lésions superficielles	89	3	
	Selles	18	0	
	Cathéters	12	0	
	Urines	40	0	
	Autres	9	0	
	Total	309	5 soit 1,6%	
Phase II	Hémocultures	69	1	
	Fosses nasales	31	0	
	Infections cutanées primaires	Furoncles	43	37
		Abcès	19	7
		Panaris	44	10
		Folliculite	19	1
		Impétigo	23	1
		Ecthyma	16	0
	Infections cutanées secondaires	82	1	
	Total	346	58 soit 16,8%	

Source : Prévost et al. *J Med Microbiol.* 1995 Apr;42(4):237-45.

De 2000 à 2008, des études de prévalence de SARM ayant un profil de résistance antibiotique particulier ont été réalisées en France par l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie et de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Un de leurs objectifs était de suivre l'évolution des caractères génétiques des souches de *S. aureus* en France notamment l'émergence de clones de SARM communautaires PVL+ pouvant infecter des sujets sains sans les facteurs de risque habituels. Trois grandes études ont été menées par cet observatoire, la première de 2000 à 2003 (rétrospective)¹³³, les deux autres en 2004 et en 2008 (prospectives). Ces études montrent qu'il est possible de repérer avec une bonne sensibilité les SARM correspondant au clone européen ST80 en se fiant au profil de résistance antibiotique. Ce profil, dénommé phénotype 1 dans les études, est caractérisé par une résistance à la kanamycine (gène *aph(3')-III*), à l'acide fucidique (gène *far1*) aux tétracyclines (gène *tetK*) et une sensibilité aux fluoroquinolones, à la tobramycine et à la gentamicine.¹³⁴



Figure 24 : profil caractéristique de résistance du clone européen ST80. Capture d'écran du SIL MOLIS au CHU de Toulouse

L'étude de 2008, la plus vaste, a recueilli des informations de 104 laboratoires répartis sur tout le territoire français. Au total 34970 souches de patients infectés par *S. aureus* ont été incluses, 7253 étaient des SARM et 93 souches correspondaient au profil phénotype 1. Au sein de ce groupe, 90 isolats étaient porteurs des gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* (97% du groupe). On considérait le clone ST80 comme l'équivalent européen de l'USA300 qui se propage depuis le début des années 2000 selon un mode épidémique sur l'ensemble du territoire américain. Cette étude montre que la situation en France est très différente, le clone ST80 ne connaît pas le même succès épidémiologique. Ces différences sont d'autant plus inattendues que dans d'autres pays européens et du Maghreb (Grèce, Algérie et Tunisie) le clone ST80 PVL+ représenterait plus de 50% du total des infections staphylococciques.¹³⁴

3. Facteurs de risque associés

Les staphylocoques PVL+ étant principalement d'origine communautaire, la transmission se fait surtout par du contact peau à peau entre les individus. Les facteurs de risque identifiés découlent de ce constat :

- Porte d'entrée sur lésion cutanée
- Manque d'hygiène
- Promiscuité
- Contact avec la peau d'un sujet porteur
- Contact avec une surface contaminée.

Aux Etats-Unis, plusieurs groupes de populations à risque ont été mis en évidence notamment : les équipes sportives, les prisonniers, les agriculteurs et les militaires. Les enfants constituent un groupe à risque, les souches de *S. aureus* communautaires PVL+ pouvant se propager au sein du milieu familial ou scolaire.¹³⁵

Les pneumopathies nécrosantes sont rencontrées chez des sujets jeunes et immunocompétents.⁴ Elles sont précédées d'un syndrome grippal suggérant une association physiopathologique avec les influenza virus.¹⁴ Les infections ostéo-articulaires à SA PVL+ surviennent après diffusion hémotogène et ne semblent pas associées à des facteurs de risque particuliers.

D. Sémiologie clinique des infections à *S. aureus* sécréteurs de PVL

Dans une méta-analyse qui combine les résultats des différentes études portant sur les infections à *S. aureus* PVL+, Laura Shallcross et son équipe ont constaté que ces souches étaient le plus souvent retrouvées dans des infections cutanées et plus rarement dans des infections invasives.¹³⁶ D'après cette étude, la majorité des infections à *Staphylococcus aureus* PVL+ se résoudraient en ambulatoire ou par automédication sans qu'il soit nécessaire d'hospitaliser le malade.

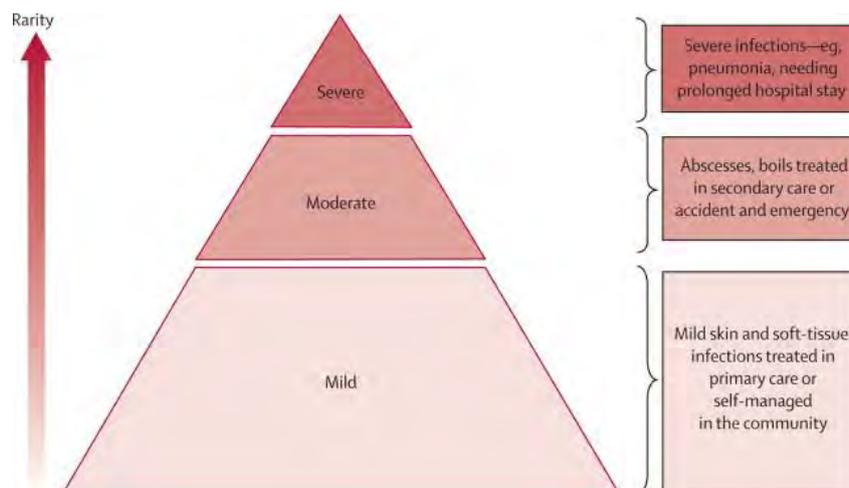


Figure 25 : pyramide clinique des infections associées à la toxine de Panton-Valentine. Source : Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. Lancet Infect Dis. 2013 Jan

L'association épidémiologique entre la présence des gènes codant la toxine de Panton-Valentine et les infections de la peau et des tissus mous (SSTIs) est forte, de nombreuses études viennent appuyer cette constatation. Un modèle physiopathologique de l'action de la PVL dans les SSTIs a récemment été proposé pour étayer ces résultats.⁴⁰

1. Infections cutanées

Au sein du groupe des SSTIs, la PVL est plus fréquemment retrouvées dans les abcès et les furonculoses à fort risque de récurrence.¹³⁷ Cette observation se retrouve dans l'étude de Prevost G. citée précédemment. L'étude la plus contributive sur les infections cutanées à *S. aureus* producteur de PVL a été menée par Pascal Del Giudice et son équipe. L'étude s'est déroulée du 1^{er} juillet 2003 au 30 juin 2010 au CH de Fréjus-Saint-Raphaël, 229 patients porteurs d'une infection cutanée à *S. aureus* ont été inclus sur cette période indépendamment de la présence ou non des gènes encodant la PVL.

Tableau V : résultats de l'étude de Pascal Del Giudice et son équipe sur des patients porteurs d'infections cutanées à *S. aureus*.

Diagnostic clinique	Total	Souches PVL positive (%)
Infections folliculaires	53	39 (74)
Folliculites	17	8 (47)
Furoncles	35	30 (85,5)
Anthrax	1	1 (100)
Infections non-folliculaires	131	16 (12)
Impétigos	35	3 (8,5)
Ecthyma	3	1 (33)
Lymphangites	2	0 (0)
Cellulites	37	7 (19)
Cellulites nécrosantes	5	1 (20)
Abcès secondaires	18	2 (11)
Panaris	9	1 (11)
Pyoderma secondaires	12	1 (8,5)
Syndromes de la peau ébouillantée (SSSS)	5	0 (0)
Fièvres écarlates	3	0 (0)
Rash secondaire au TSS	2	0 (0)
Abcès primaires	45	42 (93,5)
Total	229	97 (42,5)

Source : Pascal Del Giudice et Al. *Dermatology* 2011;222:167–170

On retrouve les mêmes résultats observés lors des études précédentes à savoir une prédominance des infections folliculaires et abcès parmi les sites cutanés. En conclusion, les auteurs font l'hypothèse que ces staphylocoques pénétreraient d'abord la peau au niveau des follicules causant une folliculite puis l'infection évoluerait vers le furoncle. La formation d'un abcès serait l'évolution finale de la nécrose tissulaire autour du follicule.¹³⁸ Les pourcentages de *S. aureus* producteur de PVL dans ces localisations sont très élevés ce qui est à mettre en rapport avec la prévalence globale très faible de la PVL au sein de l'espèce aureus. Ces résultats vont dans le sens d'une physiopathologie particulière associée à la présence de la toxine. Une équipe japonaise a mené en 2004 une étude similaire en s'intéressant à l'aspect clinique des lésions. Il n'y avait pas de différence au niveau de la douleur et de l'œdème pour les souches PVL+ et PVL-, par contre la présence de la toxine était associée à un érythème plus important.¹³⁹ Enfin les infections avec les *S. aureus* d'origine communautaire sont plus sévères et nécessitent plus fréquemment le recours à un drainage chirurgical.¹⁴⁰

2. Pneumopathie nécrosante

S. aureus est responsable d'environ 2% des pneumopathies d'origine communautaire.¹⁴¹ Le rôle de la leucocidine de Panton-Valentine dans ce type d'infection a été mis formellement en évidence en 2002 par l'équipe d'Yves Gillet au CNR de Lyon. Leur étude comptait 16 cas de pneumopathie à *S. aureus* PVL+ (8 prospectifs, 8 rétrospectifs) et 36 à PVL-. Cette étude a montré que les souches de *S. aureus* productrices de PVL seraient responsables de pneumopathies chez les enfants et adultes jeunes sans comorbidités par ailleurs. Ces infections diffèrent des pneumopathies à *S. aureus* PVL- par un pronostic moins bon, une hémoptysie fréquente, une leucopénie à l'admission et seraient précédées par une infection à Influenza virus.¹⁴

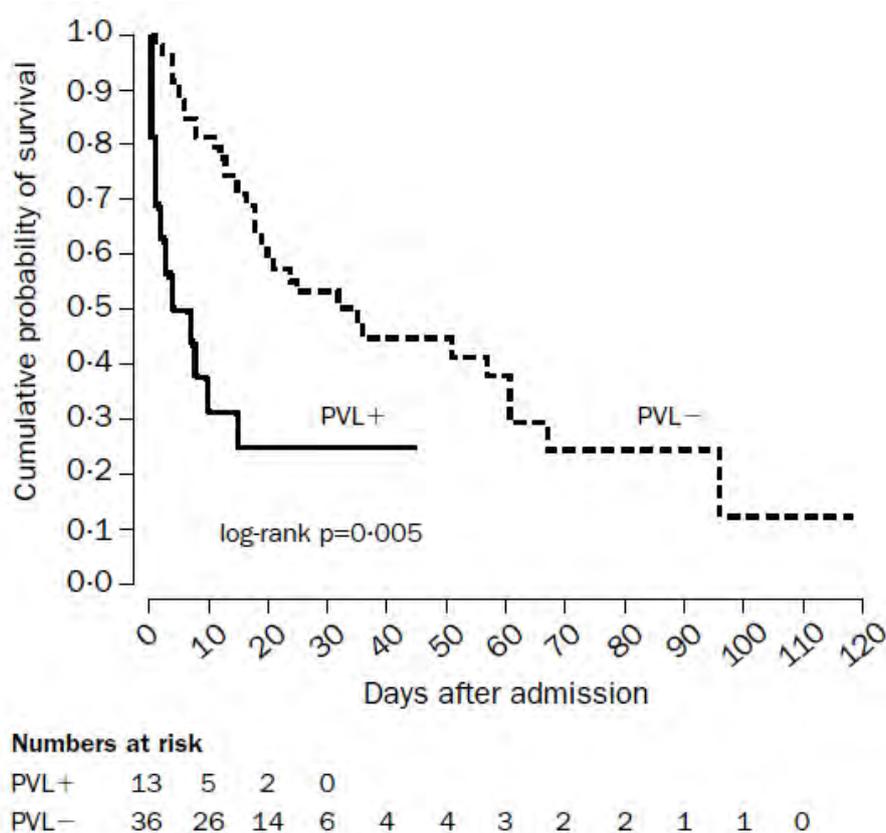


Figure 26 : courbes de survie des patients en fonction du génotype des souches isolées du tractus respiratoire. Source : Yves Gillet et al. *THE LANCET* • Vol 359 • March 2, 2002

En 2007, Maria Labandeira-Rey et son équipe ont apporté la démonstration sur un modèle murin qui faisait défaut à l'étude épidémiologique de Gillet. Après inoculation d'une souche PVL- et de son équivalent PVL+ obtenu après lysogénie par le phage SLT, des coupes de tissu pulmonaire ont été observées 24h après l'injection. Il ressort de cette étude que les lésions observées sont plus sévères avec la souche PVL+ et que la mortalité à 24h est élevée. De plus l'administration des fractions LukS-PV et LukF-PV en quantité équimolaires crée des lésions concentration-dépendantes et la mort au-delà de 3 µg. Cette étude apporte des preuves significatives de l'implication de la leucocidine de Panton-Valentine dans la pneumopathie nécrosante.¹⁴²

Il y a peu de données sur la prévalence de cette entité clinique en France, elle semble cependant très rare, les cas reportés au CHU de Toulouse étant peu nombreux.

3. Infections ostéo-articulaires

L'accès au tissu osseux par *S. aureus* se fait généralement suite à une diffusion hématogène ou après un geste chirurgical invasif. Les études portant sur l'implication de la PVL dans cette localisation sont rares. En France, une seule a été construite dans ce but. Cette étude rétrospective a été menée de 2001 à 2005 sur une collection de souches du CNR de Lyon provenant de différents services de pédiatrie. Au final 14 souches PVL+ ont été incluses, 17 PVL- ont servi à former un groupe de contrôle. Cette étude a montré que les infections ostéo-articulaires à *S. aureus* PVL+ sont sévères avec une persistance de l'inflammation (CRP et VS) et des complications plus fréquentes. Le recours à la chirurgie était aussi plus fréquent.¹⁴³ Une méta-analyse de 2012 des différentes études effectuées dans le monde aboutit à des conclusions similaires ajoutant le fait que les SARM communautaires sont de plus en plus souvent isolés dans ces localisations.¹⁴⁴

E. Détection biologique de la PVL

Au laboratoire, la recherche de la leucocidine de Pantone-Valentine se fait principalement dans trois contextes : clinique évocatrice, antibiogramme témoin d'une souche de SARM communautaire particulière (ST80 majoritairement) et étude clinique sur *S. aureus*.

La technique la plus couramment utilisée consiste à rechercher les gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* par PCR en utilisant un couple d'amorce spécifique. Cette recherche peut être soit isolée (PCR simple) ou combinée avec la recherche d'autres gènes d'intérêt (PCR multiplex). Le délai de rendu final de résultat est long si l'on prend en compte le temps nécessaire pour isoler la bactérie et réaliser la PCR (minimum 72 heures). Ces techniques sont très sensibles et très spécifiques cependant elles ne montrent pas que la bactérie est bien capable de produire et de sécréter la toxine aux doses toxiques In Vivo. Les tests de détection phénotypiques type ELISA ou ICT ne sont pas utilisés en routine mais plusieurs auteurs ont mis au point et évalué des tests « maison » qu'ils ont confrontés aux résultats de la PCR.

L'équipe de Cédric Badiou a publié en 2010 les résultats d'une étude sur une série de 72 prélèvements cliniques où un *S. aureus* PVL+ a été retrouvé. Le dosage de la PVL a été réalisé sur les souches porteuses des gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* In Vitro sur des surnageants de culture et directement sur les prélèvements cliniques. La PVL a été détectée sur tous les surnageants de culture avec des résultats extrêmement variables d'une souche à l'autre (0,09 à 14,58 µg/ml, médiane à 1,69 µg/mL). Sur les échantillons cliniques le dosage de la PVL a été positif pour 65 prélèvements (0 à 399 µg/mL, médiane de 0,42 µg/mL) soit 90% des prélèvements.¹⁴⁵ Ces concentrations retrouvées sur les prélèvements sont au-dessus des seuils de toxicité. Sur la base d'essais In Vitro il a été démontré qu'une concentration de 0,1 µg/mL était suffisante pour lyser 90% des polynucléaires incubés.¹⁴⁶ Un test immunochromatographique mis au point par le département R&D de Biomérieux a été testé en parallèle.

Ce test a présenté une sensibilité de 79% sur les prélèvements contre 90% pour l'ELISA (100% de spécificité pour les deux) et constitue donc un moyen intéressant de rechercher rapidement la PVL.¹⁴⁵

Ces études montrent que la présence des gènes encodant pour la PVL est associée à sa production effective In Vitro et très probablement In Vivo. La biologie moléculaire est donc un outil suffisant pour la caractérisation des souches de *S. aureus* productrices de leucocidine de Panton-Valentine.

F. Stratégies thérapeutiques des infections à *S. aureus* PVL+

1. Infections cutanées

Le Haut Conseil de la Santé Publique a publié en 2009 des recommandations concernant le traitement des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*. La prise en charge des infections cutanées est, autant que possible, chirurgicale. La chirurgie doit être pratiquée en urgence, elle permet d'éliminer le foyer collecté qui est souvent très difficile d'accès aux antibiotiques. C'est la meilleure option thérapeutique contre ce type d'infection. L'antibiothérapie curative n'a pas démontrée son efficacité. Son indication est restreinte et toujours complémentaire de la chirurgie :

- présence de signes généraux,
- signes locaux sévères (notamment, taille > 5 cm),
- immunodépression,
- âges extrêmes,
- localisation critique de l'abcès,
- échec du drainage,
- en cas de dermo-hypodermite associée à l'abcès.

L'antibiothérapie initiale est probabiliste, le choix des molécules est guidé par les données épidémiologiques françaises sur les infections de la peau et des tissus mous. Les molécules choisies doivent être efficaces sur *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* qui sont les germes les plus fréquemment rencontrés. Les SARM communautaire étant rares en France, il n'y a pas lieu de traiter initialement les infections staphylococciques avec des antibiotiques actifs sur les SARM.

Les molécules choisies initialement sont actives sur les staphylocoques et streptocoques. Classiquement ce sont des bêta-lactamines associées ou non à un inhibiteur de bêta-lactamase pendant 5 à 10 jours. En cas de résistance à la méticilline plusieurs molécules sont recommandées, aucune n'ayant prouvé sa supériorité sur les autres : pristinamycine, clindamycine, triméthoprime-sulfaméthoxazole ou doxycycline. Les fluoroquinolones ne sont pas recommandées en raison de l'émergence rapide de résistance à ces antibiotiques chez *S. aureus*.¹⁴⁷ Sur les infections documentées à *S. aureus* PVL+ on peut ajouter en association un antibiotique à visée anti-toxinique. L'effet inhibiteur sur la production de la toxine a été démontré In Vitro avec la clindamycine, la rifampicine et le linézolide.¹⁴⁸

La décontamination des sites de portage est indiquée pour les patients infectés par des SARM d'origine communautaire ayant eu un premier échec de la chirurgie et/ou antibiothérapie, en cas de rechute ou de récurrence. Elle concerne le patient mais aussi son entourage. Pour les cas dans les collectivités il faut décontaminer l'ensemble des sujets contacts. Le dépistage des épidémies de ces SARM passe par la déclaration des cas groupés qui se définissent comme la survenue d'au moins 3 cas en 1 mois d'infection suppurative au sein d'une collectivité.¹⁴⁷

Extrait des recommandations HCSP :

Le protocole de décontamination comprendra en première intention une association :

- Application nasale de pommade à la mupirocine (Bactroban®) 2 fois par jour pendant 5 à 7 jours,
- Utilisation, 1 fois par jour pendant 5 à 7 jours, d'une solution moussante de chlorhexidine comme savon et comme shampoing,
- Bains de bouche biquotidiens avec une solution de chlorhexidine (sauf chez l'enfant de moins de 6 ans)

2. Infections pulmonaires

L'AFSSAPS (aujourd'hui ANSM) a publié en juillet 2010 un rapport sur la prise en charge des infections respiratoires basses en concertation avec la SPLF (Société de Pneumologie de Langue Française).

