



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

par

L'interne des Hôpitaux des Armées

Pascale PEREZ

Elève de l'Ecole du Val de Grâce – Paris

Ancienne élève de l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon

Le 22 octobre 2013

**TYPAGE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PAR MLVA :
ETUDE DE FAISABILITE DE LA DETECTION PAR HRM**

Conformément aux dispositions du décret n°90-810
du 10 septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN MÉDECINE**

Examineurs de la thèse :

Monsieur le Professeur Alain LOZNIEWSKI

Président

Monsieur le Professeur Christophe GANTZER

}

Madame le Docteur Anne DEBOURGOGNE

}

Madame le Pharmacien en chef Céline RAGOT

}

Juges



Président de l'Université de Lorraine :
Professeur Pierre MUTZENHARDT
Doyen de la Faculté de Médecine :
Professeur Henry COUDANE

Vice-Doyen « Pédagogie » : **Mme la Professeure Karine ANGIOI**
Vice-Doyen Mission « Sillon lorrain » : **Mme la Professeure Annick BARBAUD**
Vice-Doyen Mission « Finances » : **Professeur Marc BRAUN**

Assesseeurs

- 1 ^{er} Cycle :	Professeur Bruno CHENUEL
- 2 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 ^{ème} Cycle :	
• « <i>DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques</i> »	Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
• « <i>DES Spécialité Médecine Générale</i> »	Professeur Paolo DI PATRIZIO
- Commission de Prospective Universitaire :	Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE KORWIN
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Relations Internationales :	Professeur Jacques HUBERT
- Universitarisation des études paramédicales et gestion des mono-appartenants :	M. Christophe NEMOS
- Vie Étudiante :	Docteur Stéphane ZUILY
- Vie Facultaire :	Mme la Docteure Frédérique CLAUDOT
- Étudiants :	M. Xavier LEMARIE

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY
 Patrick BOISSEL Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL
 Claude CHARDOT - François CHERRIER - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE
 Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX
 Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD
 Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET
 Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE
 Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX
 Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET
 Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS - Claude PERRIN - Guy PETIET
 Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL - Jean PREVOT - Francis RAPHAEL
 Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT
 Michel SCHWEITZER - Claude SIMON - Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert
 THIBAUT
 Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET
 Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Gérard BARROCHE - Professeur Pierre BEY - Professeur Patrick BOISSEL
Professeur Michel BOULANGE - Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE
Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeure Simone GILGENKRANTZ - Professeure Michèle KESSLER
Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON
Professeur Michel SCHMITT - Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER - Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeure Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET - Professeur Michel WAYOFF

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médecine*)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT
Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière*)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

3^{ème} sous-section : (*Maladies infectieuses ; maladies tropicales*)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Épidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (*Médecine et santé au travail*)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Professeur François KOHLER – Professeure Eliane ALBUSSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Professeur Pierre BORDIGONI - Professeur Pierre FEUGIER - Professeure Marie-Christine BENE

2^{ème} sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie*)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT

Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (*Immunologie*)

Professeur Gilbert FAURE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT
Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE
Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT – Professeur Thierry FOLLIGUET

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY - Professeur Athanase BENETOS

Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (*Pédiatrie*)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET
Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO

2^{ème} sous-section : (*Chirurgie infantile*)

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (*Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale*)

Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Philippe JUDLIN

4^{ème} sous-section : (*Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale*)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (*Ophthalmologie*)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT – Docteure Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteure Aude MARCHAL

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médecine*)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Docteur Mathias POUSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)
Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE
1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)
Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET
2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)
Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ
1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)
Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN
2^{ème} sous-section : (Médecine et Santé au Travail)
Docteure Isabelle THAON
3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)
Docteur Laurent MARTRILLE
4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)
Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE
2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))
Docteure Lina BOLOTINE
3^{ème} sous-section : (Immunologie)
Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT
4^{ème} sous-section : (Génétique)
Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE
3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)
Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE
1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)
Docteure Anne-Christine RAT
3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)
Docteure Anne-Claire BURSZEJN
4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)
Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE
4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)
Docteur Stéphane ZUILY

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE
1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)
Docteure Laure JOLY

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION
3^{ème} sous-section :
Docteur Olivier MOREL
5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)
Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE
Docteure Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

40^{ème} Section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Madame Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE
Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
*Centre de Médecine Préventive,
Houston (U.S.A)*

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)

Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)

Université de Pennsylvanie (U.S.A)

Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
*Research Institute for Mathematical
Sciences de Kyoto (JAPON)*

Professeure Maria
DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)

Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)

Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)

Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)

Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)

Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)

Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)

Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

REMERCIEMENTS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Alain LOZNIEWSKI

Professeur de Bactériologie – Virologie

Vous nous faites l'honneur de juger et présider cette thèse.

*Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à notre travail, que vous
avez accepté de relire.*

Veillez recevoir l'expression de notre respect et de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur Christophe GANTZER

Professeur de Microbiologie environnementale

*Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse et d'apporter vos connaissances à la critique
de ce travail.*

Veillez recevoir l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

A NOTRE JUGE

Madame le Docteur Anne DEBOURGOGNE

Docteur en Parasitologie- Mycologie

Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse.

*Vous avez accepté de reprendre la direction de ce travail, puis nous avez soutenu et conseillé
tout au long de sa rédaction, permettant son aboutissement.*

Nous vous remercions pour votre disponibilité, votre patience et votre bonne humeur.

Veuillez recevoir l'expression de notre sincère et profonde reconnaissance.

A NOTRE JUGE

Madame le Pharmacien en chef Céline RAGOT

Praticien certifié en Biologie Médicale

Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse.

*Nous avons bénéficié de vos enseignements, de vos conseils et de votre soutien tout au long de
notre formation*

Veillez recevoir l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

ECOLE DU VAL DE GRACE

A Monsieur le Médecin Général Inspecteur François PONS

Directeur de l'École du Val de Grâce

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Officier de la Légion d'Honneur

Commandeur de l'Ordre National de Mérite

Récompenses pour travaux scientifiques et techniques - échelon argent

Médaille d'Honneur du Service de Santé des Armées

A Monsieur le Médecin Général Jean-Didier CAVALLO

Directeur adjoint de l'École du Val de Grâce

Professeur Agrégé du Val de Grâce

Chevalier de la Légion d'Honneur

Officier de l'Ordre National du Mérite

Chevalier des Palmes Académiques

Récompenses pour travaux scientifiques et techniques - échelon argent

Médaille d'honneur du Service de Santé des Armées

HOPITAL D'INSTRUCTION DES ARMEES LEGOUEST – METZ

A Monsieur le Médecin Général Patrick GERGOY

Médecin Chef de l'Hôpital d'Instruction des Armées Legouest

Chevalier de la Légion d'Honneur

Officier de l'Ordre National du Mérite

Médaille d'Honneur du Service de Santé des Armées – échelon bronze

Médaille de la Défense Nationale – échelon bronze

A Monsieur le Médecin en chef Patrick BERLIZOT

Médecin Chef Adjoint de l'Hôpital d'Instruction des Armées Legouest

Chevalier de la Légion d'Honneur

Chevalier de l'Ordre National du Mérite

Médaille d'Honneur du Service de Santé des Armées – échelon bronze

A Monsieur le Médecin en chef Philippe REY

Professeur agrégé du Val de Grâce

Chevalier de la Légion d'Honneur

Médaille d'Honneur du Service de Santé des Armées – échelon bronze

Médaille de la Défense Nationale – échelon bronze

Chevalier des Palmes Académiques

Référent pédagogique de l'Hôpital d'Instruction des Armées Legouest

Aux médecins et pharmaciens avec qui j'ai travaillé et qui m'ont guidé au cours de ma formation :

- **Monsieur le Médecin en chef Jean-Michel PUYHARDY**

Spécialiste des Hôpitaux des Armées
Chevalier de l'Ordre National du Mérite

Vous nous avez enseigné notre métier avec engagement et rigueur. Vos connaissances, vos conseils et votre expérience nous ont été précieux. Vous nous avez soutenu au cours de la rédaction de ce travail. Nous espérons avoir été à la hauteur de votre confiance. Veuillez accepter l'expression de notre sincère reconnaissance.

- **Monsieur le Médecin en chef Serge VEDY**

Praticien-certifié en Biologie Médicale

Vous êtes à l'origine de ce travail et nous avez fait confiance pour le mener à terme. Vous avez participé à notre formation en microbiologie. Veuillez accepter l'expression de nos sincères remerciements.

- **Monsieur le Pharmacien en chef (R) Dominique André DE BRIEL**

Vous nous avez soutenu au cours de la rédaction de ce travail, dont vous avez fait une relecture attentive. Vous avez accepté de nous faire partager vos connaissances, faisant preuve à notre égard de patience et de compréhension. Nous espérons être digne d'être votre élève. Veuillez accepter l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

- **Madame le Docteur Catherine DELAMARE**

Vous nous avez fait partager vos connaissances en microbiologie et nous avez accordé votre confiance. Veuillez accepter l'expression de notre sincère reconnaissance.

- **Madame le Docteur Françoise BRAUN**

Vous avez su nous faire apprécier l'hématologie, que vous nous avez enseignée avec passion. Vous nous avez consacré du temps et nous avez fait confiance. Veuillez accepter l'expression de notre respect et de notre reconnaissance.

- **Madame le Docteur Brigitte DOUCET**

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour les connaissances que vous nous avez transmises, les conseils que vous nous avez prodigués et l'accueil que vous nous avez réservé.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de l'HIA Legouest,

pour l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé, l'aide que vous m'avez apportée et la confiance que vous me faites.

A toute ma famille,

qui a fait de moi celle que je suis. Merci de toujours avoir été présents.

A mes amis, Cécilia, Alex, Bérangère, Stéphane, Karine, Patrick, Lucille, Christelle, Anthony, ...

pour tous les bons moments passés avec vous.

SERMENT

« Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque ».

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations et acronymes	22
Liste des figures.....	23
Liste des tableaux.....	24
Introduction.....	25
Partie 1 : revue de la littérature.....	26
1. <i>Staphylococcus aureus</i> : généralités	26
1.1. Notions d'histoire	26
1.2. Taxonomie et propriétés	27
1.3. Habitat.....	29
1.4. Physiopathologie.....	29
1.4.1. Facteurs favorisant la colonisation	30
1.4.2. Facteurs de protection contre la phagocytose	30
1.4.3. Facteurs d'extension de l'infection.....	31
1.4.3.1. Extension locale.....	31
1.4.3.2. Dissémination hématogène	33
1.4.3.3. Libération de molécules de l'inflammation	33
1.4.4. Toxines et exoprotéines à activité protéolytique	33
1.4.4.1. Exfoliatines ou épidermolysines.....	34
1.4.4.2. Toxines super-antigéniques	34
1.4.5. Régulation : système <i>agr</i>	36
1.5. Pouvoir pathogène	36
1.5.1. Infections suppuratives	37
1.5.2. Infections associées aux toxines	37
1.5.2.1. Intoxications alimentaires	38
1.5.2.2. Entérocolites	38
1.5.2.3. Syndrome de choc toxique staphylococcique	38
1.5.2.4. Manifestations cutanées.....	39
1.5.2.5. Pneumopathies nécrosantes	40
1.6. Diagnostic	40
1.7. Traitement.....	41
2. Problématiques actuelles de <i>Staphylococcus aureus</i> en santé publique	44
2.1. Souches de virulence particulière	44
2.1.1. Définition	44
2.1.2. Epidémiologie.....	44
2.1.2.1. Leucocidine de Panton-Valentine.....	44
2.1.2.2. Syndrome de choc toxique staphylococcique.....	45

2.1.3.	Détection.....	46
2.1.3.1.	Leucocidine de Panton-Valentine.....	46
2.1.3.2.	Toxines super-antigéniques	47
2.1.4.	Traitement.....	48
2.1.4.1.	Leucocidine de Panton-Valentine.....	48
2.1.4.2.	Syndrome de choc toxique staphylococcique.....	49
2.1.5.	Prévention	50
2.1.5.1.	Leucocidine de Panton-Valentine.....	50
2.1.5.2.	Syndrome de choc toxique staphylococcique.....	50
2.2.	Multi-Résistance	50
2.2.1.	Définition	50
2.2.1.1.	SARM	51
2.2.1.2.	Souches résistantes ou de sensibilités diminuées aux glycopeptides	52
2.2.1.3.	Problèmes posés.....	55
2.2.2.	Epidémiologie.....	55
2.2.2.1.	SARM	55
2.2.2.2.	GISA	56
2.2.2.3.	VRSA.....	56
2.2.3.	Détection.....	57
2.2.3.1.	Résistance à la pénicilline.....	57
2.2.3.2.	Résistance aux glycopeptides	58
2.2.3.3.	Puces à ADN.....	58
2.2.4.	Thérapeutique et prévention	58
2.3.	Infections nosocomiales.....	59
2.3.1.	Définition	59
2.3.2.	Epidémiologie.....	60
2.3.3.	Diagnostic et traitement.....	60
2.3.4.	Prévention	61
2.3.4.1.	Mesures d'hygiène.....	61
2.3.4.2.	Identification et prise en charge des patients infectés ou colonisés à BMR.....	62
3.	Typage de <i>Staphylococcus aureus</i>	64
3.1.	Généralités	64
3.1.1.	Principe du typage	64
3.1.2.	Méthodes de typage épidémiologique	64
3.1.3.	Applications du typage	65
3.1.3.1.	Typage à visée épidémiologique.....	65
3.1.3.2.	Typage à visée phylogénétique ou taxonomique.....	66
3.1.3.3.	Typage dans un but de diagnostic.....	67
3.1.4.	Stratégies de typage de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
3.2.	Méthodes phénotypiques	67
3.2.1.	Antibiotypage.....	68
3.2.2.	Lysotypage ou <i>bacteriophage typing</i>	68
3.2.3.	Autres marqueurs phénotypiques.....	69
3.3.	Méthodes génotypiques	69
3.3.1.	Méthodes historiques	69

3.3.2.	PFGE (<i>pulsed-field gel electrophoresis</i>).....	70
3.3.3.	RAPD (<i>random amplified polymorphic DNA</i>)	70
3.3.4.	Rep-PCR (<i>repetitive palindromic extragenic element PCR</i>).....	71
3.3.5.	SCCmec typing	72
3.3.6.	Séquençage du locus <i>spa</i> (<i>spa</i> -typing).....	72
3.3.7.	MLST (<i>multi-locus sequence typing</i>)	73
3.3.8.	MLVA (<i>multi-locus variable number tandem repeat analysis</i>)	74

Partie 2 : Typage moléculaire de *Staphylococcus aureus* par technique *multi-locus variable-number tandem analysis* avec détection en *high resolution melting*..... 77

1.	Contexte scientifique : technologie HRM	77
1.1.	Principe de l'HRM.....	77
1.2.	Avantages de l'HRM	79
1.3.	Aspects techniques de l'HRM	79
1.3.1.	Mode de détection de la PCR	79
1.3.1.1.	Agents se liant à l'ADN double-brin	80
1.3.1.2.	Sondes d'hybridation	81
1.3.1.3.	Caractéristiques de PCR requises	82
1.3.2.	Agent marqué se liant à l'ADN double-brin.....	83
1.3.3.	Automates	85
1.4.	Analyse des courbes de fusion.....	85
1.5.	Applications de l'HRM.....	87
1.5.1.	Applications en génétique humaine.....	87
1.5.1.1.	Distinction des homozygotes - hétérozygotes	87
1.5.1.2.	Détection des SNP	89
1.5.2.	Applications en microbiologie.....	90
1.5.2.1.	Identification d'espèces	90
1.5.2.2.	Détection de mutations de résistance.....	91
1.5.2.3.	Génotypage par amplification d'un locus polymorphe.....	91
1.5.2.4.	Génotypage par MLVA : application à <i>Bacillus anthracis</i>	92
2.	Problématique	93
3.	Mise au point de la PCR en temps réel	94
3.1.	Objectif	94
3.2.	Matériels et méthodes.....	94
3.2.1.	Souche de référence	94
3.2.2.	Extraction de l'ADN.....	94
3.2.3.	Amplification	95
3.2.3.1.	Choix des amorces.....	95
3.2.3.2.	Composition du mix.....	97
3.2.3.3.	Schéma de PCR	98
3.2.3.4.	Amplification et HRM.....	98
3.2.4.	Validation et calcul de l'efficacité de la PCR en temps réel	99
3.3.	Résultats.....	99

4. Détection par HRM du typage de <i>Staphylococcus aureus</i> par MLVA.....	102
4.1. Objectif	102
4.2. Matériels et méthodes	102
4.2.1. Souches cliniques.....	102
4.2.1.1. Origine	102
4.2.1.2. Contrôle des souches cliniques	103
4.2.1.2.1. Antibiotogramme	103
4.2.1.2.2. Recherche de PVL	103
4.2.2. Extraction.....	104
4.2.3. Quantification de l'ADN	104
4.2.4. Amplification et HRM	104
4.2.5. Analyse des données moléculaires	104
4.3. Résultats.....	104
4.3.1. Caractérisation des souches	104
4.3.2. Quantification de l'ADN	106
4.3.3. Analyse des résultats de l'HRM	106
5. Discussion.....	113
5.1. Démarche suivie	113
5.2. Analyse des causes	114
5.2.1. Concentrations en ADN.....	114
5.2.2. Caractéristiques des VNTR	115
5.2.2.1. Taille des amplicons	115
5.2.2.2. Séquences des VNTR	117
Conclusion - Perspectives	119
Bibliographie	121

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

BMR : bactérie multi-résistante
 CC : complexe clonal
 CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
 CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
 CMI : concentration minimale inhibitrice
 CT : *cycle threshold* (cycle seuil)
 FHR : fusion haute résolution
 FRET : *fluorescent resonance energy transfer*
 GISA : *glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus*
 HRM : *high resolution melting*
 HRMA : *high resolution melting analysis*
 hVISA : *heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*
 IAS : infections associées aux soins
 ISO : infections de site opératoire
 LPV : leucocidine de Panton-Valentine
 LT4 : lymphocytes T4
 MLVA : *multi-locus variable-number tandem analysis*
 MLEE : *multi-locus enzyme electrophoresis*
 MSCRAMM : *microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule*
 NTED : *neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease*
 OPEX : opération extérieure
 PFGE : *pulsed field gel electrophoresis*
 PLP : protéines de liaison à la pénicilline
 PVL : leucocidine de Panton-Valentine
 RAPD : *random amplified polymorphic DNA*
 REDD : *recalcitrant erythematous desquamating disorder*
 Rep-PCR : *repetitive palindromic extragenic element PCR*
 RFLP : *restriction fragment length polymorphism*
 SARM : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline
 SAMS : *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline
 SCCmec : *Staphylococcal cassette chromosome mec*
 SCTS : syndrome de choc toxique staphylococcique
 SIRUs : *Staphylococcal interspersed repeat units*
 SNP : *single nucleotide polymorphism*
 ST : *sequence type*
 TSST-1 : *toxic shock syndrome toxin-1*
 VNTR : *variable number tandem repeat*
 VISA : *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*
 VRSA : *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : <i>S. aureus</i> , coloration de Gram.....	28
Figure I.2 : Colonies de <i>S.aureus</i> (haut) et <i>small colony variant</i> (bas).....	28
Figure I.3 : Mode d'action des leucotoxines synergohyménotropes de <i>S. aureus</i> (9).....	32
Figure I.4 : Activation classique vs activation par un super-antigène (6).....	35
Figure I.5 : Régulation des facteurs de virulence par le système <i>agr</i> (12)	36
Figure I.6 : Exemples de <i>SCCmec</i> (type I à VII) (24)	52
Figure I.7 : Mécanismes de résistance aux glycopeptides (26).....	54
Figure I.8 : Profil MLVA de 34 souches de <i>S. aureus</i> , nommées par leur pulsotype (58).....	75
Figure II.1 : Courbes d'amplification	77
Figure II.2 : Courbe de fusion	78
Figure II.3 : Pics de fusion	78
Figure II.4 : Agents se liant à l'ADN double brin (64).....	80
Figure II.5 : Hybridation de 2 sondes (<i>Hybridation probes</i>) (64).....	82
Figure II.6 : Redistribution de fluorescence en fonction de la saturation (66)	84
Figure II.7 : Effet de la redistribution de fluorescence lors de l'utilisation de SYBRGreen vs LCGreen (67)	84
Figure II.8 : Courbes de fusion normalisées	85
Figure II.9 : Courbes de fusion avec normalisation du signal	86
Figure II.10 : Analyse en <i>difference plot</i>	87
Figure II.11 : Détection des hétéroduplex.....	88
Figure II.12 : Analyse en <i>difference plot</i> de polymorphismes, variants non classés et mutations des gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i> (68)	89
Figure II.13 : Courbes d'amplification de Sa1866 obtenues à partir des dilutions de Mu50	99
Figure II.14 : Courbe standard de la PCR de Sa1866 obtenue à partir des dilutions de Mu50	100
Figure II.15 : Pics de fusion de Sa1866 obtenus à partir des dilutions de Mu50.....	100
Figure II.16 : T _m et courbes de fusion des dilutions pour Sa1132	114
Figure II.17 : Courbes de fusion de Mu50 et SE139	115
Figure II.18 : Courbes de fusion de SE043 et SE072	115
Figure II.19 : Répartition des différents VNTR de <i>S. aureus</i> , monomorphes (gris) et polymorphes (rose), selon leur taille (59)	116
Figure II.20 : Exemple d'allèles différents de Sa0311 possédant des T _m identiques	116
Figure II.21 : Souche Mu50 - VNTR Sa1729 : observation de multiples domaines de fusion	117
Figure II.22 : Pourcentage de recoupement entre les répétitions des VNTR polymorphes (roses) et monomorphes (gris) de <i>S. aureus</i> (59).....	118
Figure II.23 : Exemple d'allèles identiques de Sa1866 possédant des T _m différents	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Espèces constituant le genre <i>Staphylococcus</i>	27
Tableau I.2 : Etapes physiopathologiques de l'infection staphylococcique et facteurs de virulence.....	30
Tableau I.3 : Molécules antistaphylococciques (15).....	42
Tableau I.4 : Associations d'antibiotiques dans le traitement des infections sévères (5).....	43
Tableau I.5 : Distribution des sites infectieux pour <i>S. aureus</i>	60
Tableau II.1 : VNTR décrits par Pourcel <i>et al.</i>	95
Tableau II.2 : Amorces de PCR classique et de PCR temps réel pour chaque VNTR	96
Tableau II.3 : Constitution du mélange réactionnel.....	97
Tableau II.4 : Schéma de PCR	98
Tableau II.5 : Etapes de PCR	98
Tableau II.6 : Etapes d'HRM	99
Tableau II.7 : Conditions de PCR retenues et efficacité obtenue pour chaque VNTR.....	101
Tableau II.8 : Nombre de répétition par VNTR pour chaque souche	103
Tableau II.9 : Antibiogramme et production de PVL des souches contrôlées.....	105
Tableau II.11 : Concentrations d'ADN.....	106
Tableau II.12 : Comparaison Tm - nombre de répétitions pour les différents VNTR.....	107
Tableau II.13 : Exemples de Tm du VNTR Sa0122	115

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus est à la fois une bactérie commensale et un agent pathogène majeur de l'homme. Ce micro-organisme est responsable d'infections très polymorphes : communautaires ou nosocomiales, superficielles ou profondes, bénignes ou létales. Son potentiel épidémique, l'existence de souches de virulence particulière ou résistantes à de nombreux antibiotiques font de cette bactérie la cible d'une surveillance épidémiologique renforcée. Pour cette raison, de nombreuses méthodes de typage épidémiologique de *S. aureus* ont été développées, avec des performances diverses. Parmi-elles, la *multi-locus variable-number tandem analysis* (MLVA) se démarque par sa reproductibilité et son pouvoir discriminant.

Chaque établissement de soins est confronté aux infections staphylococciques. De ce fait, il peut être intéressant d'un point de vue épidémiologique de disposer de techniques de typage moléculaire permettant une surveillance locale et accessible à une majorité de laboratoires. Pour cette raison, l'Hôpital d'Instruction des Armées Legouest de Metz souhaite disposer d'une technique discriminante, rapide, à coût modéré, pouvant utiliser la technologie de la PCR en temps réel mais pas celle du séquençage. Pour répondre à ces critères, une étude de la faisabilité du typage de *S. aureus* en MLVA avec détection en HRM a été réalisée.

Ce travail est composé de deux parties. Après une revue de la littérature portant sur *S. aureus* et ses problématiques, les différentes méthodes de typage ont été développées. Dans la partie expérimentale, la possibilité de transposer un schéma de MLVA classique, avec révélation électrophorétique des amplicons, vers une MLVA avec révélation en temps réel, par analyse de leur température de fusion, a été étudiée au laboratoire de l'HIA Legouest. Après une phase de développement de la technique, une comparaison avec la méthode traditionnelle a été réalisée.

PARTIE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. *Staphylococcus aureus* : généralités

1.1. Notions d'histoire

Plusieurs travaux réalisés dans les années 1870 ont mis en évidence la présence de cocci dans des pus et des abcès. Considérés comme une entité unique, ils furent nommés *Coccobacteria septicum* par Billroth en 1874. Leur implication possible en tant qu'agents pathogènes ne fut démontrée que plus tard par Ogston, qui mit en évidence des espèces saprophytes colonisant la peau, et d'autres responsables de furoncles et de surinfections de plaies. Il fit également la distinction entre les cocci en chainettes, les *Streptococcus* et ceux en grappe, les *Staphylococcus*, scindant ainsi le genre en deux (1).

L'espèce *Staphylococcus aureus*, ainsi nommée en raison de sa pigmentation, fut décrite en 1884 par Rosenbach. Ce dernier différencia *Staphylococcus pyogenes aureus* des autres cocci à Gram positif en amas, nommés *Staphylococcus pyogenes albus* et *Staphylococcus pyogenes citreus*, en fonction de la couleur du pigment. L'appellation *Micrococcus* était également employée sans distinction (1).

La séparation des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus*, mais aussi des *Neisseria*, a été ébauchée à partir de 1925 par l'utilisation progressive de tests biochimiques d'identification tels que la capacité d'utilisation du mannitol ou du glucose, la présence d'une gélatinase, d'une hémolysine ou d'une leucocidine, la production d'ammoniaque à partir d'arginine, d'acide à partir du glycérol ou encore la présence d'une coagulase. Une méthode de classification basée sur ces tests a permis à Hill en 1959 (1) de montrer que le groupe des souches identifiées comme *Staphylococcus aureus* formait un groupe homogène et une espèce à part entière.

Le genre *Staphylococcus* a été définitivement différencié de celui des *Micrococcus* par l'étude de leur ADN et de leur contenu en guanine et cytosine (GC %), qui est faible pour les *Staphylococcus* (30 à 38 %) mais élevé pour les *Micrococcus* (65 à 75 %).

L'introduction de techniques génomiques en 1976 a permis la vérification de certaines classifications tout en engendrant de nombreuses modifications, amenant progressivement à la taxonomie actuelle (1).

1.2. Taxonomie et propriétés

Sur la base de l'analyse du gène codant l'ARN ribosomal 16S, le genre *Staphylococcus* est depuis 2002 classé dans la famille des *Staphylococcaceae*, ainsi que *Gemella*, *Macrococcus*, *Jeotgalicoccus* et *Salinococcus*.

Le genre *Staphylococcus* comporte 47 espèces et 24 sous-espèces, dont 17 sont retrouvées chez l'homme (tableau I.1) (2).

Tableau I.1 : Espèces constituant le genre *Staphylococcus*

Espèces et sous-espèces isolées en clinique humaine	Espèces et sous-espèces isolées principalement chez l'animal, les produits dérivés et l'environnement
<i>S. aureus</i> subspecies <i>aureus</i>	<i>S. arlettae</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. aureus</i> subspecies <i>anaerobius</i>
<i>S. capitis</i> subspecies <i>capitis</i>	<i>S. capitis</i> subspecies <i>urealyticus</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. carnosus</i> subspecies <i>carnosus</i>
<i>S. cohnii</i> subspecies <i>cohnii</i>	<i>S. carnosus</i> subspecies <i>utilis</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii</i> subspecies <i>urealyticus</i>
<i>S. hominis</i> subspecies <i>hominis</i>	<i>S. condimenti</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. delphini</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. felis</i>
<i>S. pasteurii</i>	<i>S. fleurettii</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. gallinarum</i>
<i>S. saprophyticus</i> subspecies <i>saprophyticus</i>	<i>S. hominis</i> subspecies <i>novobiosepticus</i>
<i>S. schleiferi</i> subspecies <i>schleiferi</i>	<i>S. hyicus</i> subspecies <i>hyicus</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. kloosii</i>
<i>S. xylosum</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. lutrae</i>
	<i>S. muscae</i>
	<i>S. piscifera</i>
	<i>S. piscifera</i>
	<i>S. pulvereri</i>
	<i>S. saprophyticus</i> subspecies <i>bovis</i>
	<i>S. schleiferi</i> subspecies <i>coagulans</i>
	<i>S. sciuri</i> subspecies <i>sciuri</i>
	<i>S. sciuri</i> subspecies <i>carnaticus</i>
	<i>S. sciuri</i> subspecies <i>rodentium</i>
	<i>S. succinus</i>
	<i>S. vitulinus</i>

Les *Staphylococcus* sont des cocci à coloration de Gram positive d'environ 1 µm de diamètre, se disposant le plus souvent en amas ou grappes (figure I.1). Ils sont immobiles et ne produisent pas de spores. S'ils sont généralement capsulés *in vivo*, ils perdent progressivement leur capsule en culture (3).

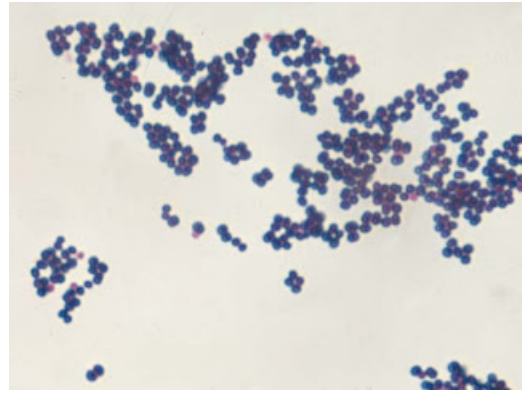


Figure I.1 : *S. aureus*, coloration de Gram

Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en milieu ordinaire entre 10 et 42 °C, avec un optimum thermique à 37 °C et à un pH compris entre 7,4 et 7,6. *Staphylococcus aureus* possède également la faculté de se multiplier sur milieux sélectifs hypersalés (3). Les colonies peuvent atteindre une taille de 2 à 3 mm, elles sont rondes, lisses et opaques. *S. aureus* se distingue de la majorité des autres staphylocoques par la production d'une coagulase, d'un pigment doré et par son caractère bêta-hémolytique sur milieu au sang. Cependant, les souches *small colony variant* de *Staphylococcus aureus* sont au contraire ponctiformes, non hémolytiques et non pigmentées (figure I.2).



Figure I.2 : Colonies de *S.aureus* (haut) et *small colony variant* (bas)

1.3. Habitat

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont ubiquitaires, peu exigeantes et capables de vivre dans de nombreux sites, essentiellement en saprophyte de l'environnement extérieur, mais aussi en commensal des épithéliums cutanés et muqueux des hommes et des animaux.

L'Homme constitue un réservoir de plusieurs espèces de staphylocoques, dont *Staphylococcus aureus*. La bactérie colonise la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveau-nés puis reste en portage chronique chez 20 % des individus sains et en portage intermittent chez 30 à 50 % d'entre eux. Les porteurs chroniques sont colonisés par une souche présente en forte densité, au contraire des porteurs intermittents colonisés par des clones différents au fil du temps et présents à des densités plus faibles. De ce fait, les porteurs chroniques sont plus à risque d'infection (4).

Différents facteurs de risque de colonisation liés à l'hôte sont identifiés : les sujets masculins, un âge supérieur à 60 ans, l'éthylisme chronique, le diabète, la présence d'une néoplasie, d'une insuffisance rénale terminale ou encore les pathologies pulmonaires chroniques (4).

La localisation préférentielle de *Staphylococcus aureus* est le rhinopharynx (fosses nasales et gorge), mais il est également présent dans le tube digestif et le périnée en plus faible quantité. Il dissémine par intermittence à partir des sites de portage vers les zones humides comme les aisselles. Il est également capable de disséminer par aérosol sur la peau à partir du rhinopharynx. Sa capacité à résister à la dessiccation explique que cette bactérie puisse être retrouvée sur les vêtements et dans les squames présentes dans les poussières environnementales, permettant non seulement une transmission directe manuportée, mais également une transmission indirecte par les objets et les poussières.

1.4. Physiopathologie

Les infections à *Staphylococcus aureus* sont la résultante d'une succession d'étapes, au cours desquelles la bactérie va combiner la mise en œuvre de facteurs de virulence et ses capacités d'échappement aux défenses de l'hôte. Les étapes principales sont résumées dans le tableau I.2 (5).