L'éventualité d'une pneumopathie nécrosante est documentée et une antibiothérapie probabiliste a été formulée dans ce contexte particulier.

Tableau 7a : Antibiothérapie probabiliste des pneumonies de réanimation, contexte grippal

	<u>Premier choix</u>	<u>Second choix</u>
Cas général	C3G* (céfotaxime) ± macrolide IV ou FQAP (lévofloxacine) ¹	
Pneumonie gravissime Pneumonie nécrosante, Forte présomption de SARM PVL+	C3G* (céfotaxime) + glycopeptide et clindamycine ou rifampicine <u>ou</u> C3G* (céfotaxime) + linézolide	Désescalade selon documentation, lorsque disponible (cf Tableau 7b)

C3G (céphalosporines de 3^{ème} génération) : la ceftriaxone n'est pas recommandée en raison d'une activité intrinsèque insuffisante sur *Staphylococcus*
SARM PVL+ : *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline sécréteur de la toxine de Panton Valentine

Figure 27 : recommandations ANSM juillet 2010. *Source : ANSM. <http://ansm.sante.fr>*

L'antibiothérapie est l'élément principal dans la prise en charge de cette infection contrairement aux infections cutanées. Les recommandations prévoient la possibilité d'ajouter un antibiotique à visée anti-toxinique pour inhiber la production de toxine In Vivo.

II. ETUDE

A. Objectifs de l'étude

La prévalence des souches productrices de leucocidine de Panton-Valentine est faible en France, elle est estimée à moins de 5% de l'ensemble des souches de *Staphylococcus aureus* impliquées en pathologie humaine.¹⁴⁹ La situation française est très différente de certains pays notamment aux Etats-Unis où des souches communautaires de *S. aureus* comme le clone USA300 – très souvent producteur de leucocidine de Panton-Valentine - sont très répandues parmi la population. Des caractères génétiques particuliers de ces clones ainsi que des facteurs associés à l'hôte expliquent leur diffusion très importante voire épidémique dans certaines populations.

L'objet de cette étude est une collection de 95 isolats de *S. aureus* PVL+ issus de site infectieux très divers constituée au cours de la période 2009-2014 au CHU de Toulouse. Nous avons recherché certaines caractéristiques génétiques et phénotypiques de ces souches dans une démarche épidémiologique de caractérisation des souches. Puis ces résultats ont été confrontés à la clinique par l'étude rétrospective des dossiers patients de pédiatrie. Nous avons réalisé en collaboration avec les praticiens hospitaliers de la réanimation infantile une analyse clinico-biologique des infections à *S. aureus* producteurs de leucocidine de Panton-Valentine à l'hôpital des enfants de Toulouse.

Les objectifs que nous nous sommes fixés peuvent être résumés ainsi :

- 1) Etude épidémiologique notamment sur la présence de « clones » PVL+ présentant un antibiotype particulier,
- 2) Recherche de caractéristiques génétiques particulières d'intérêt médical sur les souches de *S. aureus* PVL+ impliquées dans la virulence ou la dissémination de la bactérie,
- 3) Evaluation et mise en place de méthodes pour rechercher la production de biofilm chez *S. aureus* au laboratoire en recherche,
- 4) Observation de l'impact des différents facteurs de pathogénicité étudiés dans ce travail sur l'évolution de la maladie chez les patients de pédiatrie,
- 5) Etudier les facteurs dépendants de l'hôte : sélection des critères cliniques pertinents et recueil au sein d'un tableau synthétique.

B. Matériel et méthode

1. Population clinique étudiée

a) Critères d'inclusion

Nous avons mené une étude rétrospective sur une cohorte de 37 patients admis à l'hôpital des enfants à Toulouse au cours de la période 2009-2014.

Les dossiers ont été retenus si les patients étaient âgés de moins de 16 ans au moment de l'épisode infectieux et si les informations contenues dans les dossiers étaient suffisantes. En cas d'épisodes multiples pour un même patient, un seul a été retenu.

b) Recueil des données patients

Les données relatives aux patients ont été incluses dans un tableau de synthèse Excel. Ces informations ont été classées en quatre catégories :

1. Données démographiques : âge, sexe, service d'hospitalisation, date d'entrée, date de sortie
2. Histoire de la maladie : antécédents, allergies, traitement habituel, statut vaccinal, site infectieux, date de début d'apparition des signes, notion de voyage, porte d'entrée, prise en charge avant l'admission au CHU, prise en charge au CHU, évolution, complications éventuelles, mesures prophylactiques éventuelles,
3. Examen clinique à l'admission : cardiovasculaire, respiratoire, ORL, neurologique, digestif, hémato-ganglionnaire, urogénital, rhumatologique, dermatologique détaillé,
4. Examens paracliniques : biologie, imagerie, anatomopathologie.

c) Méthodologie statistique

Pour les variables qualitatives (catégories), les comparaisons ont été effectuées avec un test de khi-deux quand les effectifs étaient suffisants. Dans le cas contraire, le test exact de Fisher a été employé. Les variables continues ont été analysées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. La répartition des sexes au sein de la cohorte a été analysée avec un test binomial exact. Le seuil décisionnel de rejet ou non de l'hypothèse nulle a été fixé à $p \leq 0,05$.

2. Souches et caractères étudiés

a) Critères d'inclusion des souches

La collection d'isolats de *S. aureus* étudiée a été constituée sur la période 2009 à 2014 par le laboratoire de bactériologie-hygiène du CHU de Toulouse. Le critère de sélection a été la mise en évidence des gènes encodant la leucocidine de Panton-Valentine. Les souches proviennent de prélèvements variés et ont été conservées dans un bouillon BHI glycosylé congelées à -80°C. Les souches ont été mises en culture sur des géloses COS incubées à l'étuve à 37°C.

Au total, 95 souches issues de prélèvement de 92 patients ont été incluses.

b) Techniques d'identification et antibiogramme

L'identification et l'antibiogramme ont été réalisés en routine au laboratoire sur l'automate Vitek® 2 de Biomérieux. Les identifications ont été réalisées à partir des cartes VITEK® 2 GP 21342 qui utilisent 43 tests différents. Ces tests reposent principalement sur la capacité des bactéries à assimiler certains dérivés osidiques, hydrolyser des substrats, résister à des antibiotiques et pousser dans des conditions particulières (pousse dans le NaCl 6,5% par exemple).¹⁵⁰ L'identification de *S. aureus* est fiable et robuste, elle ne pose pas de problèmes particuliers en routine. De plus, le passage en spectrométrie de masse (cf. paragraphe correspondant) a permis de confirmer cette identification.

L'antibiogramme a été réalisé avec les cartes AST qui permettent de tester en milieu liquide simultanément toute une batterie d'antibiotique. Cette technique permet la détermination de CMI en milieu liquide. Les seuils de résistances sont rentrés dans une base de données remise à jour régulièrement selon les recommandations des sociétés savantes notamment le CASFM. La résistance à la méticilline peut parfois être délicate quand la CMI à l'oxacilline est proche du seuil. Pour pallier à ce problème, on réalise systématiquement en parallèle la mesure du diamètre d'inhibition de la céfoxitine et du moxalactam qui confirment ou non la présence de la PLP2a. Dans de rares cas (hémocultures principalement), l'antibiogramme a été réalisé par une méthode de diffusion sur gélose avec des disques d'antibiotique. La sensibilité a été jugée par la mesure du diamètre d'inhibition directement sur la boîte. Ces résultats sont réinterprétés par le biologiste du service qui peut décider en fonction des recommandations et des mécanismes de résistance impliqués de modifier l'interprétation d'une CMI ou d'un diamètre.

L'étude des profils de résistance a été réalisée à partir des données extraites du SIL du laboratoire. Les souches isolées à plusieurs reprises n'ont été comptabilisées qu'une seule fois. Les doublons ont été écartés en deux étapes. En premier lieu, une extraction des souches avec antibiogramme uniquement a été faite sur Excel, celui-ci n'étant réalisé qu'une seule fois par type de prélèvement sur une période donnée pour un type de prélèvement donné. Ensuite un deuxième tri pour écarter les doublons a été effectué selon ces critères : même nom/prénom, même date de naissance, délai de 30 jours entre deux isolements sauf si différence significative à l'antibiogramme (modification de l'interprétation sur une classe d'antibiotique).

c) *Technique de recherche de la PVL utilisée*

La recherche de la leucocidine de Panton-Valentine se fait par biologie moléculaire, on cherche les gènes encodant la toxine. Depuis 2008, le laboratoire utilise le kit GenoType® MRSA développé par Hain Lifescience. Ce test permet d'identifier *S. aureus* et *S. epidermidis*, de rechercher le gène *mecA* ainsi que les gènes *lukS-PV* et *lukF-PV* qui codent la PVL.

Le test se divise en trois étapes :

- Extraction de l'ADN bactérien,
- Amplification des gènes d'intérêt à l'aide d'amorces spécifiques biotinylées (multiplex),
- Révélation chromogénique des amplicons par hybridation avec des sondes fixées sur une bandelette.

Le temps de réalisation de la technique n'excède pas trois heures. Deux bandes de contrôle permettent de vérifier les étapes d'amplification et d'hybridation.

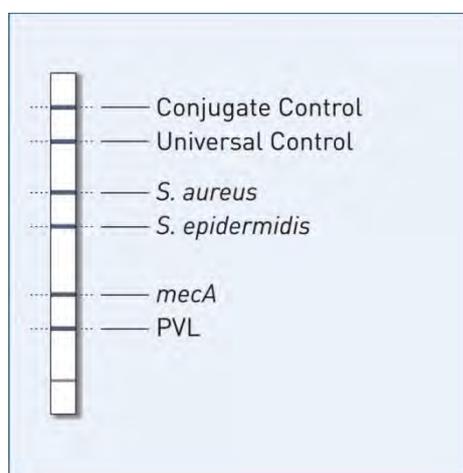


Figure 28 : schématisation de la bandelette du kit GenoType® MRSA de Hain Lifescience. *Source :* <http://www.hain-lifescience.de>

Protocole : spécifique au laboratoire, mis au point sur site.

Extraction ADN : faire une suspension bactérienne dans 500 µL d'eau distillée à partir d'une colonie isolée. Vortexer. Récupérer 20 µL de la suspension et ajouter 1 µL de mutanolysine (muramidase qui détruit la paroi bactérienne). Mettre à 56°C pendant 15 min puis à 95°C pendant 2 min.

Réalisation de la PCR :

1) Préparation du mix :

Réactif	Volume (1 souche)
PNM (Primer/Nucleotide Mix)	35 µL
Tampon	5 µL
MgCl ₂	3 µL
Taq polymérase	0,25 µL
Eau distillée	1,75 µL
Volume final	45 µL

2) Préparation du mélange réactionnel :

Préparer un tube de PCR Eppendorf (polypropylène) pour chaque souche. Ajouter dans chaque tube 45 µL de mix et 15 µL d'extrait d'ADN.

3) Conditions :

5 min à 95°C ; 22 cycles de PCR : 20 sec à 95°C, 30 sec à 60°C, et 1 min à 72°C ; 10 min 72°C ; température finale à 4°C.

Hybridation :

- Placer les bandelettes dans les puits,
- Dénaturation de l'ADN amplifié ; mélanger de 20 µL de solution chimique dénaturante (DEN) et de 20µL d'amplicon à l'extrémité du puits. Attendre 5 min.
- Ajouter 1 mL de tampon HYB et incuber 30 min à 45°C (hybridation de l'ADN simple brin avec les sondes)
- Lavage stringent des bandelettes : aspirer le contenu du puits, rajouter 1 mL de STR (solution de lavage stringent contenant un ammonium quaternaire). Attendre 15 min. Aspirer le contenu, laver avec 1 mL de RIN (milieu tamponné NaCl), vider et éponger les puits,
- Ajouter 1 mL de conjugué streptavidine/PAL dilué au 1/100^e dans chaque puits, incuber 30 min puis vider et rincer avec 1 mL de RIN comme précédemment,
- Renouveler l'opération,
- Laver avec 1 mL d'eau distillée puis vider,
- Révéler en ajoutant 1 mL de substrat dilué au 1/100^e, attendre 20 min puis arrêter la réaction en vidant et en ajoutant 1 mL d'eau distillée,
- Sécher les bandelettes et lire le résultat.

La lecture est simplifiée par l'utilisation d'un cadre de lecture définissant les zones où les bandes sont attendues et leur signification. Les bandelettes peuvent être conservées pour la traçabilité des résultats.

3. Gènes recherchés et techniques utilisées

Staphylococcus aureus sécrète un très grand nombre de facteurs de virulence comme vu précédemment. La plupart de ces facteurs sont encodés au niveau chromosomique et sont retrouvés dans pratiquement toutes les souches, leur recherche n'est donc pas justifiée. De plus, certains caractères n'ont pas ou peu d'impact en pathologie humaine et ne sont pas non plus des marqueurs épidémiologiques d'intérêt.

a) *Etapas communes à toutes les PCR*

Extraction de l'ADN bactérien :

Toutes les PCR ont été réalisées à partir des mêmes extraits d'ADN. La seule exception étant celle de recherche de la PVL qui s'inscrit dans le cadre d'un kit commercial défini utilisé en routine. L'extraction se fait à l'aide du tampon de lyse Qlyse[®] provenant du coffret Genoquick[®] Bordetella de Hain Lifescience.

Protocole : Mettre en suspension une colonie isolée sur COS dans 200 µL de tampon de lyse Qlyse[®] sur tube Eppendorf. L'extraction est faite par chauffage à 100°C pendant 10 min dans un bloc chauffant puis centrifugation à 14000 tours/min pendant 10 minutes. Les extraits sont conservés à -80°C s'ils ne sont pas étudiés immédiatement.

Dépôt et migration sur gel des produits d'amplification :

Réalisé sur gel d'agarose 1,5% : 0,45g d'agarose + 30 mL de TBE (Euromedex). L'ADN amplifié est mélangé avec un tampon de charge constitué de Bleu de bromophénol et glycérol (Thermo Scientific). On dépose ensuite 8 µL dans chaque puits. Le marqueur de taille (Thermo Scientific) est ajouté dans le premier puits du gel. La migration se fait dans une cuve d'électrophorèse à 100V.

Révélation et lecture du gel :

Le gel est plongé dans une solution de GelRed[®] (Biotium), la lecture se fait sous lampe à UV à 260 nm. Une photographie du gel est prise pour conserver les résultats et les relire ultérieurement.

b) Recherche de clones de SARM communautaires

Plusieurs auteurs se sont posé la question de l'émergence de clones particulièrement virulents en France comme cela s'est produit aux Etats-Unis avec le clone USA300. Ces staphylocoques étant d'origine communautaire et très fréquemment PVL+, il était intéressant de chercher la présence de ces clones au sein de notre collection. Ces souches possèdent un élément génétique mobile particulier appelé ACME pour Arginine Catabolic Mobile Element comportant de nombreux gènes. Le gène *arcA* a servi de marqueur moléculaire pour détecter la présence de cet élément génétique mobile. On le retrouve aussi sur le chromosome de *Staphylococcus aureus*, c'est un gène de ménage cependant la séquence d'*arcA* sur l'ACME diffère suffisamment de sa version chromosomique pour qu'il soit possible de le détecter par PCR. Ce gène est retrouvé sur les souches de type ST8-SSCmecIV (USA300), les SARM ST5-SSCmecII (USA100) et ST8 SASM.¹⁵¹

Protocole : réalisé d'après les données fournies par Campbell et al¹⁵²

Amorces utilisées :

Sens	5'-CACGTAACCTTGCTAGAACGAG-3'	}	Fragment de 724 pb
Antisens	5'-GAGCCAGAAGTACGCGAG-3'		

Mix :

Réactif	Volume (1 souche)
Eau distillée	9,34 µL
Tampon 10x (Biocentric)	1,5 µL
dNTP 2 µmol/mL (Eurobio)	1,5 µL
Amorce sens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Amorce antisens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Taq polymerase à 5 U/µL (Biocentric)	0,06 µL
ADN bactérien	2 µL
Volume final	15 µL

Conditions de PCR :

5 min à 95°C ; 35 cycles de PCR : 1 min à 95°C, 1 min à 60°C, et 1 min à 72°C ; 10 min 72°C ; température finale à 4°C.

c) Recherche et caractérisation du sérotype capsulaire

La PCR a été réalisée en duplex avec un couple d'amorces permettant de détecter les gènes qui codent pour les enzymes nécessaires à la synthèse des polysaccharides de capsule type 8 et un autre couple pour le type 5 qui sont les sérotypes majoritaires. Les autres sérotypes n'ont pas été recherchés, par conséquent un résultat négatif se traduit soit par une capsule d'un autre sérotype soit l'absence de capsule (rare).

Protocole : réalisé d'après les données fournies par Sau S., Sun J., Lee C.Y.⁸¹

Amorces utilisées :

Sérotype 5 :

Sens 5'- GGTTTGCTGAAAAACCAGTC-3' }
Antisens 5'- CCTCATATGCTCCTACATTT-3' } Fragment de 453 pb

Sérotype 8 :

Sens 5'- GGGCTACAAACATTAAGCAT-3' }
Antisens 5'- ACTTCCCCATACTATGAC-3' } Fragment de 280 pb

Mix :

Réactif	Volume (1 souche)
Eau distillée	8,74 µL
Tampon 10x (Biocentric)	1,5 µL
dNTP 2 µmol/mL (Eurobio)	1,5 µL
Cap5 Amorces sens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Cap5 Amorces antisens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Cap8 Amorces sens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Cap8 Amorces antisens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Taq polymérase à 5 U/µL (Biocentric)	0,06 µL
ADN bactérien	2 µL
Volume final	15 µL

Conditions de PCR :

5 min à 95°C ; 35 cycles de PCR : 1 min à 95°C, 1 min à 50°C, et 1 min à 72°C ; 10 min 72°C ; température finale à 4°C.

d) Recherche du gène *sasX*

Le gène *sasX* et son rôle dans l'épidémie de SARM communautaire qui sévit actuellement en Chine a été publié en 2010 par Li et al. Pour le rechercher, les mêmes amorces ont été utilisées.

Protocole : réalisé d'après les données fournies par Li et al.¹¹⁵

Amorces utilisées :

Sens 5'- AGAATTAGAAGTACGTCTAAATGC-3'
Antisens 5'- GTCGATTATGTAAATGACTCAAATG-3' Fragment de 522 pb

Mix :

Réactif	Volume (1 souche)
Eau distillée	9,34 µL
Tampon 10x (Biocentric)	1,5 µL
dNTP 2 µmol/mL (Eurobio)	1,5 µL
Amorce sens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Amorce antisens à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Taq polymerase à 5 U/µL (Biocentric)	0,06 µL
ADN bactérien	2 µL
Volume final	15 µL

Conditions de PCR :

5 min à 95°C ; 35 cycles de PCR : 1 min à 95°C, 1 min à 48°C, et 1 min à 72°C ; 10 min 72°C ; température finale à 4°C.

e) Recherche de résistance aux antiseptiques

Plusieurs classes d'antiseptiques sont utilisées actuellement au CHU de Toulouse notamment les ammoniums quaternaires pour la désinfection des surfaces (Surfanios®). Ces composés sont aussi largement prescrits en ambulatoire pour la désinfection des lésions cutanées, on peut citer par exemple la chlorhexidine qui est très utilisée. La présence des gènes *qacA/B* et *qacC* est associée à une augmentation des concentrations minimales inhibitrices pour ces composés. Les PCR ont été réalisées en simplex, une pour *qacA/B* et une pour *qacC*.

Protocole : réalisé d'après les données fournies par Sheng et al.¹⁵³

Amorces utilisées :

qacA/B Sens 5'-GCAGAAAGTGCAGAGTTCG-3'
 Antisens 5'-CCAGTCCAATCATGCCTG-3' } Fragment de 361 pb

qacC Sens 5'-GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA-3'
 Antisens 5'-GACTACGGTTGTTAAGACTAACCT-3' } Fragment de 195 pb

Mix :

Réactif	Volume (1 souche)
Eau distillée	9,34 µL
Tampon 10x (Biocentric)	1,5 µL
dNTP 2 µmol/mL (Eurobio)	1,5 µL
Amorce sens <i>qacA/B</i> OU sens <i>qacC</i> à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Amorce antisens <i>qacA/B</i> OU antisens <i>qacC</i> à 20 µmol/mL (Eurofins)	0,3 µL
Taq polymérase à 5 U/µL (Biocentric)	0,06 µL
ADN bactérien	2 µL
Volume final	15 µL

Conditions de PCR :

5 min à 95°C ; 30 cycles de PCR : 20s à 95°C, 20s à 55°C, et 20s à 72°C ; 4 min 72°C ; température finale à 16°C.

4. Recherche de résistance à la mupirocine

La mupirocine est l'antibiotique le plus largement prescrit dans le cadre de la décontamination des sites de portage du patient et de son entourage. Ce principe actif est formulé sous forme de crème en application locale. Elle n'est pas testée en routine au laboratoire mais le prescripteur peut y avoir recours à la suite d'une infection à *S. aureus* pour prévenir les récurrences. La résistance à la mupirocine des souches PVL+ a été testée sur les 96 souches de notre collection.

Protocole : ce test a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (milieu Mueller-Hinton). La méthode utilisée est celle préconisée par le CASFM.

- Préparation d'une suspension à 0,5 McFarland
- Dilution au 1/10^e pour obtenir une concentration finale d'environ 10⁷ UFC/mL,
- Ensemencement par écouvillonnage du milieu Mueller-Hinton,
- Placement du disque mupirocine au centre de la boîte.
- Incubation à 37°C, lecture de la pousse à 24h

Disques utilisés : Oxoid CT0522B MUP5 MUPIROCIN lot n° 1299925. Charge du disque : 5,82 µg.
Diamètre critique (selon recommandations CASFM 2013) : ≥19 mm.

5. Evaluation de la production de biofilm bactérien

Le biofilm joue un rôle essentiel dans la chronicité des infections notamment en présence de matériel médical. Les infections à *S. aureus* PVL+ étant associées à un fort taux de rechute et de récurrence, on peut s'attendre à une capacité de production importante de certaines souches notamment celles impliquées dans les infections ostéo-articulaires.

Il existe plusieurs méthodes pour mettre en évidence la production de biofilm, on peut citer notamment :

- Culture sur plaque avec coloration au cristal violet (TCP : Tissue Culture Plate), méthode considérée comme étant la technique de référence,
- Méthode en tube qui utilise un milieu trypticase-soja au lieu des plaques,
- Méthode au Rouge Congo Agar
- Observation en microscopie électronique
- BioFilm Ring Test®, méthode récente qui a l'avantage d'être automatisable.

Nous avons retenu la méthode de coloration au cristal violet, celle-ci étant encore considérée comme la référence¹⁵⁴ malgré son temps de mise en œuvre important et des résultats parfois variables (problème de reproductibilité). Le protocole utilisé a été extrait et adapté à partir de la publication de 2007 de Patrick Chavant et al.¹⁵⁵

Principe :

Le cristal violet ou méthyl violet 10B est un colorant cationique qui se fixe sur les polysaccharides du peptidoglycane et de la matrice extracellulaire qui compose le biofilm bactérien. La bactérie va se multiplier, adhérer sur une surface de polystyrène (plaque 96 puits) et produire un biofilm bactérien. Le cristal violet colore les structures polysaccharidiques des bactéries incluses dans le biofilm et des bactéries sous forme planctonique. Un lavage à l'eau distillée permet d'éliminer le surplus de colorant et les bactéries planctoniques. L'ajout d'acide acétique dissout les composés organiques et remet tout le colorant retenu en solution. L'intensité de la coloration du puits est proportionnelle à la quantité de biofilm produite. Une mesure de la densité optique corrigée par rapport à un blanc permet d'avoir une approche quantitative sur la capacité d'une bactérie à produire du biofilm.

Protocole :

Pré-culture :

- Mise en culture des bactéries dans du bouillon BHI (1 mL dans un tube à hémolyse) à partir de colonies isolées sur gélose COS (incubée à 37°C). La suspension est ajustée à 0.5 McF (10^8 UFC/mL), puis diluée au dixième dans du BHI stérile pour obtenir une suspension bactérienne initiale contenant environ 10^7 UFC/mL,
- Incuber les bouillons pendant 24h à 37°C sous agitation orbitale à 150 tours/min (bain marie agité) afin d'obtenir une culture bactérienne en phase stationnaire,
- Faire deux puits avec 200 µL de bouillon BHI stérile qui servira de témoin négatif,
- Ensemencer les puits avec 200 µL des suspensions préalablement préparées avec du bouillon BHI et calibrées à 10^7 UFC/mL,
- Chaque isolat est déposé en triplicat,
- La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 4h (*S. aureus*).

Etude de la formation de biofilm par la méthode in vitro de coloration au cristal violet (CV)

La méthode de coloration au CV est basée sur une mesure colorimétrique du cristal violet incorporé à la fois par les cellules attachées sur les puits et par la matrice organique formant le biofilm.

- a) Rincer les puits 3 fois avec 200 µL d'eau distillée stérile pour éliminer les cellules non adhérentes (bactéries planctoniques),
- b) Laisser sécher pendant 45 min sous la hotte,
- c) Introduire 100 µL de cristal violet (CV) et attendre 45 min pour la coloration,
- d) Éliminer l'excès de cristal violet par 5 lavages successifs des puits avec 300 µL d'eau distillée stérile (à l'aide de la micropipette multicanaux),
- e) Le colorant incorporé par les cellules ayant adhéré ou ayant formé un biofilm et par la matrice organique a été solubilisé avec 200 µL d'acide acétique glacial 33% (v/v),
- f) L'absorbance est ensuite mesurée à 540 nm avec un lecteur de microplaques.

Détermination du blanc et des DO :

Deux échantillons de blanc (eau distillée stérile au lieu de la suspension BHI) sont préparés et déposés en triplicate. La moyenne et l'écart-type de ces 6 mesures sont calculés. Le seuil de détection est égal à cette moyenne additionné de 2 écarts-types.

6. Analyse par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique introduite plus récemment dans les laboratoires de bactériologie. Elle permet d'identifier les bactéries en analysant les protéines qui les constituent. C'est une technique simple et rapide qui nécessite cependant un appareillage coûteux. Les appareils utilisés en bactériologie sont de type MALDI-TOF pour *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time-Of-Flight*. L'ionisation des protéines est assurée par un laser, l'analyse des ions générés se fait par mesure du temps mis par ces ions pour atteindre le détecteur. Ce temps est dépendant du rapport m/z de ces ions où m est la masse et z la charge de l'ion. Concrètement la colonie à identifier est déposée sur une plaque (spot) puis la matrice est ajoutée. On laisse sécher, la matrice cristallise autour des bactéries. Quand le laser frappe le mélange, la matrice s'évapore en libérant des fragments peptidiques et transfère ses protons à ces peptides leur conférant une charge. Les ions ainsi créés entrent dans un tube de vol où leur vitesse est proportionnelle à leur ratio m/z . Un détecteur récupère le signal des ions et un graphe sous forme d'une succession de « pics » est généré. Ce graphe est comparé à des profils obtenus à partir de souches de référence stockés sous forme d'une base de données.

Les profils des souches de *S. aureus* PVL+ ont été obtenus avec un analyseur Bruker MALDI-TOF microflex LT. L'analyse a été faite selon le protocole d'extraction complète décrit par Bruker. La matrice employée est constituée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique.

Protocole : extrait du chapitre 3.9.5 du manuel utilisateur biotyper 2.3 Bruker

1) Préparation de l'échantillon par extraction à l'acide formique

- Dans un tube Eppendorf, préparer une suspension trouble à partir des colonies dans 300 μ L d'eau déminéralisée,
- Ajouter 900 μ L d'éthanol pur et homogénéiser,
- Centrifuger 2 minutes à 13000 tours/min et éliminer le surnageant. Faire sécher complètement les culots en mettant sous PSM,
- Ajouter 30 μ L d'acide formique à 70% et homogénéiser vigoureusement à la pipette,
- Ajouter 30 μ L d'acétonitrile et mélanger avec la pipette,
- Centrifuger à nouveau à 13000 tours/min. L'échantillon (surnageant) est prêt.

2) Dépôt du matériel sur la plaque

- Placer 1 μ L de surnageant sur la cible MALDI,
- Laisser sécher le dépôt, si aucun matériel n'est visible sur la plaque, rajouter 1 μ L d'extrait supplémentaire,
- Ajouter 1 μ L de matrice sur le dépôt sec,
- Laisser sécher, la matrice cristallise. La plaque est prête.

Le recueil et l'analyse des spectres ont été effectués à l'aide du logiciel MALDI Biotyper RTC.

C. Résultats

1. Dossiers retenus et caractéristiques démographiques

Sur le période 2009 à 2014, nous avons retrouvé 39 patients admis à l'hôpital des Enfants, pour lesquels un *S. aureus* sécréteur de leucocidine a été isolé. Seuls 37 dossiers ont pu être inclus, les dossiers des patients 38 et 39 étant incomplets.

Le groupe était constitué de 17 filles (46%) et de 20 garçons (54%) soit un sex ratio de 1,2. On ne retrouve pas de différence significative de répartition entre les garçons et les filles ($p = 0,743$). L'âge médian des enfants lors de l'admission était de 4 ans (7 mois à 14 ans). Dans notre groupe, les garçons étaient plus âgés que les filles : âge médian des garçons 5 ans contre 2 ans pour les filles.

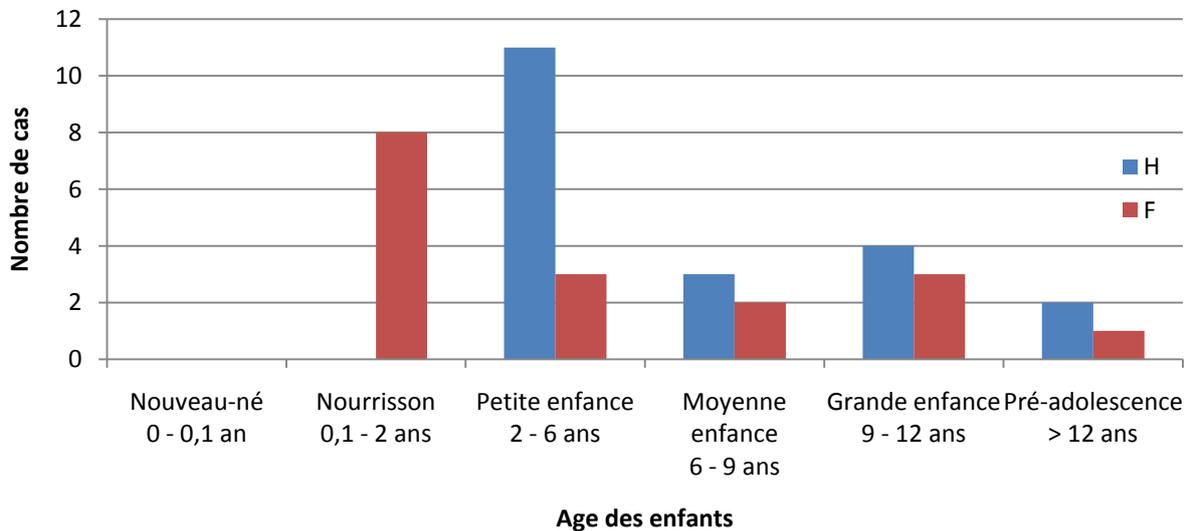


Figure 29 : Répartition des patients par tranche d'âge et par sexe

2. Pathologie diagnostiquée et parcours de soins

Sur les 37 patients, 36 ont été admis au service des urgences pédiatriques pour leur épisode infectieux, un seul a été vu dans le cadre d'une hospitalisation de jour pour la prise en charge concomitante d'une autre pathologie.

Tableau VI : diagnostic des infections liées au *S. aureus* PVL+ isolé

Diagnostic	Nombre de cas	Proportion (en %)
Infections de la peau et tissus mous	33	
- Abcès sous-cutanés	19	
- Unique	14	
- Multiples	5	
- Panaris	3	
- Furoncles	4*	89
- Dermo-hypodermite	1*	
- Adénophlegmon	2	
- Cellulite	1	
- Folliculites	1	
- Surinfection lésions abrasives	3	
Infections respiratoires basses		
- Pleuropneumopathie	1	3
Infections ostéo-articulaires	3	
- Spondylodiscite	1	8
- Ostéo-arthrite septique	2	
Total	37	100

*Le patient atteint de dermo-hypodermite a présenté au cours de son hospitalisation une furonculose satellite apparue sous traitement qui a aussi été comptabilisée.

Les infections cutanées sont de loin les plus représentées, quasiment 90% des cas.

Avant d'être admis aux urgences, 16 patients sont passés par une consultation chez leur médecin traitant (14 patients soit 38%), un spécialiste (1 patient soit 3%) ou une clinique (1 patient soit 3%). Les 21 autres (56%) ont été pris en charge par des structures hospitalières. Parmi ces derniers, 6 sont passés par des centre hospitaliers périphériques (16%), les 15 autres sont arrivés directement aux urgences de l'hôpital des enfants (40%).

Prise en charge initiale

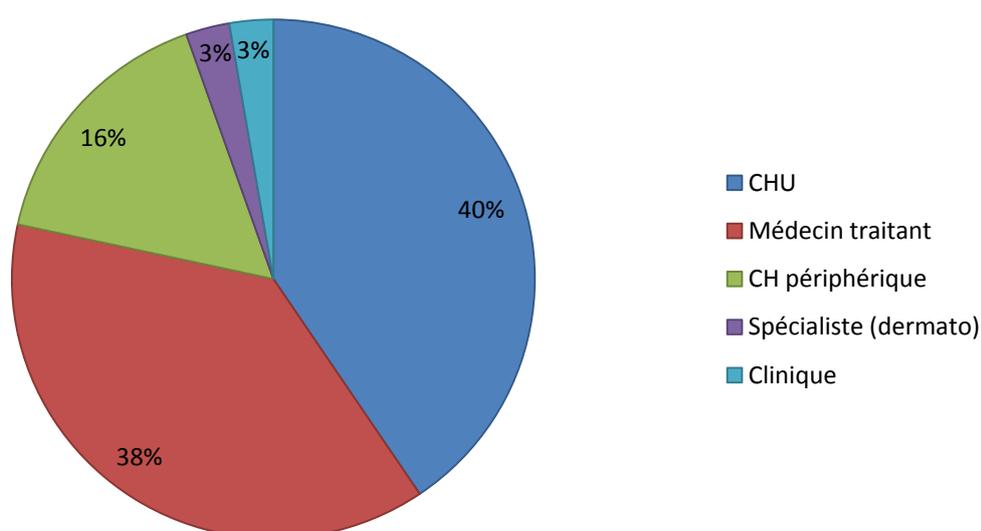


Figure 30 : Prise en charge initiale des patients

3. Antécédents cliniques et comorbidités

Sur les 33 enfants atteints d'infections de la peau, 5 d'entre eux ont souffert d'une infection staphylococcique cutanée avant l'admission à l'hôpital (18%), 4 ont été en contact proche avec une personne porteuse d'une infection staphylococcique (14%). Sur les 24 autres patients, 5 ont eu une ou plusieurs infections prises en charge à l'hôpital mais non documentées à *S. aureus*. On retrouve parmi ces pathologies deux bronchiolites, une pyélonéphrite, une conjonctivite et une otite. Pour 19 patients (57%), l'interrogatoire n'a mis en évidence aucun antécédent notable. Le patient atteint de pleuropneumopathie ainsi que ceux atteints d'infection ostéo-articulaire n'avaient aucun antécédent infectieux.

Les comorbidités associées sont peu nombreuses :

- 2 patients sont atteints d'asthme allergique traités au long cours,
- 2 autres souffrent de dermatite atopique dont un cas sévère,
- 2 patients souffrent d'eczéma,
- 1 des patients est suivi au long cours pour une épidermolyse bulleuse sévère à l'origine de multiples surinfections bactériennes,
- 1 patient est porteur d'une maladie de Willebrand modérée.

Les 29 autres patients ne sont pas suivis régulièrement pour une pathologie, on ne retrouve dans leurs antécédents que les infections habituelles de la petite enfance. Aucun patient n'était immunodéprimé.

Deux enfants appartenaient à la même fratrie et ont été pris en charge à une semaine d'intervalle. Les antibiogrammes des staphylocoques retrouvés étaient les mêmes et correspondent au profil du clone européen ST80. Hormis ces deux patients, il n'y a pas de cas groupés, de plus, les admissions des enfants s'étalent régulièrement sur la période. On n'observe pas de recrudescence des cas sur une saison particulière.

4. Vaccinations et notion de voyage

Sur les 37 patients, 25 étaient à jour de leurs vaccinations au moment de l'arrivée à l'hôpital, 2 patients n'étaient pas à jour (retard sur DTPolio). Pour 10 patients le statut vaccinal n'était pas renseigné.

8 de nos patients avaient voyagé dans les 6 mois précédents l'infection. Les pays/régions visités étaient différents pour chacun d'entre eux : Guinée, Maroc, Algérie, Tunisie, Inde, Guadeloupe et Mayotte. Les autres étaient domiciliés en France et ne sont pas partis à l'étranger avant leur admission à l'hôpital.

5. Etat clinique et biologie à l'admission

La présentation clinique était différente selon le type d'infection étudié. Il y avait dans notre étude trois groupes d'infection : peau et tissus mous (33 patients), ostéo-articulaire (3 patients) et respiratoire basse (1 patient).

a) Groupe peau et tissus mous (n = 33)

Un syndrome infectieux caractérisé par une hyperthermie était retrouvé chez 16 des 33 patients (48%). Un érythème important autour des lésions était retrouvé chez 10 patients (30%). 16 patients ne présentaient pas de signes généraux avec cependant pour certains des prises de paracétamol en automédication ou sur avis du médecin traitant.

On peut distinguer deux sous-groupes parmi ces patients : ceux dont les lésions étaient superficielles, limitées à la peau (10 patients, 30%) et ceux porteurs d'un foyer infectieux profond (23 patients, 70%). Dans le premier groupe, les signes généraux étaient rares, aucun n'avait de fièvre et un seul présentait un érythème important. Pour les infections profondes, la fièvre était retrouvée dans près de 2/3 des cas (65%), l'érythème dans 39% des cas. La présence d'adénopathies supérieures à 1 cm au niveau de la région du foyer infectieux était retrouvée dans 8 cas sur les 33 (24%), 18 n'en avaient pas (ou infracentimétrique). Cette information était indisponible pour les 7 autres cas. On ne retrouve pas de différence statistiquement significative sur la présence d'adénopathies selon que l'infection soit profonde ou superficielle ($p = 0,375$).

Les abcès sous-cutanés représentent le motif d'admission le plus important avec 19 cas. Ils étaient uniques dans quasiment 75% des cas (14 patients), multiples pour le dernier quart (5 cas). La sévérité des infections était très variable. Pour deux patients les tableaux cliniques étaient sévères : le premier a développé une dermo-hypodermite nécrosante avec formation d'abcès et furonculose associée, le second une cellulite au niveau du genou avec un œdème et une impotence fonctionnelle importante. A l'inverse, pour 4 patients les lésions sont restées superficielles, il s'agissait principalement de surinfections sur des lésions causées par d'autres pathologies dermatologiques. Les localisations étaient variées avec une nette prédominance pour le siège et les membres inférieurs.