Tableau I.2 : Etapes physiopathologiques de l'infection staphylococcique et facteurs de virulence

Etapes de l'infection	Eléments mis en jeu
Envahissement local	adhésines hyaluronidase, élastase, exfoliatines
Nécrose cellulaire	<i>pore-forming toxins</i> (hémolysines, leucocidines)
Diminution de l'efficacité des défenses locales	protéine A capsule, biofilm, coagulase leucocidines
Formation de microthrombi	coagulase
Emboles septiques	fibrinolysine

1.4.1. Facteurs favorisant la colonisation

Les constituants de paroi et les facteurs d'adhésion jouent un rôle initial dans la physiopathologie des infections à *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus possède un grand nombre de protéines de surface ayant la capacité de se fixer sur des molécules de l'hôte. Ces récepteurs de surface, les adhésines, appartiennent à la famille des MSCRAMM (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule*). Elles se fixent à des molécules plasmatiques telles la fibronectine (protéine de liaison à la fibronectine) et au fibrinogène (*Clumping factor A* et *B*) ou à des molécules tissulaires telles la vitronectine, la laminine ou le collagène (protéine de liaison au collagène). Ces protéines jouent un rôle dans la colonisation et l'invasion des tissus (3). La colonisation est ainsi possible sans lésion préalable, et se trouve facilitée par une effraction cutanée (6).

1.4.2. Facteurs de protection contre la phagocytose

La protéine A est une protéine liée au peptidoglycane codée par le gène *spa*. Elle possède la capacité de fixer le fragment Fc de la majorité des sous-classes d'immunoglobulines de type IgG. Cette fixation crée une interférence avec la phagocytose et avec l'opsonisation, rendant moins efficace l'action du système immunitaire (3).

De plus, 90 % des souches de *Staphylococcus aureus* possèdent une capsule polysaccharidique conférant une résistance à la phagocytose. Elle est également impliquée dans les phénomènes d'adhérence (3).

Dans certaines conditions, cette bactérie est capable de produire un biofilm ou *slime*, un polysaccharide entourant les colonies et permettant à la fois l'ancrage de la bactérie et une protection mécanique contre la phagocytose (7).

Un autre facteur de protection contre la phagocytose est la présence d'une enzyme, la coagulase. Cette dernière se lie à la prothrombine et forme un complexe appelé staphylothrombine. Le complexe staphylothrombinique entraîne la polymérisation du fibrinogène en fibrine et donc la formation d'un caillot, protégeant ainsi la bactérie de la phagocytose (6).

La résistance à la phagocytose de *Staphylococcus aureus* favorise l'extension de l'infection.

1.4.3. Facteurs d'extension de l'infection

1.4.3.1. Extension locale

L'extension locale des infections à *S. aureus* repose majoritairement sur la production de plusieurs toxines ayant pour cibles les membranes cellulaires. Ce sont des enzymes ayant une action cytolytique sur certaines cellules eucaryotes et détruisent ainsi les cellules de la défense de l'hôte. Le mécanisme de la cytolyse est une fixation aux cellules cibles provoquant la formation de canaux membranaires, d'où leur dénomination de *pore-forming toxins*. Ces canaux membranaires permettent les échanges d'ions monovalents, avec pour conséquence une fuite osmotique du contenu cellulaire, et en particulier du contenu en ATP, provoquant l'apoptose cellulaire. L'altération des tissus qui en résulte favorise la dissémination (8).

Les *pore-forming toxins* sont traditionnellement classées en 2 groupes en fonction de leur structure tridimensionnelle.

Les toxines à hélice α comprennent les δ -hémolysines, synthétisées par 97 % des souches de *S. aureus* et capables de lyser de nombreuses cellules sanguines, et les *phenol-soluble peptides*, initialement caractérisés chez *S. epidermidis*, produits en grande quantité par des souches communautaires et dont les cibles sont les polynucléaires neutrophiles (9).

Les toxines à brin β , ou leucotoxines, ont pour cibles cellulaires majeures les leucocytes. Elles comprennent l'hémolysine α , capable de lyser de nombreux types de cellules (leucocytes, plaquettes, kératinocytes, fibroblastes) et de provoquer la libération massive

de molécules pro-inflammatoires, et les leucotoxines à deux composés ou toxines synergohyménotropes incluant la γ -hémolysine (LukE-LukD) présente chez 99 % des souches, et la leucocidine de Panton-Valentine (LPV ou PVL) (9).

Cette dernière est formée des composés LukS-PV et LukF-PV. Le gène codant la PVL est porté par un bactériophage, qui n'est retrouvé que chez 1 à 2 % des souches de *S. aureus*. Son spectre d'activité lytique est restreint aux monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et métamyélocytes, épargnant les érythrocytes (9). Les concentrations sublytiques de PVL induisent par activation de la voie calcique (figure I.3) une libération massive d'histamine par les polynucléaires basophiles et stimulent la libération par les polynucléaires neutrophiles d'enzymes (telles la β -glucuronidase et le lysozyme), de composés chimiotactiques (tels le leucotriène-B4 et l'interleukine-8) et des métabolites oxygénés. A forte dose (200 nM), la PVL a un effet nécrotique sur les polynucléaires humains, alors qu'à faible dose (5 nM) elle induit une apoptose dépendante de la voie mitochondriale (voie des caspases ou *cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*) (6).

Les souches de *S. aureus* produisant la PVL sont classiquement associées aux infections cutanées primitives comme les furoncles (6).

Les *pore-forming toxins* permettent donc l'extension locale de l'infection par leur capacité à détruire les cellules des tissus, mais également à détruire les cellules du système immunitaire en créant un état local d'immunosuppression.

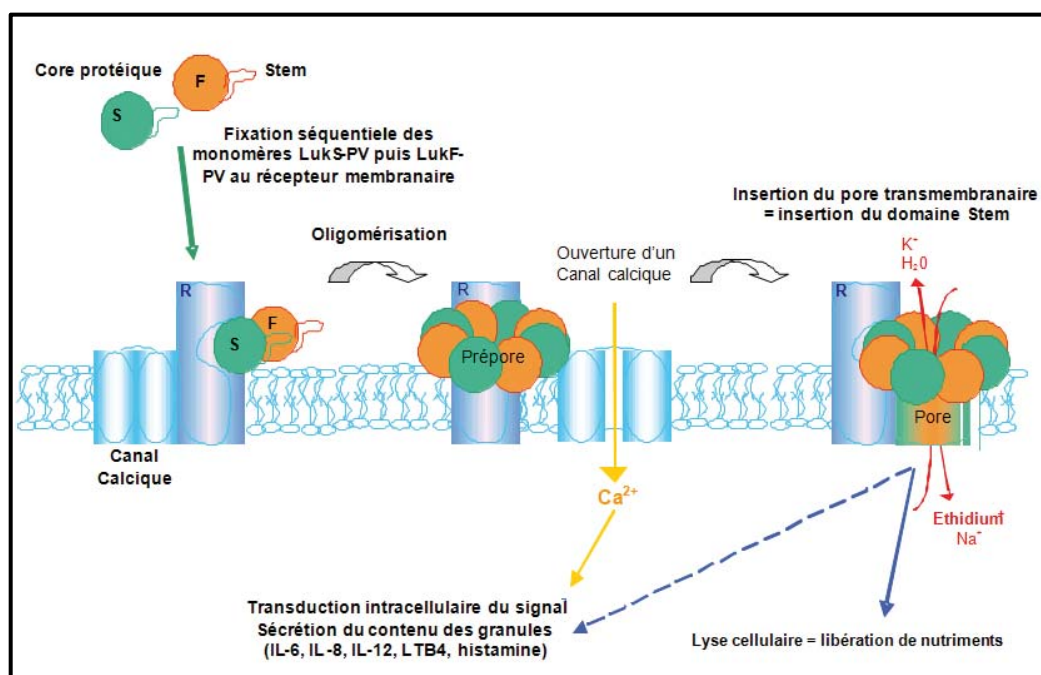


Figure I.3 : Mode d'action des leucotoxines synergohyménotropes de *S. aureus* (9)

D'autres enzymes produites par *S. aureus* sont capables de dégrader le tissu conjonctif comme les protéases, l'élastase et la hyaluronidase, et favorisent ainsi l'extension du foyer infecté. Par exemple, la hyaluronidase dépolymérise la substance fondamentale du tissu conjonctif, permettant la dissémination des bactéries (6).

1.4.3.2. Dissémination hématogène

La coagulase est une sérine protéase impliquée dans la physiopathologie des thrombophlébites suppurées. Elle a la propriété d'activer la prothrombine sans clivage protéolytique. La formation du complexe staphylothrombinique entraîne la polymérisation du fibrinogène en fibrine, et donc la formation d'un caillot au sein duquel prolifère *Staphylococcus aureus* (6).

La fibrinolysine ou staphylokinase exerce l'effet inverse. Elle contribue à la dislocation du caillot riche en bactéries en activant le plasminogène en plasmine, contribuant ainsi à l'apparition de localisations septiques secondaires (6).

1.4.3.3. Libération de molécules de l'inflammation

La paroi de *Staphylococcus aureus* est composée, entre autres, de peptidoglycane et d'acides teichoïques. Ces constituants possèdent des effets biologiques, favorisant notamment l'induction de la sécrétion de cytokines par les cellules lymphocytaires et monocytaires. Cette propriété permet d'expliquer l'existence de chocs staphylococciques provoqués par des souches ne produisant pas de toxines à activité super-antigénique (3).

A cela s'ajoute la libération de marqueurs de l'inflammation qui se produit lors de la cytolysse liée aux facteurs d'extension locale, essentiellement par les *pore-forming toxins*.

Cette libération parfois massive de facteurs de l'inflammation est à l'origine des manifestations cliniques des infections graves (3).

1.4.4. Toxines et exoprotéines à activité protéolytique

Staphylococcus aureus possède plusieurs catégories de toxines.

1.4.4.1. Exfoliatines ou épidermolysines

Les toxines épidermolytiques, ou exfoliatines, sont des sérines protéases à tropisme cutané. Trois sérotypes d'épidermolysines ont été caractérisés : ETA (support bactériophagique), ETB (support plasmidique) et ETD (support chromosomique).

Ces toxines se fixent à des protéines cutanées intracellulaires, la prolagrine et la filagrine, provoquant un élargissement de l'espace intercellulaire puis un clivage des desmosomes ciblé sur la desmoglérine-1 (9), ayant pour conséquence un décollement intra-épidermique entre le *stratum granulosum* et le *stratum spinosum* (3).

Les épidermolysines sont responsables de l'impétigo bulleux staphylococcique et de sa forme généralisée, le syndrome d'exfoliation généralisé par diffusion dans l'organisme.

1.4.4.2. Toxines super-antigéniques

Certaines toxines staphylococciques ont une activité super-antigénique.

Les entérotoxines sont produites par la moitié des souches de *Staphylococcus aureus*. Ces protéines sont thermostables et comprennent 7 types antigéniques, associés à des manifestations cliniques variables, allant de l'intoxication alimentaire au choc toxique staphylococcique (3).

La *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) est une exotoxine (protéine soluble diffusant dans le milieu environnant) produite par *Staphylococcus aureus* et responsable du syndrome de choc toxique staphylococcique (3).

Classiquement, les lymphocytes T CD4 (LT4) reconnaissent les antigènes présentés sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II des cellules présentatrices de l'antigène. La formation d'un complexe entre le complexe TCR des LT4, le CMH de classe II et l'antigène étranger induit une activation ciblée des LT4 (9).

Les toxines à activité super-antigénique sont capables d'établir une interaction par fixation directe en dehors du site de fixation classique des antigènes, entre le CMH de classe II du macrophage (domaine HLA-DR) et la chaîne V-bêta du TCR des lymphocytes, au niveau de sites externes de l'antigène (figure I.4). L'affinité de cette fixation est supérieure (9), et ne permet pas de réponse spécifique, entraînant l'expansion de plus de mille fois plus de LT4 et provoquant l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires T. Cinq à 50 % des lymphocytes T sont concernés et sont activés indépendamment de leur spécificité antigénique (6). Elle entraîne une réponse indistincte polyclonale et intense du système immunitaire avec libération massive de médiateurs de l'inflammation

(interleukines, interféron γ , TNF- α et β) induisant une vasodilatation majeure responsable de la symptomatologie clinique (3).

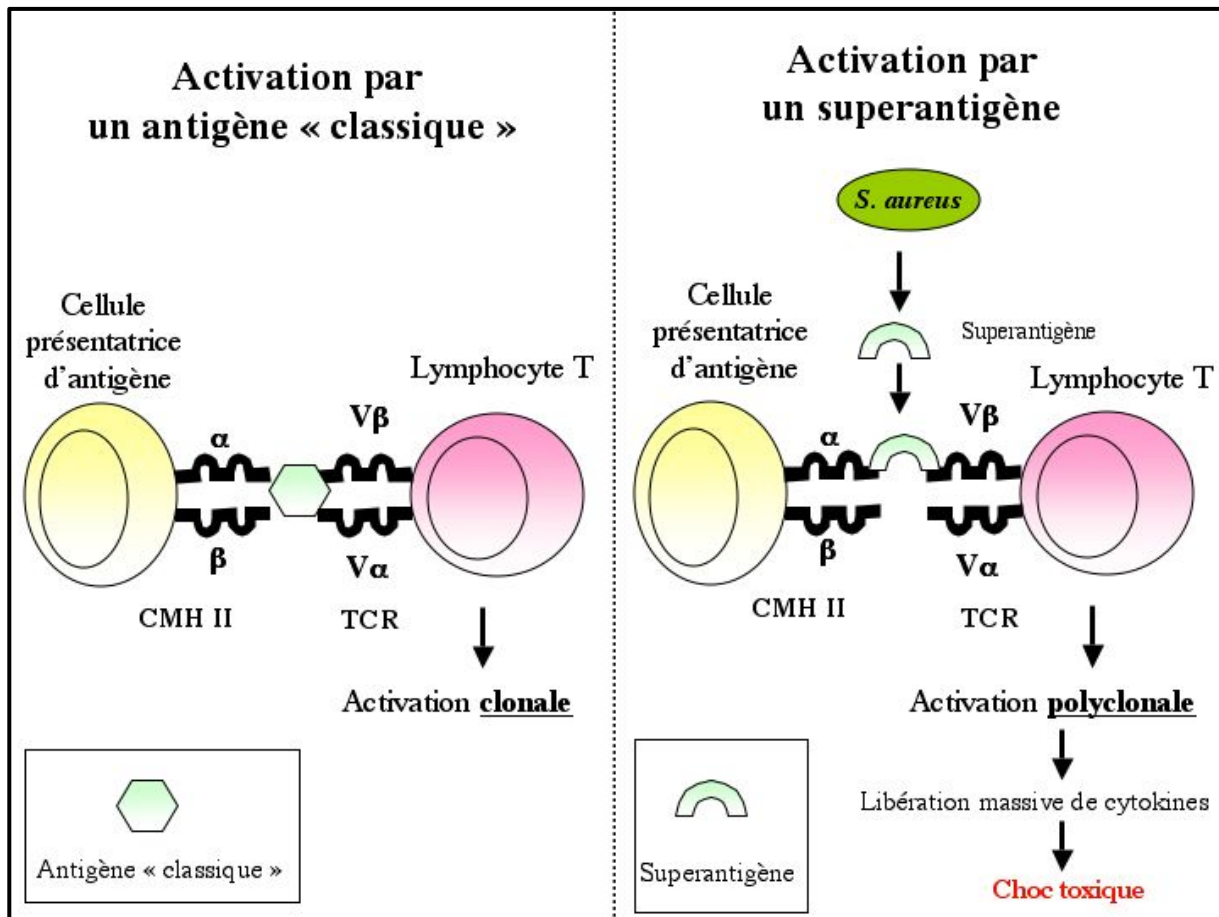


Figure I.4 : Activation classique vs activation par un super-antigène (6)

L'activation simultanée d'un grand nombre de lymphocytes peut avoir différentes conséquences : outre l'activation massive du système immunitaire, elle peut provoquer l'activation parasite des lymphocytes dirigés contre des antigènes du « soi » et ainsi la possible survenue d'une réaction auto-immune. En effet, les toxines staphylococciques à activité super-antigénique telles que les entérotoxines et la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) ont été impliquées dans la survenue de maladies auto-immunes comme le psoriasis, la dermatite atopique, la maladie de Kawasaki, et certaines arthrites rhumatismales, sans que le rôle exact de ces toxines dans ces pathologies n'ait été clairement établi (facteur étiologique ou cofacteur favorisant la survenue de poussées évolutives) (6).

1.4.5. Régulation : système *agr*

L'expression de ces facteurs de virulence est régulée en partie par le système *agr* (*accessory gene regulator*). Ce dernier est habituellement décrit comme ayant deux actions sur la transcription protéique : la répression de la transcription de protéines de la membrane cellulaire (protéine A, coagulase, protéine de liaison à la fibronectine, etc.) et l'activation de la transcription de plusieurs exoprotéines (hémolysine α et β , TSST-1, leucotoxines) en phase post-exponentielle (10).

En fonction de la densité cellulaire, 104 gènes sont hyper-régulés et 34 gènes sont hypo-régulés par le système *agr* (11) (figure I.5) (12). L'effecteur du système *agr* est une molécule d'ARN, le RNAIII, qui module l'expression des facteurs de virulence (10).

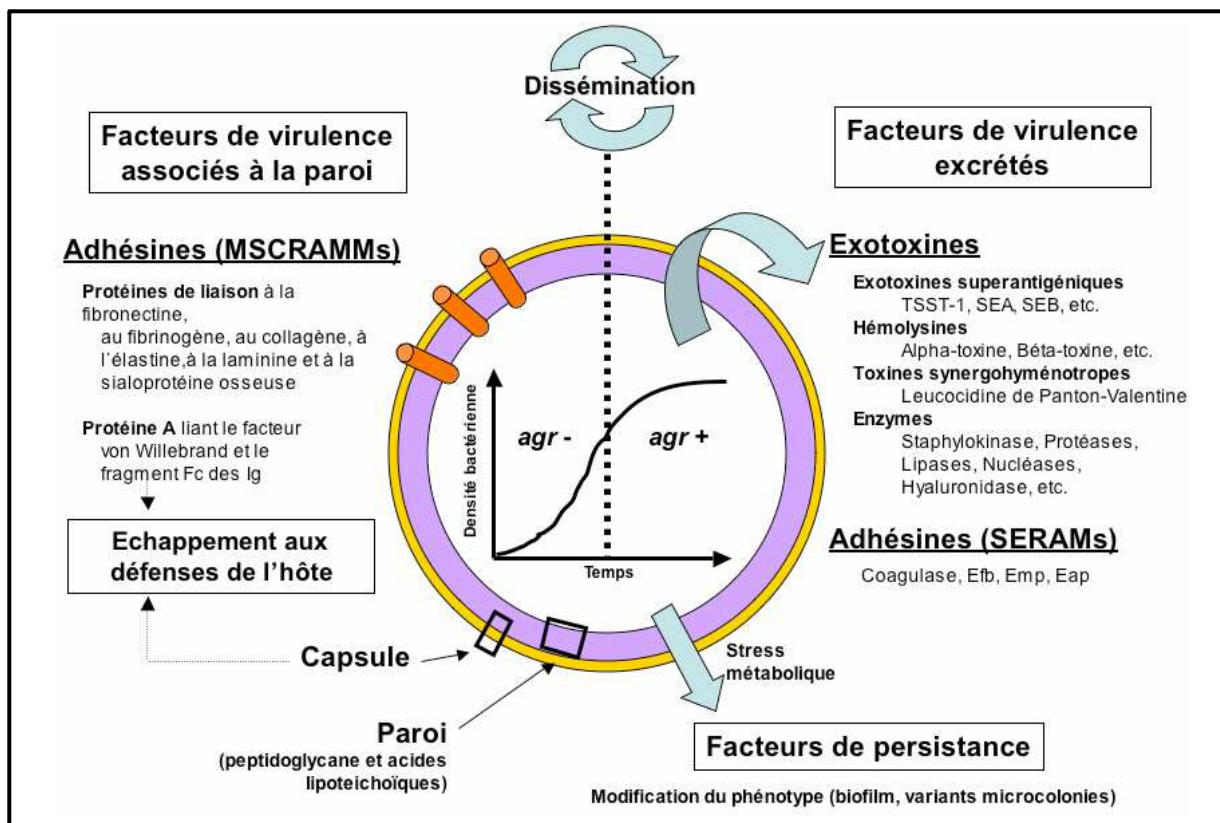


Figure I.5 : Régulation des facteurs de virulence par le système *agr* (12)

1.5. Pouvoir pathogène

Les infections à *S. aureus* possèdent différentes caractéristiques.

Tout d'abord, ces infections sont suppurées, souvent profondes et destructrices, au niveau de la porte d'entrée ou dans les foyers métastatiques (13).

Elles se caractérisent ensuite par une dissémination rapide des métastases septiques et par des signes généraux qui peuvent être très marqués (13).

Enfin, ces infections peuvent persister, parfois plusieurs dizaines d'années (13).

De plus, le nombre important des facteurs de virulence présents chez *Staphylococcus aureus* explique le caractère polymorphe des manifestations cliniques (9).

1.5.1. Infections suppuratives

Staphylococcus aureus appartient à la catégorie des bactéries pyogènes.

Le plus fréquemment, *Staphylococcus aureus* provoque des infections locorégionales de localisations cutanées superficielles, sous-cutanées et muqueuses : impétigos, folliculites, panaris, abcès, furoncles, anthrax, cellulites, lymphangites. Plusieurs facteurs favorisent la survenue d'infections à partir d'une simple colonisation, parmi lesquelles on retrouve les atteintes cutanées (plaies quelle que soit leur origine, brûlures, ulcères), le diabète, les traitements immunosuppresseurs et les corticoïdes, mais aussi les déficits immunitaires cellulaires (3). Les souches sécrétrices de PVL sont fréquemment impliquées dans les atteintes cutanées récidivantes et les tableaux de furunculoses familiales (14).

Staphylococcus aureus est également un agent pathogène responsable d'infections de la sphère ORL (otites, sinusites, mastoïdites, angines), mais aussi de pneumopathies (3).

Des infections profondes peuvent compliquer les infections superficielles soit par extension directe locorégionale, comme c'est le cas pour la staphylococcie maligne de la face secondaire à un furoncle de l'aile du nez, soit par dissémination par voie hématogène (3). *Staphylococcus aureus* est alors responsable de septicémies, à l'origine de localisations viscérales pleuro-pulmonaires (abcès bulleux), ostéo-articulaires (ostéomyélites, arthrites), cardiaques (endocardites), méningées, cérébrales (abcès cérébraux) et urinaires (phlegmons péri-néphrétiques) (9).

1.5.2. Infections associées aux toxines

Plusieurs pathologies sont liées à des infections toxiques de *Staphylococcus aureus*.

1.5.2.1. Intoxications alimentaires

Staphylococcus aureus est un agent responsable d'intoxications alimentaires survenant après l'ingestion d'entérotoxines thermostables préformées dans les aliments contaminés (viande, produits laitiers) et mal conservés. Les entérotoxines staphylococciques sont en effet presque toutes émétisantes, à l'exception de TSST-1. Ces toxines provoquent la synthèse d'acide arachidonique par les mastocytes, qui agit sur les récepteurs neuronaux du système gastro-intestinal, conduisant à la stimulation des centre nerveux responsables de la diarrhée et du vomissement (9).

Cliniquement, après une incubation courte (1 à 6 heures après ingestion), surviennent des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et des diarrhées, le tout en l'absence de fièvre. L'évolution est en général spontanément favorable sans traitement, mais des collapsus cardio-vasculaires ont été décrits. La recherche de souches toxigènes et des entérotoxines peut être réalisée dans l'aliment ou dans les vomissements des patients (3). Quinze à 30 % des toxi-infections alimentaires collectives seraient liées à *S. aureus* (9).

1.5.2.2. Entérocolites

Les entérocolites staphylococciques surviennent majoritairement au décours d'une antibiothérapie, qui semble être à l'origine de la sélection de souches intestinales de *Staphylococcus aureus* résistantes aux antibiotiques administrés et sécrétrices d'entérotoxines ou de toxines synergohyménotropes LukD-LukE. Elles se caractérisent cliniquement par une fièvre et une diarrhée intense sanglante avec déshydratation. L'aspect coloscopique de la muqueuse digestive évoque une entérocolite pseudo-membraneuse (6).

1.5.2.3. Syndrome de choc toxique staphylococcique

Le syndrome de choc toxique staphylococcique est provoqué par la diffusion dans l'organisme de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) ou d'une entérotoxine. Le tableau clinique se caractérise par une fièvre supérieure à 39°C, une hypotension, une érythrodermie de type scarlatiniforme desquamative ainsi que d'au moins trois manifestations systémiques parmi les suivantes : diarrhées, vomissements, myalgies, augmentation de la créatine phospho-kinase, hyperhémie vaginale, oropharyngée ou conjonctivale, insuffisance rénale aiguë, cytolysé hépatique, thrombopénie, troubles de la conscience (6).

Si ce syndrome a d'abord été identifié comme une complication d'infections suppuratives en pédiatrie, de nombreux cas (19 en 2011) ont été décrits par la suite chez des femmes en période menstruelle liés à l'utilisation de tampons au fort pouvoir absorbant. Le pronostic semble alors plus favorable (14). D'autres sites colonisés ou infectés peuvent être à l'origine de ce tableau, qui est plus fréquemment provoqué par des infections suppuratives que par une colonisation des voies aériennes supérieures (6).

Des formes incomplètes de ce syndrome ont été décrites.

La scarlatine staphylococcique se traduit par un érythème scarlatiniforme fébrile suivi d'une desquamation fine, sans choc ni syndrome de défaillance multiviscérale (6). Sept cas ont été recensés en 2011, tous chez des enfants (avec un âge médian de 5,4 ans). Ces cas sont survenus au décours d'infections staphylococciques diverses (cutanée, ostéite, pharyngite, arthrite), d'origine communautaire comme nosocomiale (14).

Le *neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease* (NTED) survient en période néonatale et associe fièvre, éruption cutanée et thrombocytopénie, là encore sans choc ni syndrome de défaillance multiviscérale.

Le *recalcitrant erythematous desquamating disorder* (REDD) a été majoritairement observé chez des patients atteints par le VIH au stade SIDA. Les manifestations cliniques sont des lésions érythémateuses extensives chroniques associées à des défaillances d'organes multiples sans état de choc (3).

1.5.2.4. Manifestations cutanées

Les exfoliatines A et B de *Staphylococcus aureus* sont responsables de syndromes staphylococciques cutanés bulleux. Les décollements bulleux sont liés à un clivage intra-épidermique provoqué par les exfoliatines, ce qui permet le diagnostic différentiel avec des nécrolyses épidermiques toxiques ou allergiques présentant un plan de clivage dermo-épidermique (6).

Le syndrome d'exfoliation généralisé ou syndrome de la peau ébouillantée est provoqué par ces toxines, qui diffusent à partir d'un foyer de colonisation ou d'infection à *Staphylococcus aureus*. Il touche essentiellement les jeunes enfants, mais aussi les adultes immunodéprimés et les insuffisants rénaux. Il se traduit cliniquement par un rash douloureux de type scarlatiniforme, suivi en quelques heures d'un décollement cutané spontané ou provoqué (signe de Nikolski). En l'absence de surinfection, le contenu des

bulles est stérile. La souche toxigène ne doit pas être recherchée au niveau des bulles mais en portage rhinopharyngé ou sur le site d'une infection suppurative. Si ce syndrome est relativement bénin lorsqu'il est bien pris en charge, la mortalité atteint 4 % en l'absence d'antibiothérapie (6).

Une forme mineure de ce syndrome semble exister, associant un exanthème desquamatif du cou et des plis inguinaux et axillaires, un syndrome fébrile et un impétigo de la face (14).

Par opposition avec ce tableau, l'impétigo bulleux est provoqué par des souches de *Staphylococcus aureus* produisant des exfoliatines au sein des lésions cutanées. Le nombre de bulles, dont le contenu est trouble et contient le staphylocoque et sa toxine, est variable et prédomine au niveau des extrémités. L'évolution se fait vers la rupture des bulles, la formation d'ulcérations puis de croûtes. La recherche de la souche toxigène responsable de l'infection doit ici se faire dans les lésions bulleuses (6).

1.5.2.5. Pneumopathies nécrosantes

Les pneumopathies nécrosantes à *Staphylococcus aureus* sont souvent liées à des souches sécrétrices de PVL. Le tableau clinique associe une pneumopathie sévère avec détresse respiratoire, atteinte pleurale, hémoptysie et leucopénie. Elle fait généralement suite à un syndrome grippal et touche préférentiellement des sujets jeunes, enfants et adultes jeunes sans comorbidités, avec un âge médian de 14,8 ans. L'évolution clinique est rapidement défavorable dans plus de la moitié des cas, avec apparition d'une défaillance multiviscérale et un décès rapide en moins de 5 jours après le début de l'hospitalisation. La mortalité est importante, environ 60 %, malgré une antibiothérapie adaptée (6).

1.6. Diagnostic

Le diagnostic des infections à *Staphylococcus aureus* repose majoritairement sur des méthodes directes.

L'examen direct des prélèvements (pus, hémocultures, prélèvements respiratoires, liquides de ponction, etc.) montre des cocci à Gram positif disposés en amas.

Le diagnostic est obtenu par la culture et l'identification de la bactérie, qui possède une catalase et une coagulase et qui est positive aux tests d'agglutination (3). En routine, ces tests peuvent être complétés par des galeries d'identification ou une analyse en spectrométrie de masse, voire par analyse des caractéristiques génomiques en PCR

(amplification de la région intergénique ribosomale 16S – 23S (ITS PCR) ou séquençage du gène *tuf*) (6).

Le diagnostic indirect par recherche sérique d'anticorps anti-staphylolysines α ou anti-acides teichoïques présente peu d'intérêt, hormis dans les cas d'infections chroniques où les prélèvements bactériologiques sont difficilement réalisables (3).

L'identification de facteurs de virulence particuliers peut être réalisée sur les souches suspectes par différentes méthodes : techniques immuno-enzymatiques type ELISA (recherche des entérotoxines A à E dans les intoxications alimentaires, dosage de la PVL), techniques de biologie moléculaire (identification des gènes codants les différentes toxines) ou sérologie (recherche par technique ELISA d'anticorps sériques dirigés contre la PVL dans les pneumopathies nécrosantes non documentées ou contre la TSST-1 pour prédire le risque de récurrence) (6).

L'utilisation de puces à ADN type Identibac *S. aureus* Genotyping® permet aujourd'hui, en un temps, la détection de l'ensemble de toxines staphylococciques connues à ce jour ainsi que de certains variants, de 62 adhésines ou variants d'adhésines, de gènes impliqués dans la formation de la capsule et du biofilm, de gènes codant les protéases et autres facteurs de virulence (auréolysine, exfoliatine, ACME, etc.), et de gènes régulateurs (*agr*, *saeR/S*, *vraR/S*, *sarA*), ainsi que l'analyse des gènes de résistance aux antibiotiques (6).

1.7. Traitement

Le traitement des infections à *Staphylococcus aureus* repose sur trois axes principaux.

Le premier est le traitement de la porte d'entrée. C'est un traitement de type interventionnel pour tous les foyers où les antibiotiques diffusent peu ou mal par manque de vascularisation (drainage d'un abcès, ablation de matériel infecté, excision de tissus nécrosés). L'objectif est une diminution importante de l'inoculum bactérien (15).

Le second axe de traitement est une antibiothérapie, de préférence adaptée d'emblée à l'antibiogramme (15).

Enfin, dans les infections graves, le troisième axe est le traitement symptomatique des défaillances d'organes potentiellement associées (15).

Staphylococcus aureus est naturellement sensible à de nombreux antibiotiques (tableau I.3).

Tableau I.3 : Molécules antistaphylococciques (15)

Antistaphylococciques majeurs	Antistaphylococciques mineurs
- bêta-lactamines antistaphylococciques : oxacilline céfazoline, céfamandole - glycopeptides : vancomycine teicoplanine	aminosides rifampicine quinolones acide fusidique fosfomycine macrolides, lincosamides, streptogramines cotrimoxazole

Cependant, le nombre important de souches présentant des résistances acquises impose la réalisation d'un antibiogramme.

En 2010, 95 % des souches de *S. aureus* isolées produisaient une pénicillinase, inactivant les pénicillines G, V, A, les carboxy et uréidopénicillines. Cette pénicillinase est inhibée par l'acide clavulanique et a peu d'affinité pour les céphalosporines et la pénicilline M, qui reste l'antibiotique de référence des infections à *S. aureus* sensibles à la méticilline (SASM) (5).

Les SASM sont généralement sensibles par ailleurs aux fluoroquinolones, aux synergistines, à certains macrolides et à l'association aminopénicilline – acide clavulanique. La fosfomycine et les aminosides doivent être réservés aux infections nécessitant un traitement intraveineux (5).

La résistance à la méticilline confère aux *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) une résistance à toutes les bêta-lactamines. Dans le cas des SARM nosocomiaux, une résistance aux fluoroquinolones, aux synergistines, à la fosfomycine et aux aminosides (sauf à la gentamicine) est fréquemment associée. Les glycopeptides, l'acide fusidique, le linézolide et la rifampicine restent généralement actifs sur ces souches (5).

Les choix thérapeutiques doivent prendre en compte la sévérité de l'infection et les caractéristiques pharmacodynamiques des antibiotiques. Si l'utilisation d'antibiotiques non conventionnels peut être envisagé dans les infections bénignes, les antistaphylococciques majeurs, seuls ou en associations, restent la règle dans les infections sévères (15). Les infections compliquées justifient une association d'antibiotiques d'action synergique rapidement bactéricide afin de réduire rapidement l'inoculum bactérien et de diminuer le risque d'apparition de souches résistantes. Les recommandations concernant les associations d'antibiotiques sont résumées dans le tableau I.4.