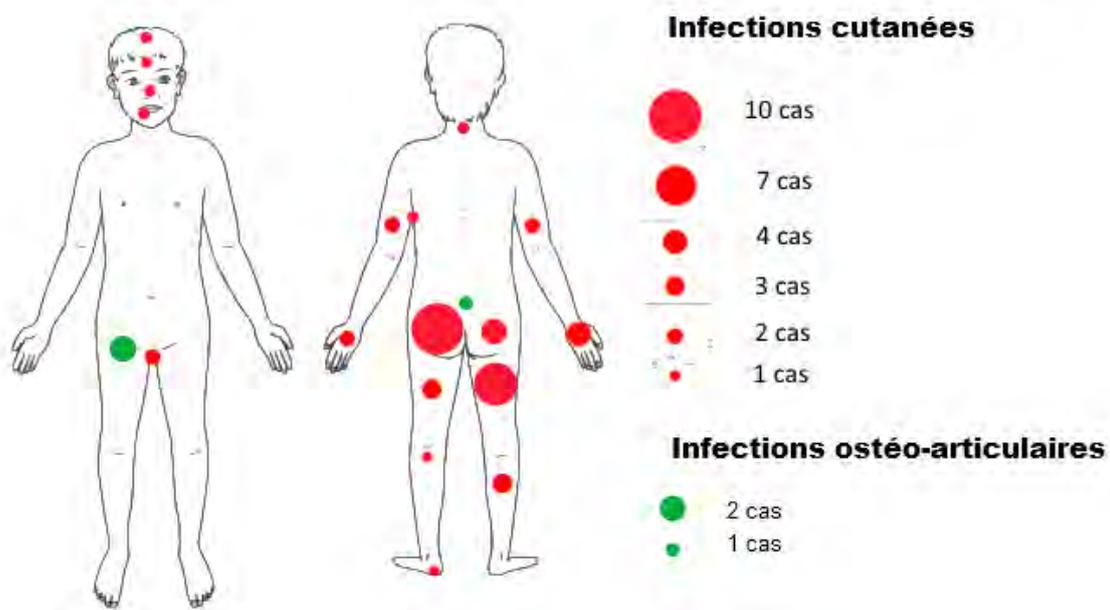


Figure 31 : localisations des infections dans notre cohorte. Les infections cutanées sont en rouge, les ostéo-articulaires en vert.

Une porte d'entrée a été retrouvée pour 17 des 33 patients (51%). Il s'agissait à chaque fois d'une effraction cutanée consécutive à un traumatisme, une abrasion, une piqûre ou une maladie de la peau. Pour les 16 autres patients aucune porte d'entrée n'a été retrouvée.

Le délai entre l'apparition des symptômes et la prise en charge à l'hôpital était très variable d'un patient à un autre. Il était en moyenne de 8 jours pour l'ensemble des patients, 1 jour pour le plus court et 30 pour le plus long. Les deux patients porteurs de lésions chroniques n'ont pas été inclus dans ce calcul.

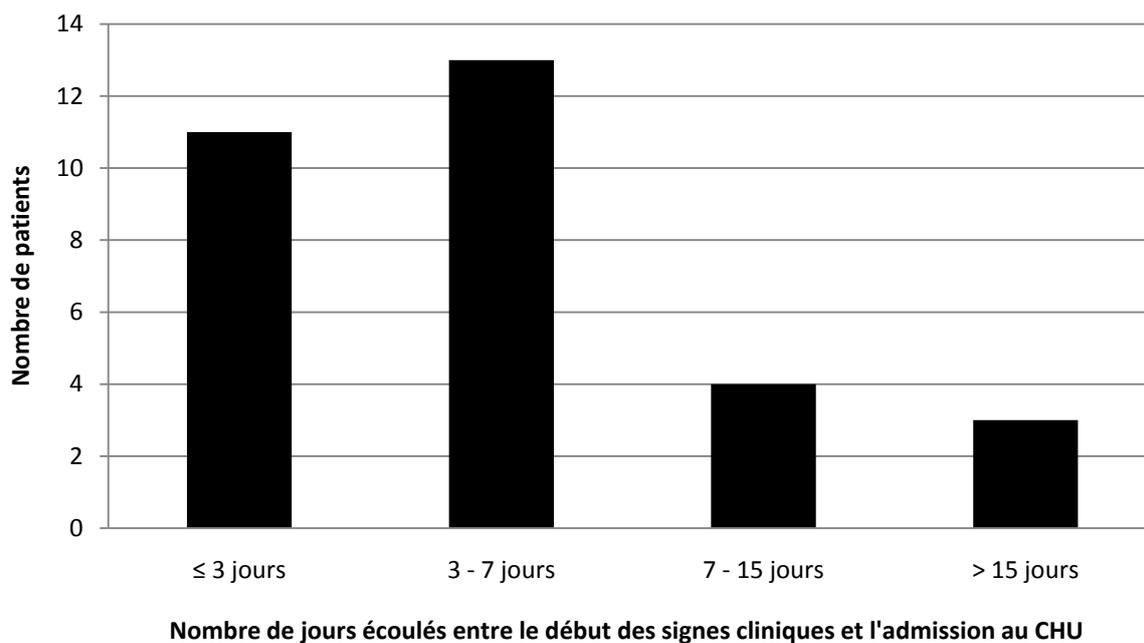


Figure 32 : délai entre l'apparition des premiers signes et l'admission à l'hôpital.

Sur le plan biologique on retrouve chez les patients les signes d'une infection bactérienne avec une polynucléose souvent modérée, parfois absente et surtout une élévation de la CRP modérée elle aussi.

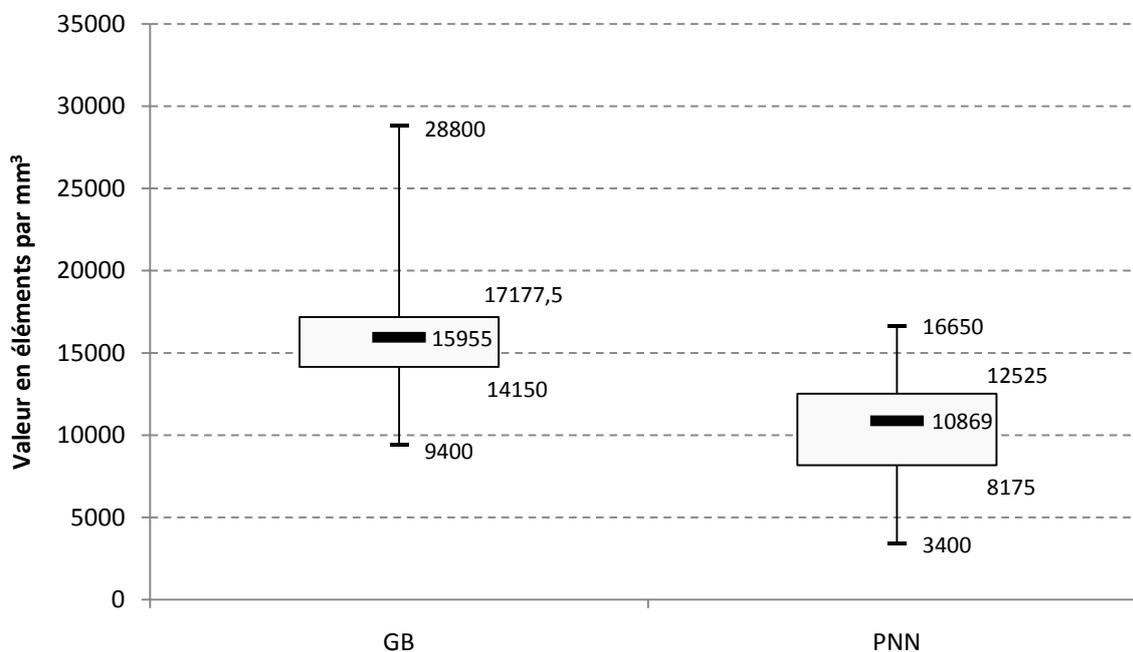


Figure 33 : diagramme de Tuckey représentant les valeurs absolues dans le sang des leucocytes et des polynucléaires neutrophiles à l'admission chez 20 patients (données non disponibles pour les 13 autres).

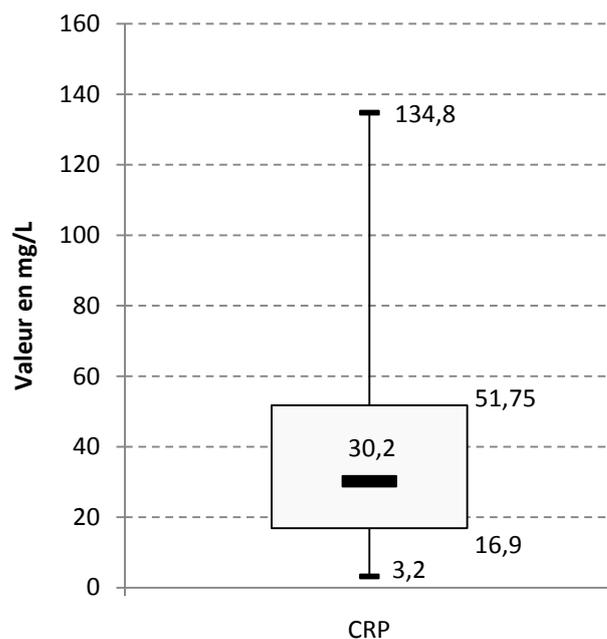


Figure 34 : diagramme de Tuckey représentant les valeurs CRP sanguine à l'admission chez 19 patients (données non disponibles pour les 14 autres).

Le diagnostic bactériologique a été donné par les prélèvements cutanés des lésions réalisés soit en consultation soit au bloc opératoire.

La prise en charge était différente selon le type de lésion. Pour les abcès et les adénites (21 patients), 19 ont nécessité une prise en charge chirurgicale au bloc opératoire. Sur ces 19 patients, 12 (63%) avaient reçu dans les jours précédents une antibiothérapie efficace en théorie (Augmentin® le plus souvent) qui n'a pas permis d'obtenir la guérison. Les 3 cas de panaris ont aussi nécessité une incision chirurgicale, l'antibiothérapie n'a été débutée que pour deux d'entre eux.

Pour les 11 autres patients, il n'y avait pas de foyers collectés ou ceux-ci étaient de taille limitée. Il n'y a pas eu recours à la chirurgie pour ces infections, le traitement a reposé essentiellement sur l'antibiothérapie.

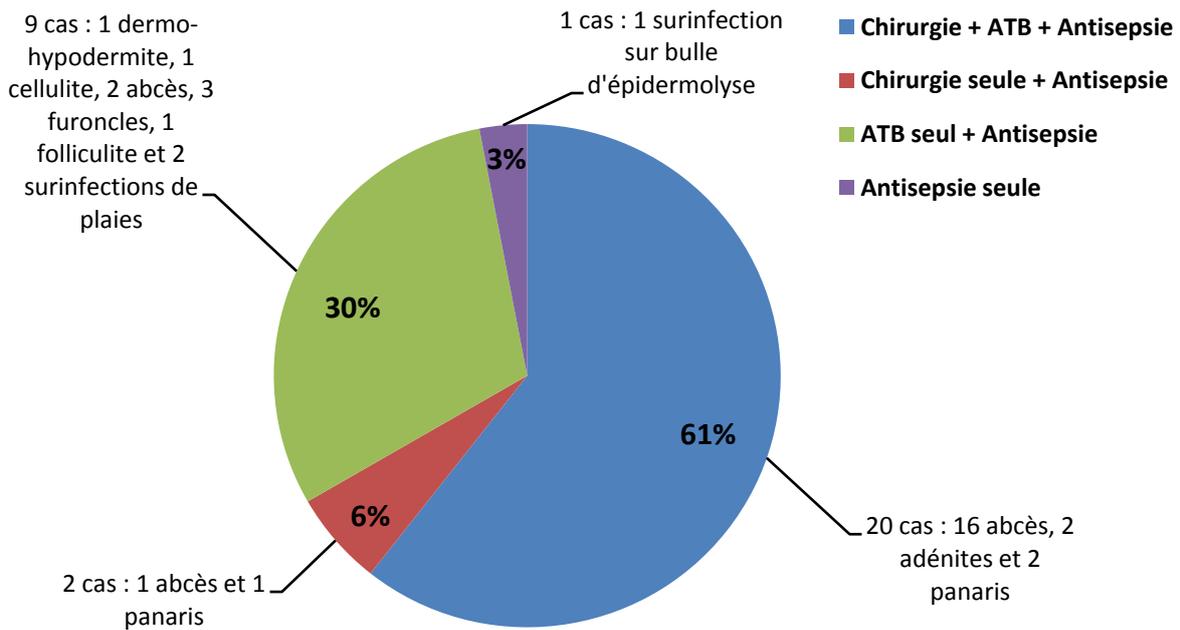


Figure 35 : Prise en charge des infections de la peau et des tissus mous au CHU.

Suite à leur admission à l'hôpital des Enfants, 29 patients ont reçu un traitement par amoxicilline + acide clavulanique. L'administration s'est faite par voie IV pour 15 d'entre eux dont 3 en association avec une autre molécule (gentamicine et clindamycine). Les 14 autres patients ont reçu leur traitement per os. Un patient a été traité par l'association Rocéphine® Flagyl®. Pour les trois enfants qui n'ont pas reçu d'antibiotiques, la prise en charge est restée limitée à l'utilisation d'antiseptiques. Un seul patient est sorti de l'hôpital sans antibiotiques après avoir été opéré pour un abcès sous-cutané.

L'évolution sous traitement a été rapidement favorable dans 26 cas eux avec une guérison complète d'emblée sans modification de l'antibiothérapie initiale. Un réajustement a été nécessaire pour 7 patients. Dans ce groupe, 2 patients n'avaient pas reçu d'antibiotiques et évoluaient défavorablement ce qui a imposé la mise en place d'un traitement. Pour les 5 autres, l'antibiothérapie initiale a été modifiée par rapport aux résultats de l'antibiogramme et de la présence de la PVL.

Tableau VII : Causes de réajustement de l'antibiothérapie initiale et molécules utilisées.

Patient N°	Antibiothérapie initiale	Antibiothérapie modifiée	Indication du réajustement
3	Augmentin® per os	Augmentin® + Dalacine®	Présence PVL et échec traitement
5	Augmentin® IV Gentamicine IV	Claforan® IV Vancomycine IV puis Targocid® IM	SARM
9	Augmentin® IV Flagyl® IV	Rifadine® Bactrim®	SARM
13	Augmentin® IV Gentamicine IV	Vancomycine® Rifadine® puis Zinnat® Dalacine®	Guérison lente
26	Augmentin® per os	Oflozet® per os	SARM et échec
35	Augmentin® per os	Rifadine® Bactrim®	SARM et échec

Après réajustement, la guérison a pu être obtenue chez tous les patients. Cependant 7 patients sur 33 (environ 21%) ont fait une récurrence dans les 6 mois qui ont suivi la prise en charge. Ces récurrences ont majoritairement cédé sous antibiotiques (6 sur les 7 soit 85%), un seul patient a nécessité une nouvelle intervention chirurgicale.

Sur les 33 enfants, 10 étaient infectés par des SARM (30%). Parmi ces patients, 2 ont guéri sans antibiotiques, 4 avec une antibiothérapie inefficace sur le papier (Augmentin®). L'antibiothérapie a été réajustée selon l'antibiogramme pour les 4 derniers patients, les détails sont disponibles dans le tableau VII.

Un protocole de décontamination a été mis en place pour 6 d'entre eux. Des prélèvements des différents sites potentiels de portage ainsi qu'une décontamination à base de mupirocine ont été réalisés afin de pallier aux récurrences.

b) Groupe ostéo-articulaire(n = 3)

Pour deux des patients, le foyer infectieux se situait au niveau de l'articulation coxo-fémorale droite. Le troisième a été pris en charge pour une spondylodiscite au niveau de la vertèbre L3.

Les deux patients atteints d'ostéo-arthrite septique présentaient des troubles locomoteurs importants. Le premier souffrait d'une boiterie franche, le second ne pouvait plus s'appuyer sur sa jambe droite (marche impossible). Pour le patient atteint de spondylodiscite, la pathologie se manifestait par des douleurs lombaires importantes, des paresthésies dans la cuisse droite et un syndrome infectieux. La biologie était identique au groupe précédent avec une CRP élevée persistante et un polynucléose neutrophile.

Les ostéo-arthrites ont évolué sur plusieurs mois. La spondylodiscite a été prise en charge en moins de 15 jours. Le diagnostic a été posé sur les images radio, sur les prélèvements bactériologiques (hémocultures et biopsies) et anatomopathologiques. Dans les trois cas, l'imagerie a retrouvé des lésions lytiques osseuses en regard de l'articulation atteinte.

Les examens anatomopathologiques et radiologiques ont montré dans les trois cas des foyers de nécrose osseuse, très avancée pour un des patients qui présentait une destruction complète de la tête fémorale.

Les deux ostéo-arthrites ont nécessité une prise en charge chirurgicale associée à une antibiothérapie en raison de l'importance des dégâts sur l'articulation coxo-fémorale. La spondylodiscite s'est résolue à l'aide d'un traitement antibiotique IV prolongé (2 mois). Les patients atteints d'ostéo-arthrites avaient été pris en charge initialement dans d'autres centres hospitaliers par une antibiothérapie qui, seule, n'avait pas permis d'obtenir la guérison. Un des patients a présenté des complications graves avec apparition d'une cellulite au niveau de la cuisse et d'une pneumopathie qui ont cependant cédés sous antibiotiques. Ce patient n'a pas été inclus dans le groupe pneumopathie car celle-ci n'était pas documentée à *Staphylococcus aureus*.

La spondylodiscite s'est résolue sans séquelles. Les ostéo-arthrites septiques ont laissé des séquelles importantes sur la marche qui nécessitent des consultations régulières et une prise en charge au long cours. Le détail des antibiothérapies administrées est disponible dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Antibiothérapies utilisées pour les patients du groupe ostéo-articulaire

Patient N°	Pathologie	Antibiothérapie à l'hôpital	Traitement ambulatoire
23	Ostéo-arthrite septique	Vancomycine® IV + Gentamicine® IV	NA
24	Ostéo-arthrite septique	Augmentin® IV puis Vancomycine® IV	Rifadine® Dalacine®
25	Spondylodiscite	Oroken® 10 jours puis réajustement : Orbénine® IV 7 jours	Orbénine® per os 2 mois

c) Cas d'infection pleuro-pulmonaire

Nous n'avons retrouvé qu'un seul cas d'infection respiratoire basse documentée à *S. aureus* PVL+ en pédiatrie sur la période 2009-2014.

L'histoire de ce patient débute par une hospitalisation aux urgences pédiatriques pour hyperthermie avec gêne respiratoire sans toux ni rhinorrhée. Un diagnostic de bronchiolite est porté sans nécessité d'hospitalisation. Cinq jours après, devant l'aggravation des signes le patient consulte son médecin traitant qui prescrit un traitement par Josacine® qui ne permet pas d'obtenir une amélioration. Après 10 jours de traitement, une détérioration sur le plan respiratoire et une persistance de l'hyperthermie, le patient est réadmis aux urgences pédiatriques. L'examen clinique retrouve une abolition du murmure vésiculaire à gauche et une matité à la percussion. La biologie retrouve une CRP à 158 mg/L et une polynucléose à 21000 éléments par mm³.

La radiographie thoracique et le scanner retrouvent un volumineux pyopneumothorax faisant évoquer le diagnostic de pleuropneumopathie. Le patient est alors transféré en pneumologie.

Un drainage thoracique ramenant 390 mL de pus est réalisé. L'examen de ce liquide au laboratoire de bactériologie met en évidence un *S. aureus* PVL+. Le patient est mis en parallèle sous Claforan® Vancomycine® et Gentamicine® pendant 12 jours. Un relais per os est effectué avec une association Augmentin® amoxicilline et Rifadine®. L'évolution est favorable avec une sortie au bout de 3 semaines d'hospitalisation sous antibiotiques.