Tableau I.4 : Associations d'antibiotiques dans le traitement des infections sévères (5)

Site et germe	1^{ère} intention	Alternative
<i>Bactériémie</i>		
SASM	pénicilline M + gentamicine	ofloxacin + rifampicine
SARM	glycopeptide + gentamicine	linezolid + rifampicine
<i>Endocardite</i>		
SASM	pénicilline M + gentamicine	glycopeptide + gentamicine
SARM	glycopeptide + gentamicine	glycopeptide + ac. fusidique
<i>Ostéoarthrite</i>		
SASM	ofloxacin + rifampicine	pénicilline M + gentamicine
SARM	glycopeptide + rifampicine	pristinamycine + rifampicine
<i>Méningite</i>		
SASM	céfotaxime + fosfomycine	ofloxacin + rifampicine
SARM	vancomycine + rifampicine	pristinamycine + rifampicine

2. Problématiques actuelles de *Staphylococcus aureus* en santé publique

2.1. Souches de virulence particulière

2.1.1. Définition

Les infections graves et associées à une mortalité importante (pneumonies nécrosantes, choc toxique staphylococcique, syndrome d'exfoliation généralisé, impétigo bulleux, scarlatine staphylococcique) sont liées principalement à deux types de facteurs de virulence : les toxines responsables d'atteintes cellulaires majeures (essentiellement la PVL) et les toxines super-antigéniques provoquant une activation non maîtrisée du système immunitaire.

Parmi les souches responsables d'atteintes cellulaires majeures, les souches sécrétrices de la PVL sont fortement représentées. Actuellement, les souches virulentes PVL+ sont à l'origine de la plupart des interrogations concernant *S. aureus* en terme de santé publique, et de ce fait à l'origine d'un PHRC national depuis 2011 visant à établir si elles peuvent être considérées comme un facteur indépendant de gravité des pneumopathies à *S. aureus* (6).

2.1.2. Epidémiologie

2.1.2.1. Leucocidine de Panton-Valentine

Les bactéries productrices de PVL représentent environ 3 % des souches de *S. aureus*, constituant une importante population circulante, estimée au minimum à 0,6 million sur la base d'une fréquence de portage nasal de 25 %. Malgré cette forte prévalence, seuls 30 cas de pneumopathies nécrosantes associées à la PVL sont déclarés chaque année en France, suggérant une sensibilité particulière de certains patients à cette toxine. Certains déficits immunitaires héréditaires sont associés à des infections sévères à staphylocoque PVL+ : la granulomatose septique chronique, les défauts d'adhésion leucocytaire, les neutropénies congénitales, les défauts de l'immunité innée et le syndrome d'hyper IgE autosomique dominant (6).

L'association entre pneumopathie nécrosante sévère et souches de *S. aureus* productrices de PVL a été décrite pour la première fois par Gillet en 2002. Seize cas de pneumopathies

communautaires à *S. aureus* PVL+ ont été comparés à 33 cas de pneumopathies communautaires à *S. aureus* PVL-, mettant en évidence des différences significatives quant à l'âge de survenue médian (14,8 ans [5,4 - 24 ans] vs 70,1 ans [59,2 – 81,4]), la gravité des signes cliniques, la survie des patients 48 heures après l'admission (62,5 vs 94 %) et la survie globale (25 vs 53 %) (16).

Les souches de *S. aureus* PVL+ sont également fréquemment associées aux infections cutanées, souvent récidivantes et pouvant réaliser des tableaux de furonculoses familiales par transmission aux proches, et aux infections ostéo-articulaires sévères (6) pour lesquelles des évolutions fatales ont été décrites (17).

Concernant les infections cutanées, 50 % des souches expertisées par le CNR en 2011 dans le cadre de suppurations (folliculites, furoncles, abcès) étaient productrices de la PVL. Le taux de souches PVL+ observé dans les atteintes primitives, sur peau saine, est bien supérieur à celui des atteintes secondaires à des dermatoses ou plaies. La majorité des infections était d'origine communautaire et liées au clone ST80 (*agr3*, PVL+, *mecA*+) circulant en Europe et en Afrique du Nord. Les autres étaient provoquées par le clone Nord-Américain USA300 (*agr1*, PVL+, *mecA*+) (14).

2.1.2.2. Syndrome de choc toxique staphylococcique

Le syndrome de choc toxique staphylococcique (SCTS) a initialement été décrit aux Etats-Unis au début des années 1980 lors d'épidémies chez des jeunes femmes utilisant des tampons super-absorbants. Actuellement, la majorité des SCTS surviennent au décours d'une chirurgie ou en post-partum. (18).

Soixante et un cas ont été rapportés en France en 2011 (14), dont 19 cas de SCTS menstruels. La mortalité globale est de l'ordre de 10 % (6).

L'âge médian des patientes atteintes de SCTS menstruel est de 19,5 ans [13 - 37 ans]. Le pronostic était généralement favorable. Onze souches isolées possédaient les gènes codant la TSST-1, l'entérotoxine A et le système *agr3*. Sept souches ne possédaient que le gène codant TSST-1, et une souche celui codant l'entérotoxine C et un allèle *agr2*. Toutes les souches étaient sensibles à la méticilline.

Dans les 42 cas de chocs survenus suites à des suppurations diverses à *S. aureus*, l'âge médian était de 36 ans et le sex-ratio homme/femme de 1,47. Vingt-huit souches possédaient le gène codant la TSST-1, les 14 autres celui codant une toxine super-antigénique majeure (entérotoxine A, B ou C) (14).

2.1.3. Détection

2.1.3.1. Leucocidine de Panton-Valentine

Diverses méthodes permettent la détection des souches productrices de PVL. Les éléments amenant à effectuer la recherche de PVL sont un tableau clinique évocateur et des anomalies biologiques non spécifiques. Une leucopénie est fréquente, parfois profonde (leucocytes < 3000 éléments/mL) et associée à une mortalité de 90 %. Une CRP très élevée et une thrombopénie liée au sepsis sont généralement retrouvées. Une élévation de la troponine chez des sujets jeunes sans anomalie de la cinétique segmentaire, en lien avec une myocardite septique, est également décrite (19). Le phénotype de résistance du clone ST80, majoritaire en Europe, peut également être évocateur et amener à rechercher la PVL. Ces souches sont résistantes à l'oxacilline, à la kanamycine et à la tétracycline, de sensibilité intermédiaire ou résistantes à l'acide fusidique mais possèdent une sensibilité conservée aux fluoroquinolones. Cette signature phénotypique aurait une valeur prédictive positive de 100 % (18).

Les techniques de biologie moléculaire permettent la recherche du gène codant la PVL, soit isolément, soit en association avec celle d'autres toxines par PCR multiplexes, voire à l'aide de puces à ADN pour un criblage étendu des facteurs de virulence de la souche. La détection de la PVL dans les infections sévères doit se faire en urgence, dans le but d'optimiser la prise en charge thérapeutique. Des techniques de PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques permettent d'amplifier un fragment du gène *lukSF-PV* et de rendre un résultat en 3 heures environ (6).

Certains tests immunologiques ELISA disponibles au CNR permettent la quantification de la production de la PVL dans les échantillons biologiques. Les objectifs de ces techniques sont de déterminer l'importance de la production de toxine par la souche infectante, notamment pour les souches à haut potentiel épidémique comme les SARM communautaires, mais aussi de comparer les concentrations de PVL produites en fonction des tissus et de détecter sa présence directement dans les prélèvements pour établir un diagnostic rapide en moins de 3 heures (14). La fiabilité des résultats obtenus (sensibilité de 95 %, spécificité de 100 %) a conduit au développement de tests immunochromatographiques basés sur le même principe, encore plus rapides et utilisables en routine par de nombreux laboratoires (14).

La recherche de la PVL par spectrométrie de masse a également été décrite. La comparaison des spectres obtenus sur des souches sécrétrices et non sécrétrices de toxine a mis en évidence la présence d'un pic à 4448 m/z en faveur de sa présence avec une sensibilité de 100 %, une spécificité de 90,6 %, une valeur prédictive positive de 40 % et négative de 100 % (20).

Le CNR des staphylocoques a développé une sérologie quantitative des anticorps sériques dirigés contre la PVL. Cette technique complémentaire permettant le diagnostic d'infection par des souches de *S. aureus* productrices de PVL peut être utilisée dans les pneumopathies nécrosantes non documentées, même si le diagnostic direct doit être privilégié.

2.1.3.2. Toxines super-antigéniques

De la même manière que pour la recherche de PVL, des techniques de biologie moléculaire permettent la recherche des gènes codant les toxines super-antigéniques, soit de manière ciblée par PCR spécifiques, soit en criblage par des PCR multiplexes, voire de manière exhaustive par puces à ADN (6).

La détermination des répertoires V β du récepteur T des lymphocytes T permet le diagnostic des SCTS et l'identification de la toxine super-antigénique impliquée. En effet, l'activation des lymphocytes T, pouvant impliquer jusqu'à 1/5^{ème} de la population lymphoïde T totale, est dépendante du répertoire V β ciblé par l'exotoxine activatrice. Cette détermination se fait par technique de cytométrie en flux et permet de mettre en évidence l'activation de 24 des sous-populations lymphocytaires exprimant des répertoires V β différents. La détermination du répertoire V β du TCR des lymphocytes T par cytométrie en flux est le seul outil de diagnostic biologique objectivant l'action des toxines super-antigéniques (14).

La détection des entérotoxines dans les prélèvements cliniques est possible par technique immunochromatographique (14).

Comme pour la PVL, une sérologie quantitative TSST-1 est disponible, mettant en évidence les anticorps sériques dirigés contre la TSST-1 par méthode ELISA. L'absence d'anticorps à la phase aiguë du SCTS menstruel est un argument en faveur du diagnostic

de choc toxique staphylococcique, et la persistance d'une sérologie négative est associée à un risque de récurrence accru (14).

2.1.4. Traitement

2.1.4.1. Leucocidine de Panton-Valentine

Il n'existe actuellement pas de consensus concernant le traitement des infections sévères à *S. aureus* producteurs de PVL (6).

Dans le cas des pneumopathies nécrosantes, les études de séries de patients ne montrent pas de différences significatives en terme de pronostic entre les patients ayant bénéficié d'une antibiothérapie adaptée d'emblée et ceux ayant reçu un traitement inadapté (6). Le traitement antistaphylococcique usuel semble donc inefficace, et ce pour deux raisons : l'émergence de souches sécrétrices de PVL résistantes à la méthicilline et donc résistantes aux traitements de première intention, et la mauvaise diffusion des antibiotiques au niveau du foyer infectieux liée à la nécrose tissulaire induite par la toxine (21).

In vitro, certains antibiotiques, comme la clindamycine, la rifampicine, le linézolide et l'acide fusidique, semblent aussi inhiber de manière dose-dépendante la synthèse de PVL au niveau transcriptionnel tandis que l'oxacilline et l'imipénème en augmenteraient l'expression du fait de leur mécanisme d'action : ces dernières molécules n'inhibent pas la synthèse protéique mais la synthèse de la paroi bactérienne (22).

Par ailleurs, les immunoglobulines polyvalentes contiennent des anticorps neutralisant l'action de la toxine sur les polynucléaires neutrophiles à des concentrations utilisables en thérapeutique (6).

Certains auteurs préconisent donc pour le traitement de infections sévères à *S. aureus* producteurs de PVL l'utilisation d'antibiotiques à activité anti-toxinique (linézolide ou lincomycine) en association avec l'injection intraveineuse d'immunoglobulines polyvalentes, par analogie avec le traitement des chocs toxiques provoqués par *Streptococcus pyogenes*. Si des résultats spectaculaires ont été observés, aucune de ces thérapeutiques n'a pu être testée dans le cadre d'un essai clinique randomisé du fait de la rareté de l'infection (6).

Des traitements symptomatiques peuvent également être proposés, comme l'utilisation d'antioxydants pour réduire les lésions secondaires au stress oxydatif ou l'oxygénation par

membrane extracorporelle (ECMO) en cas de pneumopathie nécrosante avec détresse respiratoire sévère (17), comme dans les formes graves de la grippe.

Concernant les infections cutanées non compliquées, l'incision et le drainage chirurgical restent la base du traitement. L'antibiothérapie, par injection intraveineuse de deux antistaphylococciques bactéricides (dont un avec activité anti-toxinique), doit être discutée dans les infections profondes. Elle devient nécessaire dans les infections compliquées de la peau et des tissus mous (18).

Le drainage chirurgical des collections suppurées est également indispensable en complément de l'antibiothérapie dans les infections ostéo-articulaires (18).

2.1.4.2. Syndrome de choc toxique staphylococcique

Le traitement symptomatique, qui repose sur une prise en charge de type réanimatoire, est la priorité initiale. Doit s'y associer la recherche et le traitement chirurgical d'une éventuelle porte d'entrée (18).

L'antibiothérapie est un élément central de la prise en charge thérapeutique, même si elle repose sur des données empiriques en l'absence d'essai clinique randomisé.

Les effets anti-toxiniques de certains antibiotiques sont identiques à ceux observés sur la PVL, et les schémas conseillés sont identiques à ceux des infections profondes à *S. aureus* PVL+ (18).

Les injections intraveineuses d'immunoglobulines polyvalentes sont également un outil thérapeutique intéressant dans les SCTS. Une réduction significative de la mortalité a été démontrée dans un modèle animal pour une dose de 1 g/kg/j.

D'autres thérapies sont en cours d'étude : des anticorps monoclonaux neutralisant les toxines super-antigéniques, des ligands des TLR2 ayant des propriétés immunomodulatrices ou encore des anticorps fixés sur des colonnes de haute affinité pour extraire les toxines du plasma (18).

2.1.5. Prévention

2.1.5.1. Leucocidine de Panton-Valentine

La prévention des infections à *S. aureus* PVL+ passe essentiellement par l'éradication du portage après échec du traitement, rechute ou récurrence. Dans ce cas, les membres du foyer doivent être décontaminés de manière systématique, qu'ils soient porteurs ou non.

Dans les cas groupés en collectivité, la décontamination ne concerne que les sujets contacts porteurs.

La décontamination systématique du sujet et de son entourage n'est pas recommandée en France dans les infections sévères, mais elle l'est dans d'autres pays, comme au Royaume-Uni (17).

La décolonisation se fait par l'application nasale de pommade à la mupirocine, les bains de bouches et la toilette avec un savon à la chlorhexidine (17).

Des études ont montré le rôle protecteur de l'immunité acquise dirigée contre la PVL dans les infections sévères. En effet, tous les patients ayant des antécédents de furoncles à *S. aureus* PVL+ ont survécu à une infection sévère, alors que 35,9 % des patients sans antécédents sont décédés. Cette différence statistiquement significative suggère la possibilité de l'efficacité d'un vaccin anti-PVL (17).

2.1.5.2. Syndrome de choc toxique staphylococcique

Bien que les récurrences soient rares, l'usage concernant la prévention secondaire du SCTS menstruel est de déconseiller l'utilisation des tampons. L'administration d'antibiotiques anti-staphylococcique durant les règles ou la prévention des règles par contraception orale ont été évoquées en cas de récurrence (17).

2.2. Multi-Résistance

2.2.1. Définition

Une bactérie multi-résistante aux antibiotiques (BMR) est définie comme une bactérie qui, du fait de l'accumulation de résistances naturelles et acquises, ne demeure plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique (23).

Les souches de *S. aureus* considérées comme des BMR sont essentiellement les SARM et les staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

2.2.1.1. SARM

Les premières souches de SAMR sont apparues en 1961, soit deux ans après l'apparition de la méticilline. La résistance à la méticilline est conférée par la mutation du gène *mec*, codant les protéines de liaison à la pénicilline (PLP), avec pour conséquence la production d'une protéine de moindre affinité aux bêta-lactamines. Les PLP modifiées ne permettent plus la fixation des bêta-lactamines, et donc le blocage de la synthèse du peptidoglycane responsable de leur effet bactéricide n'est plus réalisé (24).

La mutation initialement décrite du gène *mec* est le gène *mecA*, codant la PLP2a. Ce gène est retrouvé chez certaines espèces de staphylocoques n'exprimant pas de résistance à la méticilline.

Le gène *mecA* responsable de la résistance à la méticilline fait partie d'un élément génétique mobile de type transposon (25), le *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*), susceptible d'être transmis d'une bactérie à une autre au sein de l'espèce, mais aussi du genre (5). Dix types de SCC*mec* portant le gène *mecA* sont identifiés (26) (figure I.6). Certains sont responsables d'une résistance isolée aux bêta-lactamines (SCC*mec* I, IV, V, VI et VII), alors que d'autres contiennent des gènes additionnels de résistance aux antibiotiques, conférant alors une résistance à d'autres familles d'antibiotiques (SCC*mec* II et III) et sont, à eux seuls, responsables de la multi-résistance (fluoroquinolones, macrolides, lincosamides, synergistines, aminosides, tétracyclines) de certaines souches de *S. aureus* (24). De plus, SCC*mec* comporte plusieurs séquences d'insertion ainsi que les gènes responsables de la régulation de la transcription de *mecA*, qui peut être déréprimée lorsque ces gènes sont tronqués.