6. Caractéristiques des souches

a) Analyse en spectrométrie de masse

La totalité des souches a été correctement identifiée avec un score supérieur à 2. Cette analyse nous a permis de confirmer l'identification et le repiquage des isolats à partir des échantillons congelés.

Les spectres étaient différents cependant l'analyse de clonalité notamment par génération d'un dendrogramme n'a pas été réalisée car trop complexe. De plus, les seuils permettant de déterminer l'appartenance à un groupe clonal en spectrométrie de masse ne sont pas encore définis.

b) Profils de résistance antibiotique et infections associées

Profil phénotypique de résistance aux antibiotiques de l'ensemble des souches de *S. aureus* isolées au laboratoire entre 2009 et 2014 :

L'étude des profils de résistance a d'abord porté sur la totalité des souches de *Staphylococcus aureus* du laboratoire indépendamment de la présence de la PVL. La détection des SARM et des clones ST80 repose sur les données de l'antibiogramme. L'isolat était classé SARM si on retrouvait une résistance à l'oxacilline ou l'amoxicilline + acide clavulanique (au moins une). L'appartenance au complexe ST80 repose sur les critères établis dans la publication de Robert J. et al.¹³⁴

Les résultats sont compilés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IX : profils de résistance des *Staphylococcus aureus* isolés entre 2009 et 2014 au CHU de Toulouse

Population	Année	Nombre d'isolats de <i>S. aureus</i>	Dont SARM	Dont PVL	Dont SARM et PVL	%SARM	%PVL
Générale	2009	4015	858	12	6	21	0,3
	2010	4092	756	26	5	18	0,6
	2011	4108	743	29	13	18	0,7
	2012	4046	745	13	5	18	0,3
	2013	3635	605	9	4	17	0,2
	2014	1586	252	6	3	16	0,4
	Total		21482	3959	95	36	18
Pédiatrique	2009	794	99	8	2	12	1,0
	2010	811	73	7	2	9	0,9
	2011	784	83	17	5	11	2,2
	2012	751	68	4	2	9	0,5
	2013	725	52	3	2	7	0,4
	2014	312	16	2	0	5	0,6
	Total		4177	391	41	13	9

Ce tableau permet de voir l'évolution des résistances ainsi que la fréquence du clone communautaire dominant en Europe. On constate une diminution progressive de la proportion de SARM parmi les souches de *S. aureus* qui reste stable en valeur absolue au laboratoire du CHU.

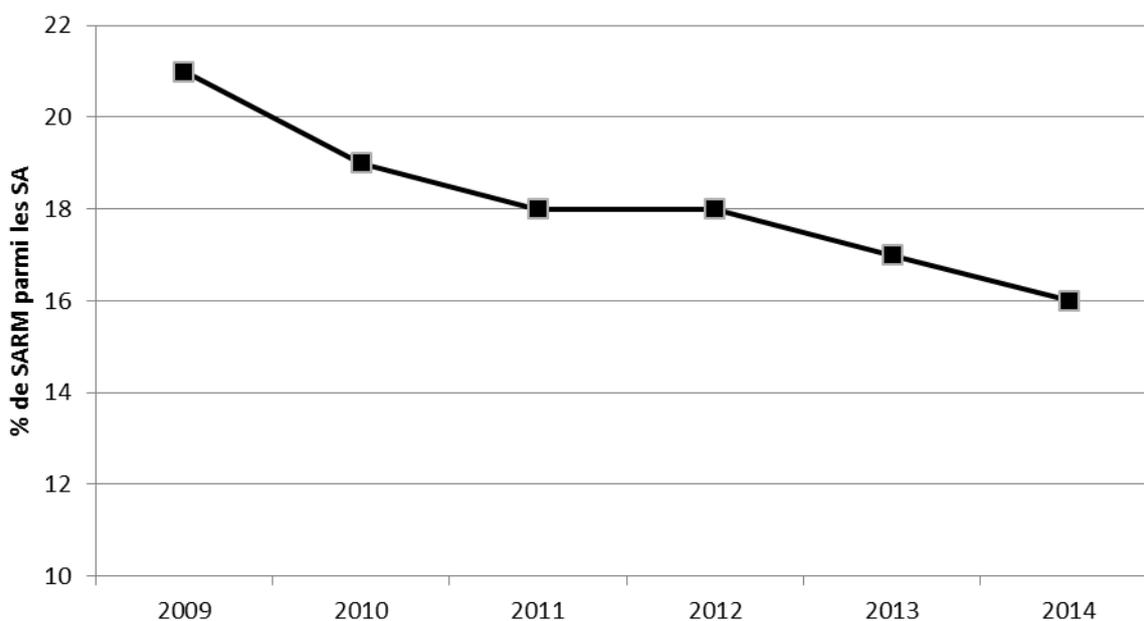


Figure 36 : évolution de la prévalence de la résistance à la méticilline de 2009 à 2014 au CHU de Toulouse.

Le pourcentage de « clones » ST80 est resté stable entre 2009 et 2014. Il est très faible et représente entre 1 et 2% des isolats de SARM au laboratoire.

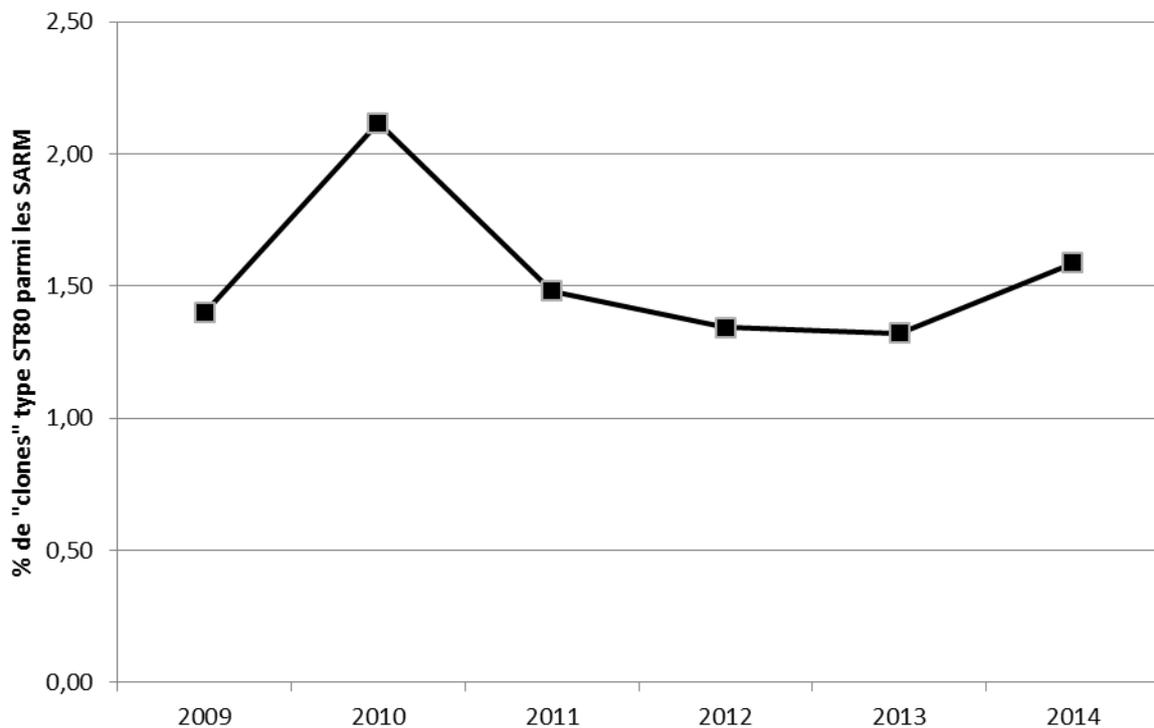


Figure 37 : proportion de souches dont le profil phénotypique correspond au clone européen ST80.

Profil phénotypique de résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* PVL + :

Au total 95 souches de *Staphylococcus aureus* producteur de leucocidine de Panton-Valentine ont été isolées au CHU de Toulouse entre 2009 et 2014. Parmi ces souches, on retrouve 36 SARM (38%) et 59 SASM (62%). L'analyse du profil antibiotique permet de retrouver 21 antibiogrammes compatibles avec le profil d'un « clone » de SARM communautaire ST80 soit 22% de la collection. On retrouve ces souches chez 4 de nos 27 patients de pédiatrie. Le pourcentage de résistance pour chaque classe d'antibiotique est détaillé dans l'histogramme ci-dessous.

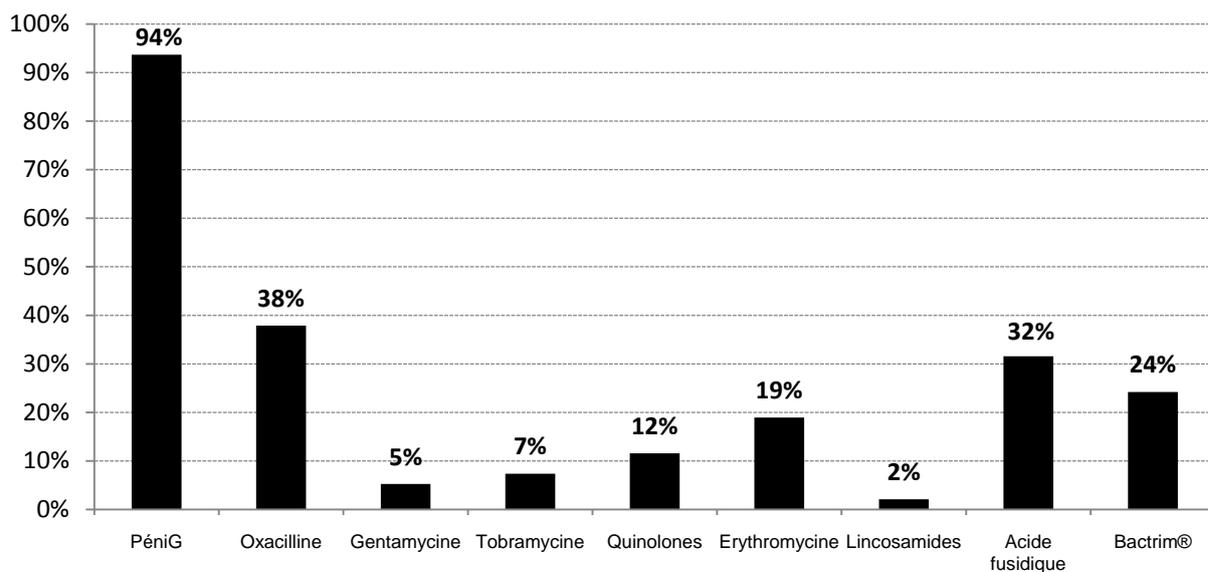


Figure 38 : proportion de souches PVL+ résistantes aux différentes classes d'antibiotiques.

Les souches PVL+ étaient statistiquement plus résistantes à la pénicilline que l'ensemble des *S. aureus* isolés sur la même période. On retrouve ce résultat aussi bien dans la population générale ($p < 0,001$) que chez les enfants ($p < 0,001$). Le pourcentage de SARM PVL est resté stable sur la période 2009 – 2014 autour de 40%.

c) Recherche de clones de SARM communautaires USA300

Nous avons testé 95 souches en PCR pour le gène *arcA* qui signe la présence de l'ACME. Ce gène n'a été retrouvé sur aucune des souches de notre collection. Il apparaît qu'il n'y a pas d'isolat de *S. aureus* PVL+ appartenant au complexe clonal de l'USA300 isolé entre 2009 et 2014 au CHU de Toulouse.

d) Recherche du facteur de virulence sasX

Sur les 95 isolats testés, le gène *sasX* n'a été retrouvé sur aucun d'entre eux. Il apparaît donc que les souches de notre collection n'expriment pas la protéine SasX.

e) Résistance aux antiseptiques

Nous avons évalué la résistance aux ammoniums quaternaires en cherchant les gènes *qacA/B* et *qacC* sur 95 isolats de *S. aureus* PVL+. Le gène *qacC* n'a été retrouvé sur aucune souche. Le gène *qacA/B* a été retrouvé sur un seul des isolats de notre collection soit à peine plus de 1% du total. Les contrôles positifs et négatifs étaient valides.

Par conséquent, on peut affirmer que nos isolats de *S. aureus* producteurs de leucocidine de Panton-Valentine n'expriment qu'exceptionnellement les pompes d'efflux Qac.

f) Sérotype capsulaire

La recherche a été faite sur 95 isolats, les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. Les effectifs de souches PVL+ obtenues pour chaque sérotype ont été comparés à ceux retrouvés dans la littérature.

Tableau X : répartition des sérotypes capsulaires chez les souches de *S. aureus* PVL+

Statut PVL	Sérotype	Groupe 8	Groupe 5	Non groupable
<i>Staphylococcus aureus</i> PVL+	Nombre de souches	58	22	15
	Proportions observées	61%	23%	16%
Ensemble <i>Staphylococcus aureus</i>	Proportions décrites dans la littérature ⁷⁰	50%	25%	25%
P value		0,207		

Il n'y a pas de différence significative de répartition des sérotypes capsulaires en fonction du statut PVL.

Cas des patients de pédiatrie :

Tableau XI : répartition des sérotypes capsulaires pour les patients de pédiatrie

Statut PVL	Sérotype	Groupe 8	Groupe 5	Non groupable
<i>Staphylococcus aureus</i> PVL+	Nombre de souches	58	22	15
	Proportions	61%	23%	16%
Patients de pédiatrie	Nombre de souches	24	10	5
	Proportions	61%	26%	13%
Comparaison		0,889		

On ne retrouve pas non plus de différence de répartition des sérotypes entre la population générale et les patients de pédiatrie.

g) Résistance à la mupirocine

Aucune souche testée n'était résistante à la mupirocine qui est l'antibiotique le plus utilisé dans le cadre des protocoles de décontamination des infections à *S. aureus* PVL+.

h) Production de biofilm et infections associées

La production de biofilm est un facteur essentiel de chronicité et de difficulté de traitement des infections à staphylocoque. 94 souches ont été évaluées par la méthode au cristal violet. Les valeurs de DO sont consignées dans la figure 39.

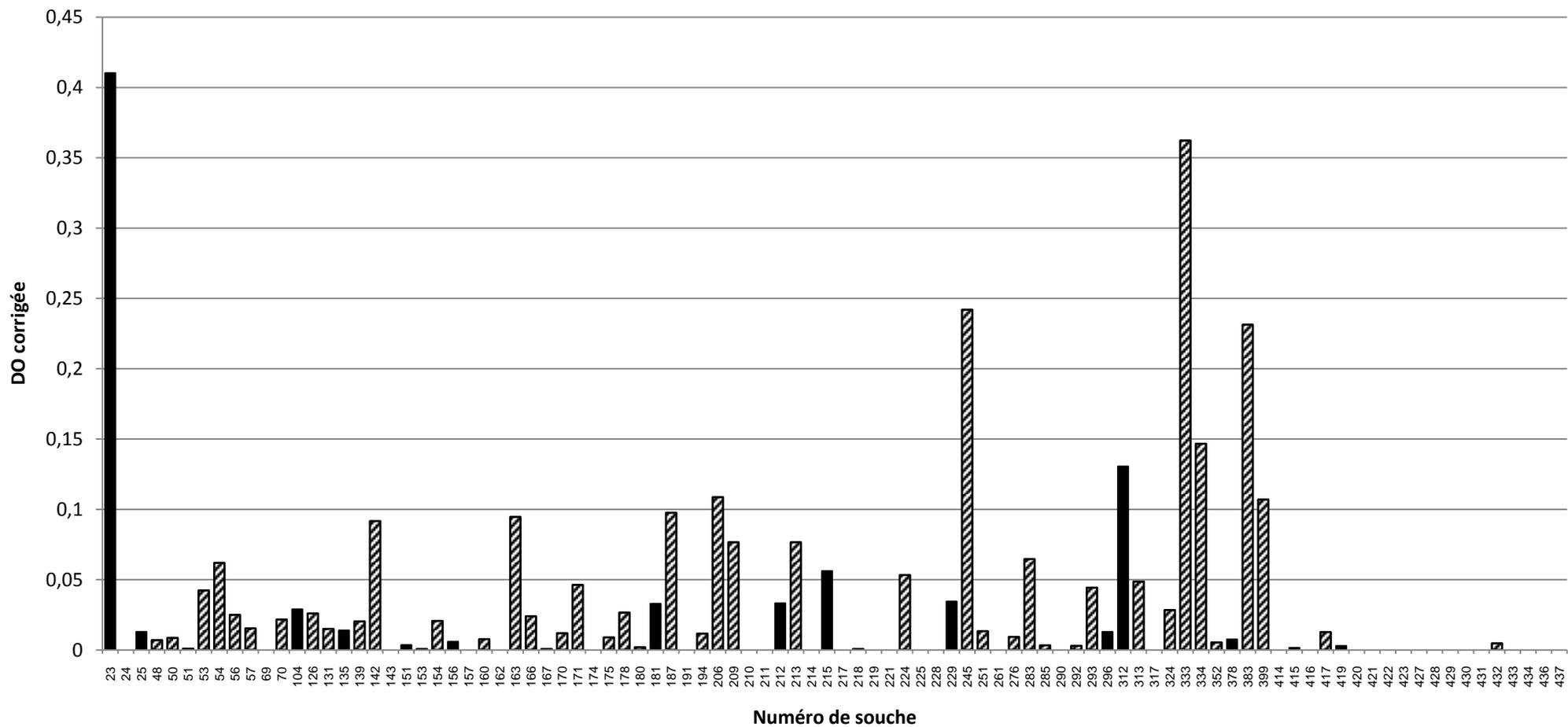


Figure 39 : valeurs de DO obtenues par la méthode de coloration au cristal violet pour chacune des souches. Ce résultat a été calculé en faisant la moyenne des triplicats à laquelle on retranche la valeur moyenne du blanc plus deux écart-type. Les patients adultes sont en grisé, les enfants en trait noir plein.

En fonction des DO obtenues nous avons déterminé quatre classes différentes désignées par un score de 1 à 4 :

- 1 → DO 0 absence de production
- 2 → DO 0 – 0,05 faiblement producteur
- 3 → DO 0,05–0,15 producteur intermédiaire
- 4 → DO >0,15 fortement producteur

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XII : nombre de souche par groupe de production de biofilm.

Population	DO	Classe	Nombre de souche	Proportions (%)
Générale	0	1	33	35
	0 à 0,05	2	44	47
	0,05 à 0,15	3	13	14
	Supérieur à 0,15	4	4	4
	Total	-	94	100
Pédiatrique	0	1	16	41
	0 à 0,05	2	17	44
	0,05 à 0,15	3	4	10
	Supérieur à 0,15	4	2	5
	Total	-	39	100

*Remarque : une des souches n'a pas été retrouvée au moment de l'ensemencement des milieux BHI et n'a pas été incluse.

Il n'y a pas de différence significative de répartition entre les deux groupes. (p = 0,802)

La récurrence et la profondeur des lésions sont deux paramètres ayant un lien physiopathologique avec la production de biofilm. Sa présence entraîne le développement de pathologies chroniques difficiles à traiter uniquement par des antibiotiques. Les deux tableaux ci-dessous montrent le nombre de souches de chaque catégorie selon le caractère récidivant de l'infection ou de la profondeur du foyer (tableau XII).

Tableau XIII : Relation entre production de biofilm, récurrence et profondeur des lésions

Caractère de l'infection	Classes de producteurs de biofilm				P value
	1	2	3	4	
Récurrence	2	5	1	0	0,912
Pas de récurrence	10	14	3	2	
Profond	10	13	3	1	0,718
Superficiel	2	6	1	1	

Ces données ne permettent pas de mettre en évidence un lien entre la production de biofilm et la récurrence. On n'observe pas non plus de différence significative de répartition entre les classes selon la profondeur du foyer infectieux.