Le gène *ccr* (cassette chromosomique recombinase) se trouve sur tous les éléments SCC*mec*. Il a pour rôle l'intégration ou l'excision de SCC*mec* dans le génome de *S.aureus* (24).

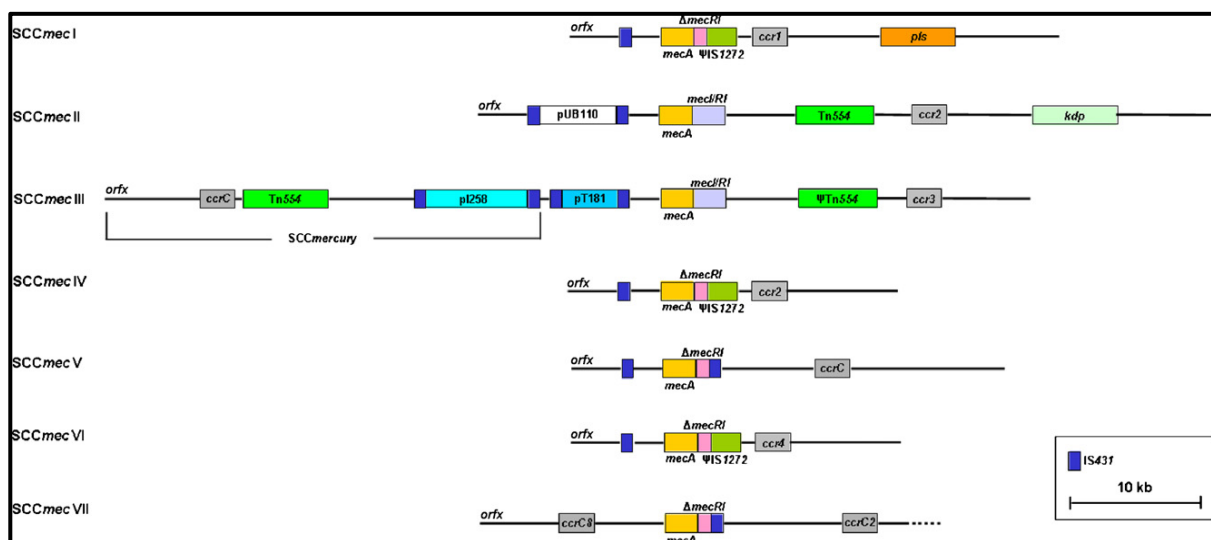


Figure I.6 : Exemples de SCCmec (type I à VII) (24)

Un nouveau type de gène *mec* a été découvert en 2011. Il est porté par un nouvel élément SCCmec, appelé SCCmec XI. Ce gène, nommé *mecC*, confère une résistance hétérogène à la méticilline. Il est associé au gène *blaZ* codant une bêta-lactamase. Les souches porteuses de ce gène restent généralement sensibles aux macrolides, lincosamides, synergistines, aminosides, tétracyclines, fluoroquinolones et fosfomycine et aucun autre gène de résistance additionnel n'a été identifié (26).

2.2.1.2. Souches résistantes ou de sensibilités diminuées aux glycopeptides

Différents niveaux de résistances existent.

Certaines souches de *S. aureus* présentent une résistance totale aux glycopeptides. Les VRSA (*vancomycin-resistant S. aureus*) sont apparus aux Etats-Unis en 2002, par acquisition de l'opéron *vanA* provenant d'une souche d'entérocoque résistant à la vancomycine (CMI > 16 mg/L). Ce type de souche est également résistant à la teicoplanine (27).

Les GISA (*glycopeptide intermediate S. aureus*) ont une sensibilité diminuée croisée aux deux glycopeptides. Sont différenciés les VISA (*vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*), présentant une concentration minimale inhibitrice (CMI) à la vancomycine comprise entre 4 et 8 mg/L, et les *heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus*

aureus (hVISA), qui ont une CMI à la vancomycine catégorisée sensible avec les techniques de routine, mais pour lesquels une faible partie de la population (10^{-5} à 10^{-6}) présente une sensibilité intermédiaire à la vancomycine (27). Cependant, la CMI de la vancomycine ne permet pas vraiment d'identifier les hVISA puisqu'elle ne met pas en évidence ces sous-populations. Il n'existe pas de consensus pour une technique particulière d'étude ni pour des seuils de sous-populations qui permettraient de définir une souche hVISA (28).

Les mécanismes expliquant cette diminution de sensibilité sont nombreux (figure I.7) et seraient induits par l'exposition aux glycopeptides, lors d'un traitement mal conduit notamment, et semblent réversibles en l'absence de contact avec ces antibiotiques (27).

Des modifications de la membrane cellulaire sont impliquées : une activation de la synthèse des éléments de la paroi cellulaire provoque son épaissement, des muramyl-peptides anormaux sont produits à des niveaux élevés, ainsi que l'hyper-expression de PLP2a. Ces modifications de la paroi cellulaire empêchent la diffusion des glycopeptides vers leur site actif, ne permettant plus le blocage de la synthèse de la membrane cellulaire (27).

Une réduction de l'activité auto-lytique est généralement retrouvée dans les souches de GISA responsables d'infections persistantes. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer ce phénomène, allant de l'implication des acides teichoïques dans la réduction de la dégradation du peptidoglycane par les enzymes autolytiques au blocage de l'activité de l'enzyme hydrolysant le peptidoglycane par la fixation de la vancomycine (27).

Des changements métaboliques sont également impliqués, notamment la diminution du catabolisme de l'acétate, provoquant une modification des caractéristiques de croissance de la souche, une tolérance aux antibiotiques, des modifications des mécanismes de mort cellulaire et une augmentation de la synthèse d'adhésines (27).

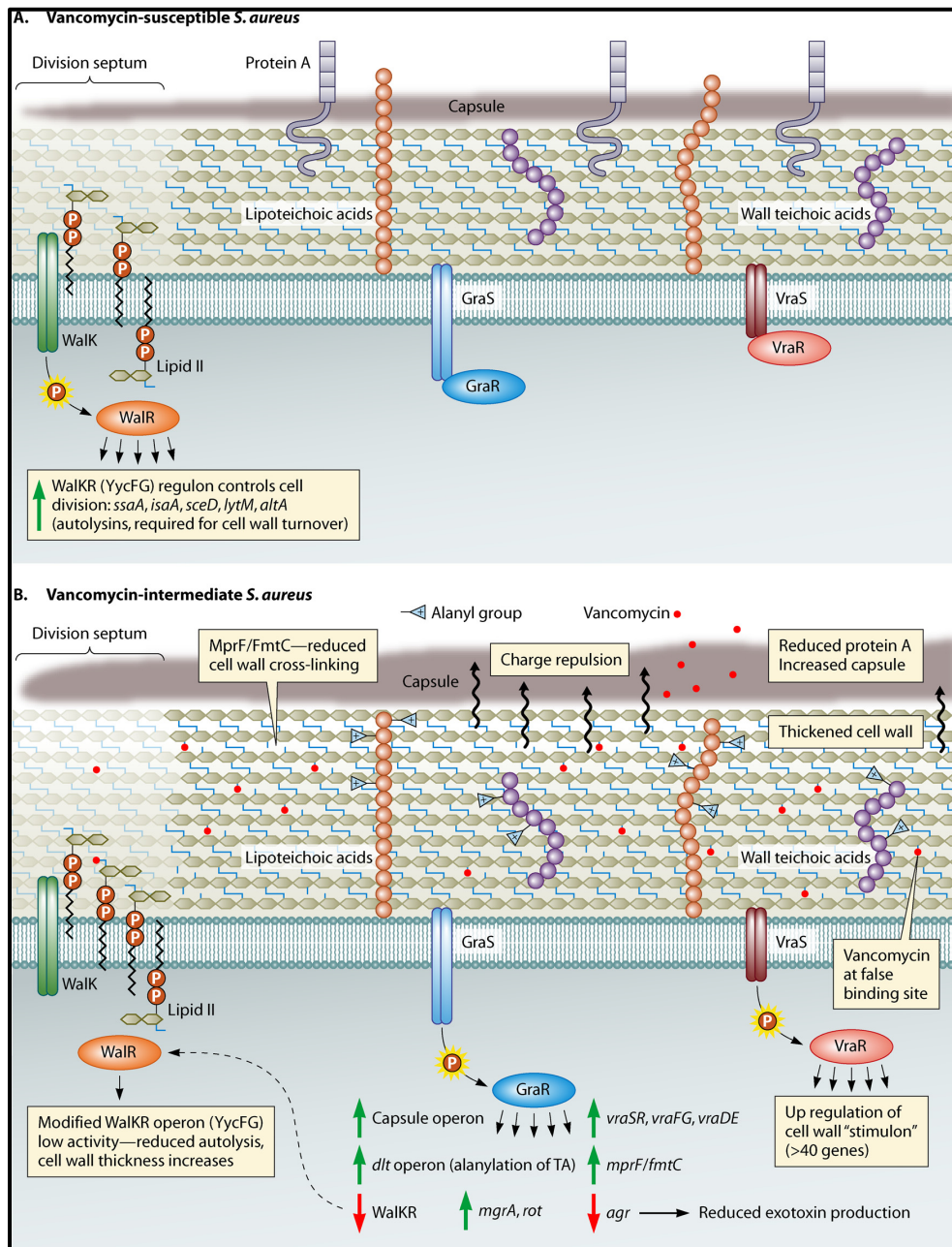


Figure I.7 : Mécanismes de résistance aux glycopeptides (26)

Le support génétique de ces mécanismes de résistance n'est pas, à l'inverse des MRSA et VRSA, lié à l'acquisition de matériel génétique étranger. Ce sont essentiellement des mutations de gènes existants, qui concernent de manière prédominante des gènes de régulation de *S. aureus* et provoquent une résistance en altérant leurs fonctions. Les loci impliqués identifiés sont nombreux, les plus fréquents étant les gènes régulateurs *walKR*, *vraRS*, *graRS* et *rpoB*. Les mutations touchant ces loci sont très nombreuses et variables (29).

2.2.1.3. Problèmes posés

Outre les problèmes thérapeutiques pour les patients, les infections par des souches multi-résistantes de *S. aureus* (SARM et GISA) sont responsables d'un risque accru de mortalité (23) (30) (29), de coûts et durées d'hospitalisation augmentés (23) (31) (29), mais aussi de l'émergence de souches d'entérocoques résistants à la vancomycine, induite par pression de sélection liée à l'usage de ces molécules dans le traitement des infections à SARM (31).

2.2.2. Epidémiologie

2.2.2.1. SARM

Les SARM sont apparus en Angleterre en 1961, puis se sont répandus sur un mode épidémique puis endémique. Ils sont longtemps restés cantonnés au milieu hospitalier, ou plus rarement chez des sujets en contact avec le milieu hospitalier, et étaient considérés comme le prototype du pathogène exclusivement nosocomial (32).

La proportion de SARM au sein de l'espèce était de 22,3 % en 2009 selon les données de l'Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) (33).

L'incidence des SARM en hospitalisation est de 0,45 pour 1000 journées d'hospitalisation. Certains services sont plus touchés que d'autres, notamment les services de soins de suite et réadaptation (54,3 % de SARM), les services de médecine (31,2 %) et de réanimation adulte (25,7 %) (33).

Le pourcentage de SARM parmi les *S. aureus* isolés dans un prélèvement à visée diagnostique dépend de l'origine du prélèvement. Il atteint 46,7 % dans les urines (33).

De nouveaux clones de SARM ont été décrits comme responsables d'infections communautaires à partir du début des années 1980, initialement aux Etats-Unis.

Ces souches de SARM communautaires (SARM Co) sont généralement moins multi-résistantes que les SARM nosocomiaux. Les gènes de résistance à la méticilline sont hébergés par la SCC*mec* de type IV. Les cinq principaux groupes clonaux de SARM Co présentent les gènes codant la PVL, soit 99 % des souches vs 2 % des SARM hospitaliers (34).

Les SARM Co sont responsables d'infections récidivantes et ont tendance à diffuser en collectivité. Les populations à risque sont les prisonniers, les toxicomanes et les communautés homosexuelles, mais des épidémies ont également été décrites chez des

sujets jeunes sans facteurs de risques connus à l'intérieur de communautés scolaires ou sportives (34).

Aux Etats-Unis, le groupe clonal USA300 est majoritaire, isolé dans 55 % des infections de la peau et des tissus mous à *S. aureus* diagnostiquées aux urgences. La sensibilité aux antibiotiques de ce clone diminue progressivement, rendant la différence avec les souches de SARM nosocomiaux plus floue (34).

En Europe, la situation épidémiologique des SARM Co est différente. Le clone majoritaire est le clone ST80 (*agr*3, PVL+, exfoliatine D +). On observe un gradient d'incidence croissante Nord-Sud, une tendance générale à l'augmentation de la prévalence et une diffusion des SARM Co en milieu hospitalier. Les résistances de ces souches aux antibiotiques sont également en augmentation, même si le phénotype majoritaire n'est résistant qu'à la pénicilline, la méticilline, la kanamycine, la tétracycline et l'acide fusidique.

En France, 0,8 % des *S. aureus* sont des SARM Co. Le principal clone est le clone « Géraldine ». Ce clone appartient au *sequence type* ST5, groupe *agr*2, SCCmec-IV et possède le gène *tst* codant la toxine de choc toxique staphylococcique. Son antibiotype est proche de celui du clone ST80.

2.2.2.2. GISA

Les premiers cas de GISA ont été rapportés au Japon en 1997, après l'utilisation importante des glycopeptides dans le traitement des infections à *S. aureus* résistants à la méticilline par augmentation de la pression de sélection (29).

Une première souche de GISA a été isolée en France en 1995. Une étude réalisée en 2002 sur 2300 souches de *S. aureus* pendant une période de 1 an a montré une prévalence des hGISA de 11 %. Aucun GISA n'a été détecté. Parmi ces souches, 2,75 % étaient des souches sensibles à la méticilline. Le génotypage des souches a mis en évidence que 88,2 % appartenaient au même clone LIM-2 que celui du premier GISA retrouvé en France à Limoges (35).

2.2.2.3. VRSA

Seule une dizaine de souches de VRSA par acquisition du gène *vanA* ont été isolés depuis leur description en 2002 (27), montrant ainsi que le transfert du transposon en cause (Tn1546, entre autres) entre les genres *Enterococcus* et *Staphylococcus* est loin d'être fréquent, et met probablement en jeu des mécanismes complexes.

2.2.3. Détection

La détection des souches multi-résistantes aux antibiotiques se fait par la réalisation d'un antibiogramme sur les souches de *S. aureus* isolées dans les sites infectés ou à partir d'une recherche de portage.

2.2.3.1. Résistance à la méticilline

Différents outils existent pour détecter la résistance à la méticilline des souches de *S. aureus*.

L'utilisation de milieux gélosés chromogènes, type gélose MRSA[®] (Biomérieux), permet dès l'isolement de suspecter une souche de *S. aureus* d'être un SARM.

Les antibiotiques tests utilisés pour détecter cette résistance dans les antibiogrammes réalisés par diffusion en milieux gélosés sont la céfoxitine et le moxalactam. Les souches catégorisées R à une ou deux de ces molécules sont résistantes à la méticilline, alors que celles catégorisées S à ces deux molécules sont sensibles. Les autres configurations (une molécule S et l'autre I) imposent la réalisation de tests complémentaires (CASFM 2013).

Des tests immunologiques permettent la détection de la PLP modifiée codée par le gène *mecA*, la PLP2a, par techniques latex ou immunochromatographique type Clearview Exact PBP2a[®] (Alere), mais elles ne mettent pas en évidence le variant *mecC*.

Les techniques de biologie moléculaire permettent quant à elles la détection des gènes de résistance à la méticilline. La recherche du gène *mecA* est réalisée en première intention. La recherche du gène *mecC* doit être effectuée sur les souches pour lesquelles la PCR *mecA* est négative et qui présentent un profil de sensibilité intermédiaire à la céfoxitine ou au moxalactam (14).

Ces méthodes peuvent être prises en défaut, notamment dans le cas des SARM de type *mecC*. En effet, les souches *mecC* présentent une résistance hétérogène à la céfoxitine, et sont de plus sensibles à l'oxacilline, molécule utilisée en dépistage dans certaines techniques en milieu liquide. Les tests de confirmations usuels (recherche de PLP2a ou du gène *mecA*) ne permettent pas de rétablir le diagnostic, ce qui explique probablement les mauvais résultats obtenus par les laboratoires français lors du Contrôle National de

Qualité organisé par l'ANSM sur ce type de souche en 2012 (33,5 % des laboratoires n'ont pas mis en évidence la résistance à la méticilline d'une telle souche).

2.2.3.2. Résistance aux glycopeptides

La recherche d'une résistance aux glycopeptides est faite par réalisation des CMI de la vancomycine et de la teicoplanine par Etest[®] sur les souches de *S. aureus* présentant des diamètres d'inhibition réduits pour ces antibiotiques. Un criblage par Etest[®] avec un inoculum lourd sur gélose cœur-cerveille peut également être effectué.

Pour les souches présentant une CMI ≥ 8 mg/L à la vancomycine ou la teicoplanine, un test de confirmation selon la technique d'Hiramatsu modifiée est indiqué, recherchant une induction de la résistance en présence du glycopeptide (14).

Pour les souches présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides confirmée par méthode phénotypique, la PCR des gènes *vanA/B* permet d'éliminer ce mécanisme de résistance (14).

2.2.3.3. Puces à ADN

La recherche de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques en une seule réaction de PCR est possible grâce à la puce ADN StaphyType[®]. Cette puce permet le criblage de 49 gènes ou variants de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques : gènes codant la PLP2a, les méthylases (*erm*), les pompes (*msrA*), certaines enzymes (*linA*) conférant la résistance aux macrolides, les enzymes altérant les aminosides, les gènes *mup* (résistance à la mupirocine) ou *qac* (résistance aux ammoniums quaternaires), ainsi que les gènes *vanA*, *vanB* et *vanZ* et la caractérisation de la cassette SCCmec (14).

2.2.4. Thérapeutique et prévention

Le traitement des infections nosocomiales à SARM repose majoritairement sur les glycopeptides, la rifampicine, l'acide fusidique, les synergistines et le linézolide (5). La daptomycine, un lipopeptide cyclique, semble également une alternative intéressante avec une efficacité comparable à celle de la vancomycine en dehors des infections pulmonaires où elle est inactivée par le surfactant (36), de même que le ceftobiprole et la ceftaroline

(37), nouvelles céphalosporines à large spectre ayant une activité sur les SARM et les GISA dans les infections compliquées de la peau et des structures cutanées (38).

Aucune recommandation spécifique n'existe en France concernant les infections à SARM Co, dans le traitement desquelles les mêmes molécules sont utilisées (34).

Les molécules généralement actives sur les GISA sont le linézolide, l'acide fusidique, l'association quinupristine-dalfopristine et la tigécycline (39). La daptomycine, le ceftobiprole et la ceftaroline sont également des alternatives dans ce contexte (37).

La prévention de l'émergence de souches de *S. aureus* BMR passe par une utilisation raisonnée des antibiotiques, et celle de leur diffusion passe par des mesures de lutte contre leur transmission (hygiène, isolement, précautions contact) (23).

2.3. Infections nosocomiales

2.3.1. Définition

La définition de l'infection nosocomiale, actualisée en 2006 par le Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins (CTINILS) et intégrée dans les infections associées aux soins (IAS), repose sur le critère discriminant du lieu d'acquisition de l'infection pour la distinction de l'infection communautaire (40).

Une infection est considérée comme une infection associée aux soins lorsqu'elle est acquise dans un établissement de santé et survient au cours ou au décours d'une prise en charge diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative d'un patient alors qu'elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge. Si l'état infectieux de début de prise en charge n'est pas connu précisément, un délai d'au moins 48 heures et supérieur à la période d'incubation est communément admis (40).

Dans le cas des infections de site opératoire (ISO), sont considérées comme IAS les infections survenant dans les 30 jours suivant l'intervention ou dans l'année qui suit s'il y a mise en place de matériel (implant, prothèse ou matériel prothétique) (40).

Les IAS représentent un coût à la fois humain, en termes de morbidité - mortalité et économique.

Une étude réalisée par le CCLIN Paris-Nord en 2006 mettait en évidence la responsabilité certaine des infections nosocomiales dans 2,8 % décès survenant dans les établissements de soins participants, permettant d'estimer à environ 4000 patients décédés d'une infection nosocomiale dans les CHU et CHG chaque année en France. L'allongement du séjour lié aux infections nosocomiales varie de 1 semaine à 1 mois (41).

Le coût global des infections nosocomiales est estimé à 760 millions d'euros en moyenne dans les pays européens (41).

2.3.2. Epidémiologie

Une enquête nationale de prévalence menée en 2012 montre que la prévalence nationale des infections nosocomiales est de 5,3 %, soit 16024 infections nosocomiales.

Les IAS les plus fréquentes sont les infections urinaires (29,9 %), les pneumopathies (16,7 %), les infections de site opératoire (13,5 %) et les bactériémies (10,1 %) (42).

S. aureus est impliqué dans 3,5 % des infections urinaires, 14,7 % des pneumopathies, 29,7 % des ISO, 18,4 % des bactériémies et 11,8 % des infections de la peau et des tissus mous. Il est responsable de 15,9 % de l'ensemble des infections nosocomiales documentées. La distribution des sites infectieux est décrite dans le tableau I.5 (42).

Tableau I.5 : Distribution des sites infectieux pour *S. aureus*

Site infectieux	Nombre	%
ISO	630	31,5
Bactériémies	319	16,0
Peau et tissus mous	310	15,5
Pneumopathies	186	9,3
Infections urinaires	168	8,4
Autres	384	19,3
Total	1997	100,0

Parmi les souches de *S. aureus* isolées, 687 (38,1 %) étaient résistantes à la méticilline et 27 (1,5 %) présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type GISA (42).

2.3.3. Diagnostic et traitement

Le diagnostic et le traitement des infections nosocomiales ne diffèrent pas de celui des infections communautaires, et reposent sur des éléments cliniques, radiologiques et des prélèvements microbiologiques adaptés.

Certaines IAS peuvent être pauci-symptomatiques, comme les infections urinaires sur sonde. Il est donc recommandé d'effectuer des dépistages par bandelettes urinaires chez les patients sondés, conduisant à une uroculture en cas de positivité (41).

2.3.4. Prévention

2.3.4.1. Mesures d'hygiène

La prévention des IAS passe par la stricte application des mesures d'hygiène et les précautions spécifiques.

Les mesures standard d'hygiène sont l'ensemble des mesures non spécifiques destinées à prévenir la transmission d'agents pathogènes entre individus (patient à patient, patient à soignant, soignant à soignant). Elles comprennent l'hygiène des mains par friction hydro-alcoolique, le port de gants, masques, lunettes et surblouses, la décontamination, stérilisation ou élimination des matériels souillés, la décontamination des surfaces souillées et le respect des règles de gestion du linge et de transport des prélèvements biologiques (40).

Des précautions spécifiques à chaque IAS et relatives à leurs facteurs de risque doivent également être respectées.

Le principal facteur de risque d'infection urinaire nosocomiale est l'existence d'une sonde urétrale. Ce risque augmente avec la durée du sondage. La prévention de ces infections repose sur des systèmes de sondage en système clos et le retrait du dispositif dès que celui-ci n'est plus indispensable.

Les pneumopathies nosocomiales sont majoritairement des pneumopathies d'inhalation chez les patients intubés-ventilés, provoquées par la flore oropharyngée et digestive colonisant les voies respiratoires par voie rétrograde. Il est donc important de prévenir les micro-inhalations et de contrôler les circuits des respirateurs avec des filtres antibactériens.

Les cathéters sont la porte d'entrée la plus fréquente des bactériémies nosocomiales, dont la prévention repose avant tout sur les limitations de manipulation des cathéters, la restriction des indications de pose, l'antisepsie cutanée régulière et l'ablation la plus précoce possible.

La prévention des ISO comprend le respect des protocoles de préparation cutanée et une chimioprophylaxie adaptée (41).

2.3.4.2. Identification et prise en charge des patients infectés ou colonisés à BMR

La prévention de la transmission des IAS à BMR (SARM et GISA pour *S. aureus*) passe par l'identification des patients porteurs de BMR et la mise en place de précautions complémentaires.

Sont considérés comme porteurs les patients déjà connus et ceux pour lesquels une BMR est mise en évidence dans des prélèvements à visée diagnostique ou à but de dépistage (23).

Un dépistage systématique de tous les patients est difficilement envisageable du fait du rapport coût/bénéfice. Le dépistage est recommandé chez tous les patients considérés à risque de portage. Les critères généralement retenus pour définir les sujets à risque sont l'hospitalisation dans un service à risque (réanimation, secteurs septiques de chirurgie et de médecine, soins de suite et de réadaptation, longs-séjours), une antibiothérapie dans les 3 mois précédents l'hospitalisation et l'existence d'une pathologie sous-jacente (néoplasie, immunodépression) (23).

Plus spécifiquement, les facteurs de risque d'acquisition de SARM sont le nombre d'occasions propices à une transmission croisée (transfert d'un autre service hospitalier, durée d'hospitalisation supérieure à 7 jours, antécédent d'hospitalisation en réanimation ou en chirurgie dans les 5 ans), l'état du patient (âge > 60 ans, pathologies graves, comorbidités, lésions cutanées ouvertes) et l'usage d'antibiotiques (C3G et fluoroquinolones) (31).

La recherche de SARM en portage s'effectue par écouvillonnage des deux narines en association avec le prélèvement des plaies pour une sensibilité de plus de 90 % (31). Les techniques bactériologiques utilisées doivent permettre de donner une réponse rapide, orientant généralement le choix des milieux de culture vers des milieux sélectifs chromogènes type gélose MRSA® (Biomérieux).

La transmission de SARM étant essentiellement manuportée, les patients identifiés comme porteurs doivent bénéficier de mesures d'isolement spécifiques comportant un isolement géographique (chambre individuelle) et un isolement technique (lavage des mains, port de gants et de surblouses systématiques). Une signalisation doit être mise en place à l'entrée de la chambre. Une étude réalisée entre 1995 et 2000 à l'hôpital Bichat-Claude-Bernard dans le service de réanimation a montré l'efficacité de ces mesures, qui

ont permis une diminution du taux d'acquisition de portage de SARM de 9,1 % à 4,2 % en 5 ans (31).

L'éradication du portage nasal de SARM par traitement à la mupirocine associée à une toilette antiseptique cutanée reste controversée. Elles permettrait une éradication à long-terme de 76 % (31), mais toutes les études ne retrouvent pas de diminution significative du nombre d'infection et une résistance à la mupirocine peut apparaître en cas d'utilisation intensive.

La recherche de portage au sein du personnel n'a pas d'indication en période endémique, mais peut être utile en phase épidémique (23), associée à une enquête épidémiologique permettant de mettre en évidence des circuits récurrents de transmission ou la recherche d'une clonalité des souches isolées.

3. Typage de *Staphylococcus aureus*

3.1. Généralités

3.1.1. Principe du typage

Le typage consiste en la différenciation de souches de micro-organismes appartenant à la même espèce. Il est basé sur l'identification de caractères présents dans l'espèce mais variables au sein de cette espèce. Il doit permettre de différencier les souches sans lien de clonalité (et donc sans lien épidémiologique) et d'associer les souches issues d'une même chaîne de transmission (43).

3.1.2. Méthodes de typage épidémiologique

Une bonne méthode de typage épidémiologique doit répondre à certains critères.

La cible doit être présente chez tous les individus de l'espèce pour permettre de typer tous les représentants de l'espèce. Le pourcentage de souches d'une espèce pouvant être typées par la technique définit sa typabilité.

La méthode d'observation / révélation du marqueur doit donner un résultat identique lors de son application successive à la même souche, définissant sa reproductibilité.

Le caractère observé ne doit pas varier au cours du temps, cette capacité définissant sa stabilité.

La technique doit permettre de différencier deux souches sans lien épidémiologique, ce qui définit son pouvoir discriminant (43).

Elle doit également permettre une bonne concordance épidémiologique, c'est à dire refléter, voire éclairer les informations épidémiologiques déjà disponibles : les isolats épidémiologiquement liés doivent être affectés à des types liés (44).

D'autres caractéristiques, plus pragmatiques, peuvent être des critères influençant le choix d'une technique de typage : la simplicité de réalisation et d'interprétation, la rapidité, l'accessibilité, le coût ou encore la polyvalence ou la flexibilité (45).

Les limites de chaque technique pour chaque microorganisme doivent être connues afin de permettre une interprétation correcte des résultats dans leur contexte épidémiologique.

Chez certains genres bactériens comme *Legionella*, 20 % des souches cliniques endémiques peuvent présenter un génotype identique, c'est-à-dire clonal, sans lien épidémique entre patients (46). Cet exemple montre l'importance de réaliser une enquête épidémiologique, associant les données bactériologiques aux données spatio-temporelles d'un ou des patients, pour affirmer un processus épidémique.

Les premières techniques de typage épidémiologique développées étaient des techniques phénotypiques, actuellement abandonnées au profit de marqueurs génotypiques en raison d'un manque de reproductibilité, d'une faible typabilité et d'un pouvoir discriminant limité. Les techniques génotypiques reposent majoritairement sur la restriction de l'ADN suivie d'une électrophorèse ou sur l'amplification génique, associée ou non au séquençage (43).

Les performances diverses des techniques de typage font que le choix de l'une d'entre elles doit dépendre de ses caractéristiques et de son adéquation à l'application recherchée.

On différencie les méthodes comparatives, visant à déterminer si deux isolats sont liés ou non, des méthodes dites « définitives » ou « bibliothèques » permettant de comparer différentes souches entre-elles, issues d'isolements récents ou plus anciens, et permettant la constitution de véritables bases de données. Pour cela, ces dernières doivent être standardisées et reproductibles (44).

3.1.3. Applications du typage

Le typage est utilisé dans des applications très diverses, allant de l'enquête autour d'infections nosocomiales à la taxonomie et de la prévention du bioterrorisme à la médecine légale (44).

3.1.3.1. Typage à visée épidémiologique

Le typage épidémiologique prend toute son importance dans les enquêtes épidémiques, essentiellement dans le cas d'une incidence en augmentation brutale et importante. Il permet alors de répondre à différentes questions : les cas observés sont-ils liés à un même clone ? Quelles sont les caractéristiques de ce clone et quel cheminement a-t-il suivi (réservoir, vecteurs, modes de transmission) ? Quels nouveaux cas sont liés au clone identifié ? Les moyens de contrôle mis en place sont-ils efficaces ? Des méthodes ont été développées pour générer des « empreintes génétiques » spécifiques d'une souche afin de

faciliter la détermination de la « parenté » entre différents isolats provenant d'épidémies ou de chaînes de transmission (44).

Les techniques de typage comparatives peuvent alors être suffisantes pour répondre à la problématique posée : deux souches isolées appartiennent-elles au même clone ou pas ? Des méthodes polyvalentes, facilement adaptables à différentes espèces et à haut pouvoir discriminant sont généralement choisies dans ces situations (43).

Des informations similaires doivent être obtenues dans la situation inverse de surveillance épidémiologique de maladies infectieuses dont l'incidence est déjà élevée en l'absence d'épidémie. L'observation par typage d'un clone devenant récurrent dans des épidémies torpides peut être l'élément déclenchant permettant de différencier une accumulation de cas d'une véritable épidémie. L'épidémie confirmée, l'étude des marqueurs épidémiologiques permettra, comme dans le cas précédent, d'identifier les réservoirs, les vecteurs, les patients infectés et les patients colonisés (43).

Les techniques permettant la constitution de bases de données sont alors nécessaires, comme la MLST (44).

3.1.3.2. Typage à visée phylogénétique ou taxonomique

Le typage permet, sur le plan phylogénétique, l'étude de l'hétérogénéité d'une espèce bactérienne à travers divers filtres : diversité génomique des souches en fonction de leur répartition géographique, de leur profil de résistance, de leur virulence ou encore de leur sérotype (43).

Cette optique a été appliquée à *S. aureus* en 2002, dans l'étude de souches de SARM producteurs de la PVL et responsables d'infections communautaires graves à travers toute la France. Il a été mis en évidence que la plupart de ces souches, retrouvées chez des patients sans lien géographique entre eux, avaient une même origine clonale de SARM Co (*mecA*+, *agr3*, PVL+) et que ce clone était issu d'une souche minoritaire de SARM (47).

L'étude de nombreux isolats est souvent nécessaire pour dégager des hypothèses phylogénétiques, orientant le choix de la technique permettant la constitution de bases de données, et donc vers des méthodes basées sur le séquençage ou vers la PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) (44).

3.1.3.3. Typage dans un but de diagnostic

Dans le cas des infections nosocomiales, le typage permet de différencier une récurrence d'une réinfection (foyer résiduel ou susceptibilité individuelle à l'infection), d'identifier le foyer à l'origine d'une infection disséminée (identification des voies de contamination) ou encore de faire la part des choses entre une infection d'origine endogène ou nosocomiale. L'intérêt peut être d'expliquer un échec thérapeutique, d'optimiser un traitement, de donner des orientations de prise en charge (ablation d'un dispositif implanté par exemple), ou encore de donner une explication physiopathologique (43).

Lorsque le typage est utilisé pour comparer des groupes de souches, virulentes ou non, des marqueurs liés à la pathogénèse peuvent être identifiés. Ces marqueurs peuvent finalement être traduits en cibles diagnostiques cliniquement pertinentes (44).