III. DISCUSSION

A. Présentation clinique des infections à *S. aureus* PVL+ en pédiatrie

Sur les 92 patients, 39 étaient des enfants de moins de 15 ans au moment de l'épisode infectieux soit environ la moitié des patients de notre cohorte (42%). La littérature décrit bien l'association épidémiologique entre les enfants et les pneumopathies à *S. aureus* PVL+.¹⁴ Cependant nos cas concernent majoritairement (environ 85%) des cas d'infections cutanées d'origine communautaire. Les enfants ont été décrits comme un groupe à risque de développer des infections staphylococciques indépendamment du statut PVL.¹³⁵ Cette observation peut s'expliquer par la vie en communauté dans les écoles qui favorise les contacts et donc la transmission notamment par manu-portage de *S. aureus*. Dans notre groupe, les cas étaient isolés et ne correspondaient pas à un contexte épidémique. Seuls deux patients étaient de la même fratrie, les souches isolées chez eux présentaient des profils antibiotiques et phénotypiques identiques. Les autres n'avaient pas de lien entre eux. L'association épidémiologique entre le statut PVL et les infections cutanées est bien documentée, on la retrouve ici aussi avec une nette majorité de ce type d'infection sur l'ensemble de nos patients. La médiane d'âge pour l'ensemble de nos patients était de 24 ans ce qui est concordant avec l'étude de Yamasaki et al qui retrouvaient une médiane de 21 ans pour les *S. aureus* PVL+ contre 48 ans pour les PVL-.¹³⁹

La majorité des patients n'avait pas non plus d'antécédents médicaux notables dans leur historique. On ne retrouvait pas de troubles immunitaires ou de pathologies sévères associées. Ces enfants étaient généralement sains et en bonne santé à l'exception de 5 d'entre eux (15%). Ils étaient suivis pour des pathologies cutanées qui ont probablement servi de porte d'entrée au staphylocoque. Les patients atteints d'infections ostéo-articulaires et pleuropulmonaires n'avaient aucun antécédent médical notable. Les infections à *S. aureus* PVL+ semblent survenir chez des enfants sains principalement dans la petite et moyenne enfance sans terrain particulier sous-jacent. Ces bactéries se propagent de façon communautaire mais pas sur un mode épidémique, même si ce genre d'épisode a déjà été décrit en France.¹³⁵ La recherche du portage n'étant pas systématique nous n'avons pas de données suffisantes pour savoir si ces enfants étaient préalablement colonisés par la souche qui a causé leur épisode infectieux. Dans la littérature, on retrouve rarement les gènes *lukF-PV* et *lukS-PV* sur les souches isolées à partir de prélèvements des sites de portages. Cette observation suggère une capacité de la bactérie à persister sur la peau des patients après résolution de l'infection. Cette notion de récurrence est d'ailleurs l'un des éléments qui oriente le clinicien vers la présence d'un staphylocoque doré producteur de leucocidine de Panton-Valentine.

La prise en charge aux urgences du CHU concernait moins d'un tiers des patients, la plupart ont été pris en charge initialement par leur médecin traitant ou par un CHG. Il est très probable qu'une partie des infections à *S. aureus* PVL+ soit prise en charge en communautaire par le médecin traitant ou même en automédication. En effet, ces staphylocoques sont souvent sensibles aux bêta-lactamines et sont principalement responsables d'infections superficielles qui peuvent être prises en charge en ville. Les pathologies pour lesquelles des prélèvements sont réalisés correspondent souvent à des cas plus sévères nécessitant une hospitalisation.

Ces infections sont plus profondes et ne cèdent pas sous antibiothérapie orale seule. De plus, la recherche de PVL n'est pas systématique, elle n'est réalisée qu'à la demande du clinicien si des signes évocateurs sont présents. Cependant la sémiologie clinique de la PVL n'est pas toujours aisément reconnaissable. Il apparaît donc évident qu'une part importante des infections à SA PVL+ n'est pas documentée ce qui induit des biais lors d'études cliniques rétrospectives comme la nôtre.

Une porte d'entrée n'a été retrouvée que chez la moitié des patients, il s'agissait de lésions traumatiques de la peau le plus souvent. Les causes de ces lésions sont multiples. Dans notre cohorte, trois origines principales ont été retrouvées : piqures d'arthropodes, chutes (notamment pour les bébés) et dermatites d'origine allergique. Il n'est pas surprenant de ne pas retrouver cette porte d'entrée chez certains patients sachant que le staphylocoque doré est capable de se développer aussi bien sur la peau saine que la peau lésée. Pascal Del Giudice et al ont fait l'hypothèse que *S. aureus* attaquerait la peau par le follicule qui constituerait un foyer initial (folliculite) pouvant évoluer en attaquant les structures environnantes. Ainsi l'infection débiterait par une folliculite, puis un furoncle jusqu'à l'abcédation.¹³⁸ Cette évolution est rapide, certains de nos patients ont été admis à l'hôpital avec de volumineux abcès moins de 3 jours après l'apparition des premiers signes, moins d'une semaine pour deux tiers d'entre eux. L'hyperthermie persistante malgré une antibiothérapie efficace sur le papier est retrouvée chez une majorité de patient, elle est corrélée avec la profondeur du foyer infectieux. Les adénopathies, en revanche, sont retrouvées de manière inconstante y compris pour les foyers abcédés profonds. La fièvre et la douleur ont été la principale raison de consultation aux urgences pour les patients. Parmi les critères retrouvés dans la littérature pour distinguer les infections causées par un staphylocoque PVL+ de celle causées par un PVL-, l'érythème est souvent décrit. La présence de la PVL serait à l'origine d'un érythème plus important, cette observation n'a été notée que pour un tiers de nos cas sans association avec la profondeur du foyer infectieux. Ce critère semble difficile à évaluer et variable d'un patient à un autre. On constate en ce qui concerne nos cas, qu'aucun critère clinique caractéristique de la PVL n'a pu être mis en évidence à l'admission du patient. La recherche de la PVL a été le plus souvent demandée plusieurs jours après l'admission devant la persistance ou la récurrence de l'infection. Les cliniciens se sont aussi basés sur la localisation du site infectieux et les caractéristiques démographiques des patients (l'âge et l'absence d'antécédents notamment) pour demander la recherche de PVL au laboratoire.

Sur le plan biologique les syndromes infectieux et inflammatoires sont restés modérés. Le taux médian de polynucléaires chez les patients était d'environ 10000/mm³ avec une grande variation d'un sujet à l'autre (Min 3400 – Max 19530). Certains patients avaient un taux de polynucléaires neutrophiles normal alors qu'ils étaient porteurs d'infections profondes et sévères ce qui peut être expliqué par l'action lytique de la PVL sur les neutrophiles. Cette observation avait aussi été décrite au CHU de Toulouse chez des patients hospitalisés en réanimation pour des pneumopathies à *S. aureus* PVL+ avec même des cas de leucopénie dans les jours qui ont suivi l'admission. Dans cette étude, la leucopénie initiale était associée à un moins bon pronostic. L'élévation de la CRP était aussi modérée chez la plupart des patients avec une médiane à 30 mg/L, valeur très inférieure à ce que l'on peut voir habituellement dans les infections invasives comme les sepsis où la CRP dépasse souvent 100 mg/L.

La prise en charge est marquée par la nécessité du recours à la chirurgie dès lors qu'un foyer collecté est présent. L'amélioration clinique après drainage de l'abcès est immédiate cependant une antibiothérapie efficace reste nécessaire pour éviter une rechute. Dans notre cohorte, un des patients a été initialement pris en charge uniquement par chirurgie. L'évolution post-opératoire a été marquée à J15 par l'apparition d'une éruption vésiculeuse staphylococcique et une cicatrisation lente avec persistance d'une cavité au point d'incision de l'abcès. La guérison de ce patient n'a pu être obtenue qu'après mise en place d'une antibiothérapie adaptée. Les prélèvements bactériologiques sont aussi généralement effectués au bloc. L'identification du *S. aureus* PVL+ ayant été faite dans la majorité des cas sur le liquide évacué. La guérison a été plus longue à obtenir pour les patients atteints de SARM, un réajustement de l'antibiothérapie a été nécessaire au cours du suivi post-opératoire. Sur les 33 patients atteints d'infections cutanées, 29 ont reçu un traitement au CHU par amoxicilline + acide clavulanique. L'utilisation de l'Augmentin® dans cette indication ne correspond pas aux recommandations qui conseillent plutôt l'utilisation de la pristinamycine ou de la cloxacilline en intraveineux. On retrouve dans les recommandations pour l'antibiothérapie des pneumopathies communautaires et des infections ostéo-articulaires une place pour la clindamycine (Dalacine®).^{147,156} Trois patients de notre cohorte ont reçu cet antibiotique qui a l'avantage de bloquer la synthèse protéique bactérienne. La décision d'ajouter ou non cette molécule n'est cependant pas évidente pour le clinicien. Elle peut se faire par la recherche des gènes codant la toxine au laboratoire avec parfois un délai important (temps nécessaire à l'isolement et à l'identification du staphylocoque auquel s'ajoute le délai de réalisation de la PCR). Le clinicien peut aussi l'ajouter en probabiliste devant un tableau toxique : « *éruption, choc, atteinte multiviscérale, syndrome septique majeur, clinique ou biologique, ou plus particulièrement évocateurs de toxine de Panton et Valentine : atteinte pulmonaire, atteintes ostéo-articulaires multifocales, abcès important sous-périosté ou association à des collections purulentes des tissus mous* » Extrait du protocole *infection ostéo-articulaire, Erick Grouteau 2009*. Ces deux cas se sont présentés pour notre cohorte. L'antibiothérapie, n'est pas nécessaire pour les folliculites et les furoncles, une antisepsie seule est préconisée. Le choix des molécules en 1^{ère} intention était identique entre les patients de 2009 et ceux de 2014.

La totalité des patients atteints d'infections cutanées a guéri sans complications majeures. Aucun d'entre eux n'a développé d'infection invasive après l'épisode cutané. Pour les infections ostéo-articulaires le constat est différent. Les infections au niveau coxo-fémoral ont induit une destruction importante au niveau de la tête fémorale entraînant de lourdes séquelles motrices. La guérison a été beaucoup plus longue à obtenir pour ces deux patients et ceux-ci doivent consulter régulièrement en orthopédie pour la prise en charge des séquelles sur la marche. Le troisième patient, atteint de spondylodiscite, a guéri sans séquelles par le seul traitement antibiotique. Chez les adultes, ces infections ont tendance à devenir chroniques et sont difficiles à traiter. Nos données concernant le pronostic des infections à *S. aureus* PVL+ rejoignent donc la littérature avec des infections cutanées qui présentent peu de complications et des infections ostéo-articulaires plus sévères, délabrantes qui entraînent des séquelles importantes.

Le suivi des patients dans les infections cutanées montre un taux de rechute important, de l'ordre de 25%. Elles se produisent malgré la prise en charge chirurgicale, les mesures d'antisepsie et l'antibiothérapie. Dans notre cohorte, ces récurrences ne concernaient pas le même site infectieux. Les cavités laissées par les abcès étaient propres et ne se collectaient pas à nouveau cependant les récurrences cutanées siégeaient souvent autour du premier foyer.

Parmi ces rechutes on trouve une grande variété de pathologies généralement bénignes : folliculites, furoncles et impétigo staphylococcique. Seuls deux patients ont eu des complications plus sévères, l'un d'eux a dû être opéré à nouveau pour un abcès différent du premier, l'autre (groupe ostéo-articulaire) a développé une cellulite en regard du premier foyer et une pneumopathie non documentée sur le plan bactériologique.

Il n'y avait qu'une seule infection respiratoire dans le groupe étudié. Cet enfant n'a pas développé de pneumopathie nécrosante grave malgré la présence d'une souche de *S. aureus* PVL+ isolée au niveau respiratoire. Après un drainage au niveau pleural, 11 jours d'antibiothérapie IV et un relai 4j per os, la guérison a pu être obtenue sans complications. Ceci confirme que la présence de la leucocidine de Panton-Valentine n'est pas un facteur suffisant pour déclencher cette entité clinique particulière qu'est la pneumopathie nécrosante. On retrouve dans la littérature la notion de coinfection par Influenzavirus. Les patients, avant d'être admis en réanimation pour leur pneumopathie, présentent des signes grippaux. Il n'est pas rare de retrouver le virus sur les prélèvements respiratoires, le diagnostic clinique est plus difficile à objectiver en raison de la non-spécificité des signes. On ne retrouve pas ce syndrome grippal pour notre patient, celui-ci a d'abord consulté pour otite et gastro-entérite pour laquelle un rotavirus a été retrouvé sur les selles. On peut faire l'hypothèse que l'issue favorable de ce cas s'explique par l'absence du virus influenza au moment de l'épisode infectieux. Un autre patient allait dans le sens de cette observation mais il n'a pas été inclus en raison du manque d'information le concernant. Il s'agissait d'une jeune femme de 17 ans, traitée par codéine (antitussif) qui a été retrouvée décédée chez elle. Les prélèvements post-mortem ont retrouvé un virus influenza B au niveau respiratoire et un *S. aureus* PVL+ dans le liquide pleural et le LCR. Le décès de cette patiente pourrait s'expliquer par ce type de pathologie mais les données disponibles sont insuffisantes pour l'affirmer.

B. Etude de clonalité des souches

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques, on retrouve 21 souches sur 95 compatibles avec le profil du clone européen ST80. Parmi les dossiers de patients que nous avons repris il y a 4 enfants concernés dont un frère et une sœur. Ces quatre enfants sont issus de familles originaires d'Afrique du Nord, deux d'entre eux voyagent régulièrement vers l'Algérie pour l'un, la Tunisie pour l'autre. Les isolats de *S. aureus* appartenant au complexe clonal 80 sont très répandus dans ces deux pays, ils représenteraient près de la moitié des SARM isolés à l'hôpital.¹³⁴ Par conséquent, il se pourrait que ces bactéries soient importées depuis ces pays par portage sur la peau des patients ou de leur entourage. Il existe en plus un biais de sélection par le fait que certains biologistes au laboratoire connaissent ce profil de résistance et vont demander après validation biologique la recherche de la PVL induisant un biais de sélection de ces clones. On constate de manière assez remarquable que, malgré les cas probables d'importation et le biais de sélection induit par les biologistes, le « clone » ST80 reste minoritaire parmi les *S. aureus* PVL+ (22%). De même l'analyse des profils antibiotiques sur la totalité des *Staphylococcus aureus* isolés au laboratoire chaque année montre une prévalence très faible de ces clones. Le taux entre 2009 et 2014 de ces souches est resté stable, le ST80 représente entre 1 et 2% des souches de SARM. Ce résultat contraste nettement avec la situation épidémiologique dans certains pays d'Europe comme la Grèce le ST80 représente désormais la majorité des SARM isolé en communautaire.¹⁵⁷

On peut noter aussi qu'il existait des différences phénotypiques entre les 21 SARM compatibles avec l'antibiotype du ST80. Certaines souches étaient porteuses d'une résistance supplémentaire à l'érythromycine par exemple. Elles étaient en revanche toutes du même sérotype capsulaire (8 le plus fréquent).

L'élément génétique mobile ACME marqueur des clones type USA300 n'a été retrouvé sur aucune de nos souches. Ce complexe clonal est décrit comme le deuxième en termes de fréquence derrière le ST80 en Europe et il exprime très fréquemment la PVL. Ici encore, la situation à Toulouse est très différente puisqu'aucune des souches PVL+ isolées entre 2009 et 2014 ne possède cet élément. Le fait que l'on ne retrouve aucune de ces souches parmi notre collection montre que la prévalence de l'USA300 dans la région doit être très faible.

C. Résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques

Les staphylocoques producteurs de leucocidine de Panton-Valentine sont majoritairement sensibles à la méticilline. Cependant la proportion de SARM sur les souches de notre collection est plus élevée que sur l'ensemble des *S. aureus*. Ce résultat est inattendu compte tenu de l'origine communautaire de ces isolats où ne s'exerce pas la pression de sélection par les antibiotiques. Il ne peut toutefois pas être extrapolé à l'ensemble des SARM communautaires à cause du biais de sélection induit par les biologistes. Seule une étude prospective pourrait montrer quelle est la proportion des SARM sur les souches PVL. Comme les autres staphylocoques, ils expriment quasi-systématiquement une pénicillinase responsable d'une résistance à la pénicilline G et à l'amoxicilline. Le traitement antibiotique de ces infections ne pose pas de problèmes majeurs, ces germes étant majoritairement sensibles à l'association de l'amoxicilline + acide clavulanique qui est couramment utilisée par les médecins aussi bien à l'hôpital qu'en ville. La prévalence des SARM d'origine communautaire étant faible, les recommandations de la HCSP 2009 ne préconisent pas l'utilisation d'une antibiothérapie probabiliste visant un SARM.¹⁴⁷ Cependant, la question se pose tout de même, les SARM représentant près de 38% de notre cohorte. Les recommandations des hôpitaux de Tourcoing¹⁵⁸ et Lyon préconisent l'utilisation de la pristinamycine (Pyostacine®) dans le cadre des anthrax et furoncles compliqués. Cet antibiotique s'administre par voie orale et était sensible sur 100% de nos souches, il constitue donc un choix judicieux en 1^{ère} intention aussi bien en ville qu'à l'hôpital dans cette indication. L'inconvénient majeur de la Pyostacine® est l'absence de forme galénique adaptée à l'usage pédiatrique qui rend son utilisation très difficile chez l'enfant. Il convient de rappeler que les traitements antibiotiques par voie générale ou locale sont réservés au cas compliqués type anthrax, furonculose ou staphylococcie de la face. L'antibiothérapie n'a pas démontré d'efficacité dans les folliculites et furoncles simples.^{159,160} De la même manière, la clindamycine est intéressante, la résistance à cette molécule était très faible (2% de nos souches). Cette sensibilité est cependant à pondérer puisque 19% des souches étaient résistantes à l'érythromycine. Un phénotype de résistance inductible à la clindamycine peut être observé sur ces souches. Sa mise en évidence repose sur l'observation de barres d'induction sur l'antibiogramme réalisé à l'aide de disques sur milieu gélosé. De rares échecs cliniques ont été rapportés par sélection de mutants constitutifs résistants¹⁶¹, l'usage de la clindamycine doit donc être prudent en cas de résistance à l'érythromycine sur l'antibiogramme. Les mesures d'hygiène habituelles sont toujours préconisées notamment le nettoyage de la peau au savon et l'utilisation d'antiseptiques.

Pour les infections récidivantes ou en cas d'infection par un SARM d'origine communautaire, une décontamination par voie locale des gîtes de colonisation par *S. aureus* peut être décidée pour le patient et ses proches. Dans ce cas, la mupirocine (Bactroban®) constitue le traitement de choix. Nous n'avons pas détecté de résistance à cette molécule contrairement à l'acide fusidique où près d'un tiers de nos souches était résistant à cette molécule. Au vu du taux de résistance important, l'utilisation de la Fucidine® en probabliste n'est pas conseillée. Elle peut en revanche être utilisée après identification du germe et antibiogramme, l'acide fusidique faisant partie des molécules testées en routine sur les cartes Vitek2.

Parmi les souches que nous avons étudiées, une seulement était porteuse du gène *qacA/B*. Le gène *qacC* n'a été retrouvé sur aucun de nos isolats. Les protéines encodées par ces gènes sont des pompes d'efflux capables d'augmenter par 2 ou 3 les CMI de *S. aureus* aux antiseptiques de la classe des ammoniums quaternaires, des diamidines et des biguanides.¹⁶² Un travail réalisé au laboratoire de bactériologie du CHU de Toulouse a montré que ces gènes étaient portés par environ 66% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées au service de réanimation pédiatrique. Le fait que l'on ne retrouve pas ces gènes sur les *S. aureus* PVL+ s'explique probablement par leur origine communautaire. Les gènes *qac* sont portés et transmis par des plasmides.

Leur forte prévalence en réanimation pourrait être le résultat d'une pression de sélection exercée par l'exposition importante des bactéries à ces molécules. L'absence de cette pression de sélection en milieu communautaire peut expliquer la très faible prévalence des gènes *qac* parmi nos isolats. Il existe cependant d'autres pompes et mécanismes de résistance susceptibles d'altérer leur efficacité qui n'ont pas tous été recherchés. Mais l'absence des gènes *qac* ainsi que les données retrouvées dans la littérature⁶⁸ vont dans le sens d'une sensibilité de *S. aureus* à ces composés et ne remettent pas leur utilisation en question.

D. Facteurs de virulence associés

La leucocidine de Panton-Valentine est un facteur de virulence particulier qui influe de manière importante sur la physiopathologie de l'infection staphylococcique. *Staphylococcus aureus* exprime un grand nombre de ces facteurs, la plupart ont un support chromosomique et sont portés par la quasi-totalité des souches. Certains de ces facteurs comme la PVL sont retrouvés sur une proportion faible des isolats et peuvent donc conférer aux bactéries qui les possèdent un avantage sélectif au sein de leur écosystème. C'est en partant de cette hypothèse que le gène *sasX* et la protéine qu'il encode ont été mis en évidence. Cette protéine a été identifiée comme le déterminant majeur d'une vague épidémique de *S. aureus* qui sévit actuellement en Chine. Elle possède de très nombreux rôles comme vu précédemment. Ce facteur n'avait jamais été recherché sur des souches européennes. L'analyse par PCR utilisant les mêmes amorces que celles décrite par Li et al¹¹⁵ a montré que ce facteur est absent de nos isolats. Ce résultat va dans le sens de la diversité génétique des souches et de l'absence d'un clone dominant de SARM ou SASM se propageant sur un mode épidémique en France. Il serait nécessaire de compléter cette recherche par l'analyse du génome de souches de *S. aureus* PVL+ par séquençage. En effet, on sait que *S. aureus* peut exprimer plus de 21 protéines LPXTG¹¹² (dont fait partie la famille Sas), les souches européennes pourraient posséder un autre variant au sein de cette famille différent de *sasX*.

Au vu du rôle des protéines Sas dans la colonisation de l'épithélium nasal, cette recherche pourrait être effectuée au niveau des souches isolées dans les prélèvements de fosses nasales.

Un autre facteur de virulence important chez *S. aureus* est sa capsule polysaccharidique qui possède de nombreuses propriétés notamment celle de conférer une résistance à la phagocytose. Ce mécanisme s'ajoute à l'action de la leucocidine qui est capable de lyser les polynucléaires humains. Cette résistance à l'action des polynucléaires a une implication physiopathologique importante dans les infections invasives. Sur des modèles animaux, elle se traduit par des bactériémies plus élevées et persistantes surtout avec le sérotype 5. La seule infection invasive de notre cohorte (pleuropneumopathie) concernait une souche de type 5. La présence d'une capsule n'est pas toujours associée à une augmentation du pouvoir pathogène. Elle peut masquer les adhésines et les empêcher de jouer leur rôle dans la colonisation du site infectieux notamment au niveau vasculaire où les forces de cisaillement sont importantes. La majorité des souches que nous avons testées sont capsulées, on ne retrouve pas d'endocardite ni d'hémocultures positives à *S. aureus* PVL+. Dans les infections cutanées, il n'y avait pas d'association statistique significative entre la profondeur, la multiplicité des lésions, la récurrence et le sérotype capsulaire. De plus, l'appartenance d'une souche à un sérotype en particulier était indépendante du statut PVL.

Les pourcentages observés dans notre collection de staphylocoques PVL+ ne diffèrent pas de ceux décrits dans la littérature pour l'ensemble des staphylocoques dorés à savoir environ 50% de sérotype 8, 25% de sérotype 5 et 25% non groupable ou non capsulé. Cette répartition parmi les *S. aureus* PVL+ est un argument supplémentaire en faveur de la diversité génétique des souches productrices de leucocidine.

E. Caractère chronique de ces infections

Les infections cutanées à *S. aureus* PVL+ sont connues pour leur caractère récurrent. Cette particularité est bien documentée dans les études cliniques. Si les études épidémiologiques ont permis de mettre ce caractère en évidence, il restait à expliquer le rôle physiopathologique de la PVL dans ce contexte. Début 2014, un modèle In Vitro a été proposé par Chia-Yu Chi et son équipe. L'auteur montre comment la PVL permet à la bactérie d'échapper à l'action des endosomes par les kératinocytes⁴⁰. Ce phénomène est à mettre en relation avec l'activation du système agr qui est possible y compris pour une bactérie unique si celle-ci est enfermée dans un milieu confiné¹¹⁸. Au sein de notre cohorte, 5 patients ont eu une infection documentée à *S. aureus* avant leur admission où la PVL a été retrouvée, 7 ont récidivé dans les 6 mois qui ont suivi la prise en charge. Parmi ces 7 patients, 5 avaient bénéficié d'une prise en charge chirurgicale et d'une antibiothérapie adaptée. Ces données montrent la capacité de la bactérie à persister malgré une prise en charge adaptée.

Le biofilm est un facteur majeur de chronicité dans les ostéomyélites, les infections sur matériel et les plaies diabétiques. Près de 65% de nos souches étaient capables d'en produire In Vitro. On ne retrouve pas dans la littérature, une association forte entre la production du biofilm chez *S. aureus* et la formation de furoncles et d'abcès sous-cutanés. Le constat est différent pour d'autres pathologies cutanées comme la dermatite atopique, l'acné ou les pemphigus. Le biofilm serait à l'origine d'une élévation importante des CMI qui entraîne la persistance de la bactérie au sein des structures cutanées malgré une antibiothérapie théoriquement efficace.¹⁶³

Deux de nos patients étaient porteurs de lésions cutanées chroniques importantes à l'origine de surinfections staphylococciques. Les souches isolées de ces lésions étaient capables de produire du biofilm, il est donc probable que celui-ci joue un rôle dans la récurrence des infections chez ces patients.

Notre cohorte comportait aussi deux ostéo-arthrites septiques sévères et une spondylodiscite. La littérature sur le rôle du biofilm dans ce type d'infection est beaucoup plus abondante. Le tissu osseux nécrosé offre un support idéal à l'adhésion bactérienne et au développement du biofilm. Ce dernier limite la diffusion des antibiotiques et permet aux bactéries situées dans les couches les plus profondes de survivre entraînant la persistance du foyer infectieux. La souche responsable de la spondylodiscite de notre cohorte ne produisait pas de biofilm ce qui pourrait expliquer en partie la guérison « rapide » sous Orbénine® du patient. En revanche pour les deux ostéo-arthrites, les souches étaient productrices de biofilm. L'élimination du foyer infectieux a nécessité une intervention chirurgicale, l'utilisation des différentes lignes d'antibiothérapie s'étant soldée par un échec. Ces évolutions peuvent aussi être mises sur le compte de la résistance antibiotique.

En effet, la souche du patient atteint de spondylodiscite était sensible à la méticilline alors que pour les ostéo-arthrites les isolats étaient des SARM. Ce profil de résistance a fait qu'il n'a pas été possible d'utiliser les bêta-lactamines dans ces cas. Les deux patients atteints d'ostéo-arthrites ont été pris en charge plus tardivement que la spondylodiscite. Il s'est écoulé un mois entre le début des signes et l'hospitalisation pour le premier, 11 mois pour le deuxième. Ces infections étaient déjà très avancées avec des destructions tissulaires importantes contrairement à la spondylodiscite qui a été prise en charge 11 jours après l'apparition des premiers signes cliniques. Dans ce contexte, il est difficile d'évaluer la contribution respective de la PVL et du biofilm pour ce type d'infection surtout avec un effectif limité.

Conclusion

La leucocidine de Panton-Valentine et son effet sur les polynucléaires sont connus depuis maintenant plus d'un siècle. Pourtant son mécanisme d'action et son implication en physiopathologie humaine restent l'objet d'un débat au sein de la communauté scientifique. Certaines découvertes récentes notamment le ligand de la toxine et son rôle au niveau cutané apportent des éléments de réponse sur le rôle de la PVL. La pneumopathie nécrosante, entité clinique très rare, reste mystérieuse. Le fait que la présence d'un *Staphylococcus aureus* producteur de leucocidine au niveau pulmonaire ne soit pas suffisante pour induire cette pathologie suggère l'association avec d'autres facteurs de pathogénicité. La coinfection avec un Influenzavirus est une des hypothèses les plus sérieuses à ce sujet.

Les infections cutanées restent très largement majoritaires, leur présentation clinique est peu spécifique. Les signes généraux comme la fièvre et l'érythème manquent souvent, seule la récurrence de l'infection chez un patient jeune sans comorbidités associées peut servir de point d'appel au clinicien pour lancer la recherche de la PVL. L'intérêt de cette recherche étant l'adjonction de la Dalacine® au traitement antibiotique. L'analyse des dossiers cliniques au sein de notre cohorte a montré que, seul, le traitement antibiotique est généralement insuffisant pour obtenir la guérison. Les infections cutanées à *S. aureus* PVL+ sont marquées par un recours nécessaire à la chirurgie. L'analyse des profils de résistance aux antibiotiques des souches PVL+ a montré une grande sensibilité de ces souches à la pristinamycine (Pyostacine®) qui peut être intéressante par rapport à l'association amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®) classiquement utilisée. Environ un tiers des souches est, en effet, résistant à l'Augmentin®. La décontamination doit utiliser la mupirocine pour laquelle aucune résistance n'a été retrouvée plutôt que l'acide fusidique inefficace dans un tiers des cas.

Sur le plan épidémiologique, ces staphylocoques ne semblent pas caractérisés par un profil génotypique particulier. Ils sont majoritairement sensibles à la méticilline et ne résistent pas aux antiseptiques. Parmi les SARM, nous avons retrouvé une proportion importante du « clone » communautaire européen ST80. Une fraction de ces souches semble être importée depuis l'étranger notamment les pays du Maghreb. La prévalence globale de ces « clones » en France est très faible. L'ACME, caractéristique des souches USA300 n'a pas été retrouvé. Les souches PVL+ en France semblent présenter une grande diversité génétique. Notre étude n'a pas mis en évidence de complexe clonal dominant se propageant sur un mode épidémique comme décrit aux Etats-Unis ou en Chine.

La recherche de la PVL est encore aléatoire par manque de critères cliniques formels pour suspecter sa présence. Le laboratoire dispose d'une technique rapide et fiable pour la mettre en évidence et l'antibiothérapie peut être adaptée par ajout de la Dalacine®. Il serait intéressant de réaliser une étude prospective incluant tous les patients en pédiatrie atteints d'infections cutanées à *S. aureus* afin de mettre en évidence les critères cliniques caractéristiques de la PVL, l'intérêt d'ajouter la Dalacine® et d'étudier l'impact pronostic sur les patients notamment par rapport à la récurrence.

Bibliographie

- 1 Denys J, Van de Velde H. Sur la production d'une leucocidine chez les lapins vaccinés contre le staphylocoque pyogène. *La Cellule* 1895.
- 2 Neisser M, Wechsberg F. Ueber das Staphylotoxin. *Z Für Hyg Infekt* 1901; **36**: 299–349.
- 3 Krauss R, Clairmont P. Ueber Hamolysine und Antihamolysine. *Wien Klin Wchnschr* 1900; : 49–56.
- 4 Julianelle LA. Studies of hemolytic staphylococci Hemolytic activity—biochemical reactions—serologic reactions. *J Infect Dis* 1922; **31**: 256–84.
- 5 Panton P, Valentine F. Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932.
- 6 Lina G, Vandenesch F, Etienne J. A brief history of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leucocidin. *Antimicrob Ther Vaccines Microbes* 2006; **1**. <http://www.antimicrobe.org/history/PVL-long.asp> (accessed Feb 11, 2014).
- 7 Gladstone GP, Van Heyningen WE. Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol* 1957; **38**: 123.
- 8 Woodin AM. Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 1960; **75**: 158–65.
- 9 Loeffler DA, Schat KA, Norcross NL. Use of ⁵¹Cr release to measure the cytotoxic effects of staphylococcal leucocidin and toxin neutralization on bovine leukocytes. *J Clin Microbiol* 1986; **23**: 416–20.
- 10 Finck-Barbançon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA. Pore formation by a two-component leucocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1182**: 275–82.
- 11 Rahman A, Nariya H, Izaki K, Kato I, Kamio Y. Molecular cloning and nucleotide sequence of leucocidin F-component gene (lukF) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **184**: 640–6.
- 12 Rahman A, Izaki K, Kato I, Kamio Y. Nucleotide sequence of leucocidin S-component gene (lukS) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 138–44.
- 13 Prevost G, Couppie P, Prevost P, et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 1995; **42**: 237–45.
- 14 Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002; **359**: 753–9.
- 15 Voyich JM, Otto M, Mathema B, et al. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis* 2006; **194**: 1761–70.
- 16 Uchida T, Gill DM, Pappenheimer AM Jr. Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage. *Nature New Biol* 1971; **233**: 8–11.
- 17 Johnson LP, Tomai MA, Schlievert PM. Bacteriophage involvement in group A streptococcal pyrogenic exotoxin A production. *J Bacteriol* 1986; **166**: 623–7.
- 18 Inoue K, Iida H. Conversion of Toxigenicity in *Clostridium botulinum* Type C. *Jpn J Microbiol* 1970; **14**: 87–9.
- 19 Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 1996; **272**: 1910–4.
- 20 Van der Vijver JCM, van Es-Boon M, Michel MF. Lysogenic Conversion in *Staphylococcus aureus* to Leucocidin Production. *J Virol* 1972; **10**: 318–9.
- 21 Ma XX, Ito T, Kondo Y, et al. Two different Panton-Valentine leukocidin phage lineages predominate in Japan. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 3246–58.
- 22 Dublanquet A. Des virus pour combattre les infections: la phagothérapie: renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Lausanne: Favre, 2009.
- 23 Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leucocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 2013; **13**: 584–94.

- 24 Miles G, Movileanu L, Bayley H. Subunit composition of a bicomponent toxin: Staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2002; **11**: 894–902.
- 25 Jayasinghe L, Bayley H. The leukocidin pore: Evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2005; **14**: 2550–61.
- 26 Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA. Flow cytometric determination of Panton-Valentine leukocidin S component binding. *Infect Immun* 2001; **69**: 2390–5.
- 27 Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012; **2**: 12.
- 28 Genestier A-L, Michallet M-C, Prevost G, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3117–27.
- 29 Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2384–90.
- 30 Shallcross LJ, Williams K, Hopkins S, Aldridge RW, Johnson AM, Hayward AC. Panton-Valentine leukocidin associated staphylococcal disease: a cross-sectional study at a London hospital, England. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2010; **16**: 1644–8.
- 31 Mesrati I, Saïdani M, Ennigrou S, Zouari B, Ben Redjeb S. Clinical isolates of Pantone-Valentine leukocidin- and gamma-haemolysin-producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. *J Hosp Infect* 2010; **75**: 265–8.
- 32 Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010; **10**: 227–39.
- 33 Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1999; **29**: 1128–32.
- 34 Tong A, Tong SYC, Zhang Y, et al. Panton-Valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome for *Staphylococcus aureus* skin infections: evaluation from the CANVAS studies. *PLoS One* 2012; **7**: e37212.
- 35 Waldenburger S, Vogel U, Goebeler M, Kolb-Mäurer A. Community-acquired skin infections caused by *Staphylococcus aureus*: What is the role of the Panton-Valentine leukocidin toxin? *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG* 2014; **12**: 59–66.
- 36 Bae I-G, Tonthat GT, Stryjewski ME, et al. Presence of genes encoding the panton-valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3952–7.
- 37 Couppie P, Cribier B, Prévost G, Grosshans E, Piémont Y. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: An epidemiologic study. *Arch Dermatol* 1994; **130**: 1208–9.
- 38 Cribier B, Prévost G, Couppie P, Finck-Barbançon V, Grosshans E, Piémont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatol Basel Switz* 1992; **185**: 175–80.
- 39 Yu F, Liu Y, Xu Y, et al. Expression of Panton-Valentine Leukocidin mRNA among *Staphylococcus aureus* Isolates Associates with Specific Clinical Presentations. *PLoS One* 2013; **8**: e83368.
- 40 Chi C-Y, Lin C-C, Liao I-C, et al. Panton-Valentine Leukocidin Facilitates the Escape of *Staphylococcus aureus* From Human Keratinocyte Endosomes and Induces Apoptosis. *J Infect Dis* 2013; **209**: 224–35.
- 41 Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, et al. Panton-Valentine Leukocidin Does Play a Role in the Early Stage of *Staphylococcus aureus* Skin Infections: A Rabbit Model. *PLoS ONE* 2011; **6**. DOI:10.1371/journal.pone.0022864.
- 42 Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* 2011; **204**: 937–41.

- 43 König B, Prévost G, Piémont Y, König W. Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J Infect Dis* 1995; **171**: 607–13.
- 44 Diep BA, Chan L, Tattevin P, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 5587–92.
- 45 Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 751–62.
- 46 Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 2006; **368**: 874–85.
- 47 Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy M-É, Tristan A, Vandenesch F. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*: Les points-clés en 2010. *médecine/sciences* 2010; **26**: 943–9.
- 48 Bloemendaal ALA, Brouwer EC, Fluit AC. Methicillin Resistance Transfer from *Staphylococcus epidermidis* to Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in a Patient during Antibiotic Therapy. *PLoS ONE* 2010; **5**: e11841.
- 49 Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; **350**: 1670–3.
- 50 Chen H, Liu Y, Zhao C, et al. Comparative proteomics-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in clinically derived heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *PLoS One* 2013; **8**: e66880.
- 51 Cattoir V, Leclercq R. [Enterococci resistant to glycopeptides]. *Médecine Sci MS* 2010; **26**: 936–42.
- 52 Pfeltz RF, Wilkinson BJ. The escalating challenge of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2004; **4**: 273–94.
- 53 Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, et al. Emergence of resistance to daptomycin in a cohort of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persistent bacteraemia treated with daptomycin. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 568–71.
- 54 Feßler AT, Calvo N, Gutiérrez N, et al. Cfr-mediated linezolid resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with clinical infections in humans: two case reports. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 268–70.
- 55 Johnston LH, Dyke KGH. Ethidium bromide resistance, a new marker on the staphylococcal penicillinase plasmid. *J Bacteriol* 1969; **100**: 1413.
- 56 Jones I g., Midgley M. Expression of a plasmid borne ethidium resistance determinant from *Staphylococcus* in *Escherichia coli*: Evidence for an efflux system. *FEMS Microbiol Lett* 1985; **28**: 355–8.
- 57 Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005; **99**: 703–15.
- 58 Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist Larchmt N* 2010; **16**: 91–104.
- 59 Doléans-Jordheim A, Michalet S, Bergeron E, et al. Les phénomènes de résistance aux antibiotiques liés aux pompes à efflux: exemple de *Staphylococcus aureus*. In: *Annales de Biologie Clinique*. 2008: 499–508.
- 60 Lyon BR, May JW, Skurray RA. Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet MGG* 1984; **193**: 554–6.
- 61 Gillespie MT, Lyon BR, Skurray RA. Gentamicin and antiseptic resistance in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 1989; **1**: 503.
- 62 Rouch DA, Messerotti LJ, Loo LS, Jackson CA, Skurray RA. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol Microbiol* 1989; **3**: 161–75.
- 63 Gillespie MT, Skurray RA. Plasmids in multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Sci* 1986; **3**: 53–8.

- 64 Heir E, Sundheim G, Holck AL. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J Appl Microbiol* 1999; **86**: 378–88.
- 65 Heir E, Sundheim G, Holck AL. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **163**: 49–56.
- 66 Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E. Novel plasmid-borne gene *qacI* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3046–52.
- 67 Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn TG, Mitchell BA, Skurray RA. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 3630–5.
- 68 Cookson BD, Bolton MC, Platt JH. Chlorhexidine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or just an elevated MIC? An in vitro and in vivo assessment. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1997–2002.
- 69 Grunert T, Wenning M, Barbagelata MS, *et al.* Rapid and Reliable Identification of *Staphylococcus aureus* Capsular Serotypes by Means of Artificial Neural Network-Assisted Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 2261–6.
- 70 O’Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**: 218–34.
- 71 Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, Robbins JB. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; **2**: 85–91.
- 72 Von Eiff C, Taylor KL, Mellmann A, *et al.* Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **58**: 297–302.
- 73 Cocchiari JL, Gomez MI, Risley A, Solinga R, Sordelli DO, Lee JC. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2006; **59**: 948–60.
- 74 Poutrel B, Rainard P, Sarradin P. Heterogeneity of cell-associated CP5 expression on *Staphylococcus aureus* strains demonstrated by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; **4**: 275–8.
- 75 Cunnion KM, Lee JC, Frank MM. Capsule Production and Growth Phase Influence Binding of Complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2001; **69**: 6796–803.
- 76 Dassy B, Fournier JM. Respiratory activity is essential for post-exponential-phase production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1996; **64**: 2408–14.
- 77 Luong T. Regulation of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Expression by *agr* and *sarA*. *Infect Immun* 2002; **70**: 444–50.
- 78 Herbert S, Worlitzsch D, Dassy B, *et al.* Regulation of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Type 5: CO₂ Inhibition In Vitro and In Vivo. *J Infect Dis* 1997; **176**: 431–8.
- 79 Herbert S, Newell SW, Lee C, *et al.* Regulation of *Staphylococcus aureus* Type 5 and Type 8 Capsular Polysaccharides by CO₂. *J Bacteriol* 2001; **183**: 4609–13.
- 80 Lee JC, Takeda S, Livolsi PJ, Paoletti LC. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1993; **61**: 1853–8.
- 81 Sau S, Sun J, Lee CY. Molecular characterization and transcriptional analysis of type 8 capsule genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 1614–21.
- 82 Meier S, Goerke C, Wolz C, *et al.* σ B and the σ B-Dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* Loci Affect Capsule Formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2007; **75**: 4562–71.
- 83 Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A, Nicholson-Weller A, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Strains That Express Serotype 5 or Serotype 8 Capsular Polysaccharides Differ in Virulence. *Infect Immun* 2005; **73**: 3502–11.
- 84 Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann WF. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1988; **56**: 1090–5.

- 85 Cunnion KM, Zhang H-M, Frank MM. Availability of Complement Bound to *Staphylococcus aureus* To Interact with Membrane Complement Receptors Influences Efficiency of Phagocytosis. *Infect Immun* 2003; **71**: 656–62.
- 86 Kuypers JM, Proctor RA. Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1989; **57**: 2306–12.
- 87 Fattom A, Schneerson R, Watson DC, *et al.* Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A. *Infect Immun* 1993; **61**: 1023–32.
- 88 Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 2002; **4**: 481–9.
- 89 Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, *et al.* Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; **65**: 127–45.
- 90 Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2011; **2**: 445–59.
- 91 Le Magrex E, Brisset L, Jacquelin LF, Carquin J, Bonnaveiro N, Choisy C. Susceptibility to antibacterials and compared metabolism of suspended bacteria versus embedded bacteria in biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1994; **2**: 89–95.
- 92 Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999; **11**: 217–21.
- 93 Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; **322**: 207–28.
- 94 Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* 2010; **89**: 103–11.
- 95 Darby C, Hsu JW, Ghori N, Falkow S. *Caenorhabditis elegans*: Plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* 2002; **417**: 243–4.
- 96 Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, *et al.* A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 2004; **279**: 54881–6.
- 97 Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; **69**: 4079–85.
- 98 Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, *et al.* The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* 2007; **65**: 1276–87.
- 99 Cue D, Lei MG, Luong TT, *et al.* Rbf Promotes Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* via Repression of icaR, a Negative Regulator of icaADBC. *J Bacteriol* 2009; **191**: 6363–73.
- 100 Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 2007; **28**: 1711–20.
- 101 Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; **295**: 1487.
- 102 Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **168**: 918–51.
- 103 Eckhart L, Fischer H, Barken K b., Tolker-Nielsen T, Tschachler E. DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 1342–5.
- 104 Davey ME, Caiazza NC, O’Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 2003; **185**: 1027–36.
- 105 Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *The Lancet* 2004; **364**: 369–79.
- 106 Ziran BH. Osteomyelitis. *J Trauma* 2007; **62**: S59–60.

- 107 Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, *et al.* Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988; **158**: 693–701.
- 108 Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006; **3**: 225–31.
- 109 Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D, *et al.* Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2010; **16**: 767–73.
- 110 Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. An Inflammatory Polypeptide Complex from *Staphylococcus epidermidis*: Isolation and Characterization. *J Exp Med* 1999; **189**: 907–18.
- 111 Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol* 2013; **11**: 667–73.
- 112 Roche FM. Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* 2003; **149**: 643–54.
- 113 Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2001; **40**: 1049–57.
- 114 Holden MTG, Lindsay JA, Corton C, *et al.* Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J Bacteriol* 2010; **192**: 888–92.
- 115 Li M, Du X, Villaruz AE, *et al.* MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med* 2012; **18**: 816–9.
- 116 Kong K-F, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol IJMM* 2006; **296**: 133–9.
- 117 Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; **176**: 269–75.
- 118 Carnes EC, Lopez DM, Donegan NP, *et al.* Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol* 2010; **6**: 41–5.
- 119 Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agr. *Mol Gen Genet MGG* 1986; **202**: 58–61.
- 120 Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator agr system. *Peptides* 2001; **22**: 1603–8.
- 121 Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, *et al.* *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* 2007; **21**: 1353–66.
- 122 Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 1995; **14**: 4569–77.
- 123 Geisinger E, Adhikari RP, Jin R, Ross HF, Novick RP. Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol Microbiol* 2006; **61**: 1038–48.
- 124 Mayville P, Ji G, Beavis R, *et al.* Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 1218–23.
- 125 Papakyriacou H, Vaz D, Simor A, Louie M, McGavin MJ. Molecular analysis of the accessory gene regulator (agr) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2000; **181**: 990–1000.
- 126 Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2000; **182**: 1688–93.
- 127 Giraud AT, Cheung AL, Nagel R. The sae locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol* 1997; **168**: 53–8.
- 128 Giraud AT, Mansilla C, Chan A, Raspanti C, Nagel R. Studies on the expression of regulatory

- locus sae in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2003; **46**: 246–50.
- 129 Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1620–5.
- 130 Walker JN, Crosby HA, Spaulding AR, *et al*. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis. *PLoS Pathog* 2013; **9**: e1003819.
- 131 Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 1113–23.
- 132 O'Hara FP, Amrine-Madsen H, Mera RM, *et al*. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* in the United States 2004–2008 Reveals the Rapid Expansion of USA300 Among Inpatients and Outpatients. *Microb Drug Resist* 2012; **18**: 555–61.
- 133 Robert J, Etienne J, Bertrand X, ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Pantón–Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000–2003. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 585–7.
- 134 Robert J, Tristan A, Cavalié L, *et al*. Pantón-Valentine Leukocidin-Positive and Toxic Shock Syndrome Toxin 1-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a French Multicenter Prospective Study in 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1734–9.
- 135 Carré N. Épidémie d'infections cutanées à *Staphylococcus aureus* porteur des gènes codant la leucocidine de Pantón-Valentine en milieu scolaire et familial, Val-d'Oise, 2006-2008. InVS, 2010.
- 136 Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Pantón-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 43–54.
- 137 Couppie P, Cribier B, Prévost G, Grosshans E, Piémont Y. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: An epidemiologic study. *Arch Dermatol* 1994; **130**: 1208–9.
- 138 Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, *et al*. Pantón-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Strains Are Associated with Follicular Skin Infections. *Dermatology* 2011; **222**: 167–70.
- 139 Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, *et al*. The Association between *Staphylococcus aureus* Strains Carrying Pantón-Valentine Leukocidin Genes and the Development of Deep-Seated Follicular Infection. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 381–5.
- 140 Del Giudice P, Blanc V, Durupt F, *et al*. Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections. *Br J Dermatol* 2006; **154**: 118–24.
- 141 Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2000; **21**: 510–5.
- 142 Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, *et al*. *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science* 2007; **315**: 1130–3.
- 143 Dohin B, Gillet Y, Kohler R, *et al*. Pediatric Bone and Joint Infections Caused by Pantón-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus*. *J Novemb 2007* 2007; **26**: 1042–8.
- 144 Martínez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, Hammerman W, Mason EO Jr, Kaplan SL. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2004; **23**: 701–6.
- 145 Badiou C, Dumitrescu O, George N, *et al*. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leukocidin in Clinical Specimens by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Tests. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1384–90.
- 146 Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, *et al*. *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1000715.
- 147 Groupe de travail HCSP. Recommandations sur la prise en charge et la prévention des infections cutanées liées aux souches de *Staphylococcus*

- aureus* résistants à la méticilline communautaires (SARM co). HCSP, 2009.
- 148 Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, *et al.* Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2008; **14**: 384–8.
- 149 Shukla SK, Karow ME, Brady JM, *et al.* Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 3582–92.
- 150 Funke G, Funke-Kissling P. Performance of the New VITEK 2 GP Card for Identification of Medically Relevant Gram-Positive Cocci in a Routine Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 84–8.
- 151 Ellington MJ, Yearwood L, Ganner M, East C, Kearns AM. Distribution of the ACME-*arcA* gene among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2007; **61**: 73–7.
- 152 Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, *et al.* Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 678–84.
- 153 Sheng W-H, Wang J-T, Lauderdale T-L, Weng C-M, Chen D, Chang S-C. Epidemiology and susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: emphasis on chlorhexidine susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **63**: 309–13.
- 154 Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011; **15**: 305–11.
- 155 Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* 2007; **68**: 605–12.
- 156 Grouteau E. Prise en charge des infection ostéo-articulaires chez l'enfant. Document interne Hôpital des Enfants 2009.
- 157 Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, *et al.* A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2014; published online March 19. DOI:10.1111/1469-0691.12624.
- 158 Commission des anti-infectieux. antibiothérapie curative 2014 protocoles & fiches techniques (version 8). 2014.
- 159 Auteurs et membres du Collège des enseignants en dermatologie de France. *Ann Dermatol Vénérologie* 2008; **135**: F5–6.
- 160 Philippe PPB, Bénédicte RDL-V, Nathalie PDD, *et al.* Prescription des antibiotiques par voie locale dans les infections cutanées bactériennes primitives et secondaires. *Médecine Thérapeutique* 2004; **10**: 365–8.
- 161 Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie. Recommandations du CASFM 2014.
- 162 Jansen AC. An Investigation of Resistance to Quaternary Ammonium Compound Disinfectants in Bacteria. 2012.
- 163 Nusbaum AG, Kirsner RS, Charles CA. Biofilms in dermatology. *Skin Ther Lett* 2012; **17**: 1–5.

Liste des figures

Figure 1 :	Mécanisme de recombinaison permettant l'insertion des gènes phagiques codant la PVL dans le génome bactérien	12
Figure 2 :	Structure de Φ Sa2958	12
Figure 3 :	Représentation tridimensionnelle de la structure tertiaire des sous-unités LukF-PV et LukS-PV déterminée par cristallographie	13
Figure 4 :	Modèle du pore formé par la leucocidine de Panton-Valentine.....	14
Figure 5 :	Séquence d'assemblage de la leucocidine de <i>S. aureus</i>	14
Figure 6 :	Déclenchement de l'apoptose par la toxine PVL.....	15
Figure 7 :	Hypothèse physiopathologique In Vitro proposée pour les infections cutanées à <i>S. aureus</i> PVL+.	16
Figure 8 :	Hypothèse physiopathologique In Vitro. Mécanisme indirect de toxicité de la PVL par lyse des polynucléaires et relargage de médiateurs.	18
Figure 9 :	Modèle physiopathologique chez le lapin des pneumopathies nécrosantes associées à <i>S. aureus</i> sécréteur de leucocidine de Panton-Valentine.	19
Figure 10 :	Modèle du mécanisme d'action des antiseptiques de la famille des ammoniums quaternaires.	23
Figure 11 :	Représentation de la structure primaire et secondaire de QacA. Ce schéma est transposable pour QacB.	26
Figure 12 :	Représentation de la structure primaire et secondaire de QacC/D.....	27
Figure 13 :	Photos en microscopie électronique à transmission d'une souche de <i>S. aureus</i> capsulée et d'un mutant non capsulé.	28
Figure 14 :	Comparaison des deux groupes de gènes encodant les enzymes nécessaires à la production de cap5 et cap8.....	30
Figure 15 :	Photographie en microscopie électronique à balayage de la surface d'un implant	33
Figure 16 :	Structure moléculaire du PIA.	34
Figure 17 :	Schéma décrivant les différentes phases de formation du biofilm bactérien de la colonisation à la dissémination.	36
Figure 18 :	Structure du PSM α 3	38
Figure 19 :	Fonctions des PSMs.....	39
Figure 20 :	Fonctionnement du système agr chez <i>S. aureus</i>	42
Figure 21 :	Structure secondaire prédite et conservation du transcrit RNAIII.....	43
Figure 22 :	Les différents types d'AIPs et groupes d'inhibition croisée	44

Figure 23 : Graphique montrant la répartition des différents complexes clonaux de <i>S. aureus</i> aux USA et la prévalence de la leucocidine de Panton-Valentine.	47
Figure 24 : Profil caractéristique de résistance du clone européen ST80.....	49
Figure 25 : Pyramide clinique des infections associées à la toxine de Panton-Valentine.....	50
Figure 26 : Courbes de survie des patients en fonction du génotype des souches isolées du tractus respiratoire.	52
Figure 27 : Recommandations ANSM juillet 2010.....	55
Figure 28 : Schématisation de la bandelette du kit GenoType® MRSA de Hain Lifescience.....	59
Figure 29 : Répartition des patients par tranche d'âge et par sexe.....	69
Figure 30 : Prise en charge initiale des patients.....	70
Figure 31 : Localisations des infections dans notre cohorte.	73
Figure 32 : Délai entre l'apparition des premiers signes et l'admission à l'hôpital.	74
Figure 33 : Diagramme de Tuckey représentant les valeurs absolues dans le sang des leucocytes et des polynucléaires neutrophiles à l'admission.....	74
Figure 34 : Diagramme de Tuckey représentant les valeurs CRP sanguine à l'admission.	75
Figure 35 : Prise en charge des infections de la peau et des tissus mous au CHU.....	76
Figure 36 : Evolution de la prévalence de la résistance à la méticilline de 2009 à 2014 au CHU de Toulouse.	80
Figure 37 : Proportion de souches dont le profil phénotypique correspond au clone européen ST80.	81
Figure 38 : Proportion de souches PVL+ résistantes aux différentes classes d'antibiotiques.	82
Figure 39 : Valeurs de DO obtenues par la méthode de coloration au cristal violet pour chacune des souches.....	85

Liste des tableaux

Tableau I :	Les différents types de SSCmec.....	21
Tableau II :	Classes d'antiseptiques et spectre d'activité.	22
Tableau III :	Synthèse des différentes classes de pompes d'efflux et de leurs substrats.	24
Tableau IV :	Résultats de l'étude de Gilles Prévost sur la prévalence des toxines synergohyménotropes au sein de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Tableau V :	Résultats de l'étude de Pascal Del Giudice et son équipe sur des patients porteurs d'infections cutanées à <i>S. aureus</i>	51
Tableau VI :	Diagnostic des infections liées au <i>S. aureus</i> PVL+ isolé.....	70
Tableau VII :	Causes de réajustement de l'antibiothérapie initiale et molécules utilisées.	77
Tableau VIII :	Antibiothérapies utilisées pour les patients du groupe ostéo-articulaire	78
Tableau IX :	Profils de résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> isolés entre 2009 et 2014 au CHU de Toulouse.....	80
Tableau X :	Répartition des sérotypes capsulaires chez les souches de <i>S. aureus</i> PVL+	83
Tableau XI :	Répartition des sérotypes capsulaires pour les patients de pédiatrie.....	83
Tableau XII :	Nombre de souche par groupe de production de biofilm.	86
Tableau XIII :	Relation entre production de biofilm, récurrence et profondeur des lésions.....	86

Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolées au CHU de Toulouse. Analyse des 37 cas de patients à l'hôpital des enfants.

Résumé

La leucocidine de Panton-Valentine (PVL) est une cytotoxine capable de lyser les polynucléaires et d'induire une nécrose tissulaire. Elle est produite par moins de 5% des isolats de *Staphylococcus aureus* en France. L'objet de notre étude est une collection de 95 souches porteuses des gènes codant la PVL constituée de 2009 à 2014. Pour toutes les souches, nous avons déterminé le profil de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques (recherche des gènes *qacA/B* et *qacC* par PCR). Différents facteurs de virulence ont été recherchés par PCR : gène *sasX*, gène *arcA* de l'ACME et les gènes de capsule. La capacité à produire du biofilm a été étudiée par coloration au cristal violet. Les souches de notre collection étaient majoritairement sensibles (62% sensibles à la méticilline, 68% à l'acide fusidique, 88% aux quinolones, 95% à la gentamicine et 98% aux lincosamides). Une seule souche portait le gène *qacA/B*, aucune n'avait *qacC*. Parmi les marqueurs étudiés, seuls les loci *cap5* et *cap8* ont été détectés dans 23% et 61% des isolats respectivement. La capacité à former un biofilm était très variable. Les 37 dossiers pédiatriques analysés correspondent majoritairement à des infections cutanées (89%) marquées par un recours nécessaire à la chirurgie et un taux de récurrence important (25%). En conclusion, les souches productrices de leucocidine de Panton-Valentine de notre collection présentent une grande diversité génétique et sont majoritairement sensibles aux antibiotiques et aux antiseptiques.

Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine toxin-producing strains isolated at the University Hospital of Toulouse. Study of 37 patient cases at Children's Hospital.

Abstract

Panton-Valentine Leukocidin (PVL) is a cytotoxin capable of lysing polynuclear cells and inducing tissue necrosis. In France, this toxin is produced by less than 5% of the *Staphylococcus aureus* isolates. The purpose of our study is a collection of 95 strains carrying PVL-encoding genes made from 2009 to 2014. For all strains, we determined the pattern of resistance to antibiotics and antiseptics (detection of *qacA/B* and *qacC* genes by PCR). Different virulence factors were searched by PCR : *sasX* gene, *arcA* gene (ACME) and capsule genes ; biofilm-production ability was assessed by crystal violet staining. Our PVL+ strains were mostly sensitive (62% methicillin-sensitive, 68% to fusidic acid, 88% to quinolones, 95% to gentamicin and 98% to lincosamides). Only one strain carried *qacA/B* gene, *qacC* gene was not found. Among the markers studied, only *cap5* and *cap8* loci were detected in 23% and 61% of strains respectively. Biofilm-production ability is variable. The 37 pediatric cases corresponded mainly to skin and soft tissues infections (89%) requiring surgery with high rate of recurrence (25%). In conclusion, strains producing Panton-Valentine leukocidin in our collection have high genetic diversity and are mostly sensitive to antibiotics and antiseptics.

Discipline administrative : Pharmacie

Mots clés : leucocidine - Panton Valentine - PVL - résistance - antibiotiques - antiseptiques - *qacA* - *qacB* - *qacC* - antibiotype - SARM - communautaire - ST80 - USA300 - ACME - *sasX* - infections cutanées - récurrence - infections ostéo-articulaires - pneumopathie - traitement - pédiatrie – enfants

Université Paul Sabatier Toulouse 3 - Faculté des sciences pharmaceutiques
35 chemin des maraîchers 31062 Toulouse Cedex 9

Directeur de thèse : Dr PRERE Marie-Françoise