3.1.4. Stratégies de typage de *Staphylococcus aureus*

Des méthodes de typage ont été développées pour faire face aux problématiques liées à *S. aureus*. Leurs diversités découlent de l'évolution des techniques et des finalités recherchées. L'interprétation des résultats doit tenir compte des caractéristiques des marqueurs utilisés pour être correcte.

Par exemple, il a été montré que l'évolution moléculaire des *S. aureus* vers les SARM était liée à la fois à une dissémination clonale et à des transferts horizontaux de gènes. L'étude d'un grand nombre de souches de SARM a révélé que la transmission horizontale de la cassette *SCCmec* pouvait être soit très fréquente soit très rare, car les différentes cassettes *SCCmec* ont une transmissibilité très variable. Il pourrait donc être incorrect d'utiliser le gène *mecA* dans le suivi d'une épidémie nosocomiale à SARM (48).

3.2. Méthodes phénotypiques

Les techniques phénotypiques sont les plus anciennes méthodes de typage. Elles consistent à grouper les micro-organismes en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques (aspect morphologique, antigènes de surface, etc.), qui sont, elles-mêmes, la résultante de l'expression de leur génome. Elles doivent être standardisées de manière stricte, car les conditions expérimentales sont susceptibles de modifier cette expression phénotypique (44).

3.2.1. Antibiotypage

D'un coût raisonnable, facilement interprétable et réalisable par tous les laboratoires, l'utilisation de la sensibilité aux antibiotiques peut être appliquée à la majorité des espèces bactériennes avec une excellente typabilité. Cependant, son pouvoir discriminant reste limité, deux souches ayant fréquemment le même profil de résistance aux antibiotiques sans être liées épidémiologiquement. A l'inverse, l'acquisition fréquente de certains éléments génétiques mobiles par transmission horizontale, telles certaines cassettes *SCCmec*, fait que la concordance épidémiologique de l'antibiotype est faible.

Une étude comparative des méthodes de typage de *S. aureus* réalisée en 1994 par Tenover a montré la capacité de la technique (utilisant 12 antibiotiques) à grouper 26 des 29 isolats testés liés épidémiologiquement sans permettre de les séparer de 6 autres isolats non liés. La reproductibilité était de 100 %. Les performances de la méthode sont bien meilleures en utilisant les diamètres des zones d'inhibition que la catégorisation sensible, intermédiaire ou résistante. Des modifications importantes de diamètre ont été observées pour deux isolats liés, les faisant classer dans des groupes différents et mettant en évidence l'instabilité de la résistance aux antibiotiques de *S. aureus*, liée probablement à des éléments génétiques mobiles. La technique permet cependant un premier criblage, particulièrement dans les laboratoires de petites tailles (49).

3.2.2. Lysotypage ou « *bacteriophage typing* »

La lysotypie étudie la sensibilité des bactéries à l'infection par des bactériophages. Cette sensibilité diffère d'une souche à l'autre au sein de certaines espèces, dont *S. aureus*, autorisant son utilisation pour le typage. Elle requiert l'utilisation d'un panel de bactériophages. Décrit par Barber en 1961, le lysotypage fut considéré comme le *gold-standard* jusqu'à l'avènement des techniques de biologie moléculaire (50).

L'étude de Tenover a montré une typabilité de *S. aureus* de 89 % et une reproductibilité de 100 %. Vingt-cinq des 29 isolats liés épidémiologiquement ont été classés dans le même groupe, alors que 4 autres ont été rapprochés par erreur. Si la technique est aisée à mettre en œuvre, le titrage, la difficulté à maintenir le stock de phages et l'interprétation des résultats s'avèrent plus laborieux (49).

3.2.3. Autres marqueurs phénotypiques

La MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) est une migration sur gel après extraction des enzymes du métabolisme de la bactérie. Les variations de migration, liées aux différences de charges, sont le reflet des variations alléliques. Utilisée majoritairement dans le génotypage des populations, ses difficultés de mise en œuvre ne permettent pas son utilisation en routine. Elle est remplacée par son pendant moléculaire, la MLST (44).

Le biotypage est basé sur des propriétés telles que l'aspect morphologique, les caractéristiques de croissance et les caractères biochimiques de la bactérie. S'il est utile pour l'identification bactérienne, ses performances en tant que marqueur épidémiologique sont insuffisantes (17 souches correctement classées sur 29 dans l'étude de Tenover) (49).

3.3. Méthodes génotypiques

Face aux performances limitées des marqueurs phénotypiques, de nombreuses techniques génotypiques reposant sur le polymorphisme de l'ADN ont été développées. Elles sont basées principalement soit sur la restriction de l'ADN suivie d'une électrophorèse soit sur l'amplification préalable de certains gènes.

3.3.1. Méthodes historiques

La RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) est une des premières méthodes appliquées au génotypage de *S. aureus*. Une enzyme de restriction reconnaissant une courte séquence spécifique d'ADN est utilisée pour couper l'ADN génomique du micro-organisme étudié en fragments, qui sont ensuite séparés par migration sur gel en fonction de leurs tailles (44). Les sites de coupure dépendant du contenu génomique, chaque organisme possède son propre profil de restriction. Les enzymes de restriction les plus fréquemment utilisées, *EcoRI* ou *BglII* génèrent un grand nombre de petites bandes, rendant la lecture des profils de restriction difficile.

Une hybridation avec des sondes nucléiques (*Southern blotting*) peut être couplée avec cette technique. Après migration standardisée en gel d'agarose, les fragments générés sont transférés sur une membrane et hybridés avec une sonde marquée, sélectionnée pour reconnaître des séquences répétées en divers endroits du génome. C'est le principe du ribotypage, qui utilise une sonde spécifique du gène de l'ARN ribosomique 16S et 23S. Le

ribotypage est une technique reproductible et rapide possédant une forte typabilité. Sa concordance épidémiologique est excellente, mais son pouvoir discriminant insuffisant (toutes les souches liées épidémiologiquement ont été regroupées, mais 7 souches non liées n'ont pu être séparées dans l'étude de Tenover en 1994) (49).

3.3.2. PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*)

Cette technique est, elle aussi, basée sur la digestion de l'ADN bactérien total par des enzymes de restriction, mais qui possèdent dans ce cas peu de sites de coupure (macro-restriction) car ils sont situés dans des séquences palindromiques. Les fragments générés, de grandes tailles (de 20 kb à plus de 1 Mb), ne peuvent être séparés par une électrophorèse en gel d'agarose conventionnelle dont l'efficacité est optimale pour des fragments de moins de 30 kb. La séparation est alors réalisée par migration en champ électrique d'orientation variable (champ pulsé). Les fragments les plus grands se réorientent plus lentement à chaque modification du champ électrique, et migrent par conséquent plus lentement. L'appartenance au même pulsotype est définie par une similarité du profil de migration supérieure à 80 % en général, complétée des critères de Tenover (51). Sa reproductibilité faible a été sensiblement améliorée par l'utilisation de logiciels d'analyse visuelle, mais l'absence de standardisation ne permet pas la portabilité des résultats. La PFGE est considérée comme le *gold-standard* pour le génotypage bactérien depuis les années 1980 (45).

La PFGE est, aujourd'hui encore, une des techniques de typage de *S. aureus* qui a le plus fort pouvoir discriminant. Elle est considérée comme le *gold-standard* pour l'investigation des épidémies de SARM hospitaliers. L'enzyme de restriction utilisée est *SmaI*. Sa typabilité est excellente, de même que sa concordance épidémiologique. Les limites de la technique sont sa lenteur d'exécution (4 à 5 jours environ), son coût élevé et une mauvaise reproductibilité inter-laboratoires, ne permettant pas la comparabilité des résultats et la constitution de bases de données internationales (24).

3.3.3. RAPD (*random amplified polymorphic DNA*)

La RAPD, également appelée AP-PCR (*arbitrarily primed polymerase chain reaction*), est basée sur l'amplification aléatoire de séquences d'ADN bactérien total à l'aide d'amorces courtes (taille inférieure à 14 pb) dans des conditions de faible stringence facilitant l'hybridation, même en cas de concordance imparfaite entre les amorces et l'ADN bactérien, et donc l'amplification. Le choix des amorces est empirique, et ne nécessite

donc aucune étude préalable du génome à typer. En résultent des fragments dont le nombre et la taille varient selon la souche. La révélation est faite par électrophorèse en gel. La méthode est simple, son spectre d'application large, sa typabilité est de 100 %, et son pouvoir discriminant est bon, même s'il est souvent considéré comme inférieur à celui de la PFGE. Son inconvénient majeur est son manque de reproductibilité, influencé par de multiples facteurs : concentration en Taq polymérase, en amorces, type de tampon, de thermocycleur, d'électrophorèse, etc. (45).

L'étude réalisée en 1995 par Tambic sur des SARM montre une bonne corrélation avec la PFGE, un pouvoir discriminant nettement supérieur à celui du lysotypage et équivalent à celui de la PFGE, ce qui n'est pas retrouvé par toutes les études (52).

3.3.4. Rep-PCR (*repetitive palindromic extragenic element PCR*)

La rep-PCR est basée sur l'amplification de fragments d'ADN situés entre des éléments répétés, génétiquement stables, tout au long du génome et présents en un nombre variable de copies réparties de manière aléatoire dans de nombreux organismes. Si ces éléments répétés sont localisés de manière rapprochée dans le génome, ils peuvent être amplifiés par PCR au moyen d'amorces spécifiques. Plusieurs amplicons sont en général obtenus, dont la taille et le nombre varient d'une souche à l'autre, et séparés par électrophorèse. Les plus communément employés sont des éléments répétitifs palindromiques extragéniques, d'une longueur de 33 à 40 pb. Il est théoriquement possible d'obtenir une reproductibilité et une spécificité importante du fait de la longueur des amorces, mais la technique souffre en pratique des mêmes problèmes de reproductibilité que la RAPD. L'automatisation de la technique, proposée par le DiversiLab System® de Biomérieux, devrait permettre de palier en partie ce problème en standardisant l'extraction de l'ADN, sa concentration, la microélectrophorèse, la détection et la constitution de bases de données (45).

L'étude multicentrique visant à évaluer les performances du génotypage des SARM par 3 Rep-PCR, publiée par Deplano en 2000, montre une reproductibilité de 80 %, un pouvoir discriminant de 83 % et une concordance avec la PFGE comprise entre 70 et 90 % selon les laboratoires. La reproductibilité de la technique n'était pas suffisante pour permettre des échanges de données brutes entre les différents laboratoires participants (53).

3.3.5. SCC*mec* typing

La cassette SCC*mec* est l'élément génétique mobile hétérogène porteur des gènes à l'origine de la résistance à la méticilline. La variabilité de cet élément est grande, les différences de séquences observées entre les différents types pouvant atteindre 59 % (54). Les variations détectées dans les gènes de régulation de *mecA* (*mecI* et *mecR1*), principalement des délétions ou des insertions partielles, permettent de séparer le complexe *mec* en 4 classes A, B, C et D. Les gènes codant les recombinases, qui sont responsables de l'intégration et de l'excision de la cassette, forment eux le complexe *ccr*. Six types de *ccr* ont été caractérisés : *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4*, *ccrC1* et *ccrC2*. La combinaison des classes *mec*, des types de *ccr* et des jonctions J1, J2 et J3 entre ces éléments permet de définir le type de cassette SCC*mec* (14).

Il a été observé que les SARM responsables d'infections nosocomiales et ceux responsables d'infections communautaires (SCC*mec* IV) n'étaient pas porteurs des mêmes types de cassettes SCC*mec* (45). Ce marqueur a été utilisé dans de nombreuses études épidémiologiques portant sur les SARM et permet l'étude des liens phylogénétiques entre les souches (55). Il est considéré comme un bon outil pour l'investigation de l'épidémiologie des SARM et a gagné en importance avec l'apparition des SARM Co (24).

La structure de l'élément SCC*mec* peut être déterminée par différents types de PCR. Actuellement, les dernières techniques développées sont des PCR multiplexes, souvent accompagnées du séquençage du locus *ccrB*.

Cependant, les techniques actuelles ne permettent pas la caractérisation des 46 types et sous-types de SCC*mec*, ce qui nécessiterait un trop grand nombre de cibles. La détermination des SNP (*single nucleotide polymorphisms*) du gène *mecA* pourrait augmenter la résolution globale de la méthode, car différents allèles ont été identifiés dans des cassettes SCC*mec* identiques par ailleurs (24).

3.3.6. Séquençage du locus *spa* (*spa*-typing)

Cette technique, développée par Freney *et al.* en 1996, est basée sur le séquençage d'un locus unique, celui du gène codant la protéine A (*spa*) de *S. aureus*. Cette région, appelée région polymorphique X, est composée principalement de 3 à 15 répétitions d'une séquence de 24 pb dont la diversité est liée à des mutations ponctuelles, des délétions ou des duplications de répétitions. L'étude de souches de SARM a révélé que cette région est

suffisamment stable pour le typage épidémiologique. La technique a été comparée au lysotypage, avec lequel elle montre une bonne concordance et une meilleure sensibilité (56).

La comparaison de cette méthode avec la PFGE et la MLST publiée par Malachowa en 2005 montre un pouvoir discriminant compris entre celui de la PFGE et celui de la MLST (57). La concordance entre ces méthodes est bonne (14). Le séquençage d'une région unique en fait une technique moins coûteuse que la MLST, mais aussi moins laborieuse et moins chronophage. Un logiciel d'exploitation des données est disponible pour l'analyse des chromatogrammes et permet la comparaison inter-laboratoires des résultats malgré l'existence de deux nomenclatures d'expression des résultats différentes, en attribuant un numéro à chaque variation du nombre ou de la séquence de chaque répétition (24).

Le *spa*-typing est une technique utilisable à la fois pour le suivi de l'évolution moléculaire de l'espèce et pour le suivi des épidémies hospitalières (24).

L'inconvénient de la technique est son pouvoir discriminant : sans être faible, il ne permet pas toujours de séparer deux clones différents possédant le même *spa*-type. Cet écueil peut néanmoins être facilement pallié par le couplage à un autre marqueur génétique, comme le typage de la cassette *SCCmec* (24).

3.3.7. MLST (*multi-locus sequence typing*)

La MLST est basée sur l'analyse par séquençage de 7 gènes de ménage conservés au sein de l'espèce *S. aureus* : *arcC* (carbamate kinase), *aroE* (shikimate déshydrogenase), *glpF* (glycerol kinase), *gmk* (guanylate kinase), *pta* (phosphate acétyltransferase), *tpi* (triosephosphate isomérase) et *yqiL* (acétyl-coenzyme A acétyltransferase). Chaque fragment mesure environ 500 pb. Un numéro d'allèle est assigné à chaque type de séquence de chaque gène de ménage. Environ 30 allèles sont décrits pour chaque gène de ménage. La composition en allèles de chaque souche, ou profil allélique, définit le *sequence type* (ST) de la souche. Deux isolats présentant au moins 5 allèles identiques sont considérés comme génétiquement liés et peuvent être regroupés au sein d'une unité appelée complexe clonal (CC). La nomenclature des SARM utilise généralement le ST couplé au type *SCCmec* pour nommer une souche (24).

Les avantages de la méthode sont un bon pouvoir discriminant et une excellente reproductibilité, rendant possible la portabilité des données par expression des résultats en

une suite de chiffres, et la constitution de bases de données internationales. Une base de données contenant des milliers de séquences est d'ailleurs disponible sur internet (<http://www.mlst.net>), permettant une comparaison rapide des souches dans un contexte épidémique, mais aussi les analyses de génétique des populations et la phylogénie. Le temps nécessaire à la réalisation et à l'interprétation des données ainsi que son coût élevé représentent les principaux facteurs limitant de la MLST (58).

3.3.8. MLVA (*multi-locus variable number tandem repeat analysis*)

La MLVA exploite la variation de nombre de motifs répétés en tandem. Cette technique est celle utilisée en médecine légale pour la détermination des empreintes génétiques. L'amplification d'un nombre prédéfini de loci suivie de la mesure de la taille de chaque fragment permet d'assigner à chaque souche une série de nombres correspondant aux nombres de répétitions pour chaque locus. Le nombre de répétitions de chaque locus est spécifique de chaque souche (14). La révélation est possible soit par migration par électrophorèse en gel d'agarose, soit par séquençage des fragments amplifiés.

L'application de la MLVA à *S. aureus* a été possible après la découverte de nombreux VNTR (*variable number tandem repeats*) dans son génome, identifiés grâce au séquençage complet de différentes souches de *S. aureus*. Huit cent trente trois *tandem-repeats* ont été ainsi identifiés dans le génome de *S. aureus*, dont 8,5 % sont polymorphes (2 allèles au minimum ont été identifiés). Parmi ceux-ci, 87 % ont une longueur totale de plus de 80 pb et une conservation des unités répétées de plus de 80 %, ce qui fait de *S. aureus* un bon candidat pour la MLVA (59).

L'utilisation d'un schéma de MLVA a été appliquée pour la première fois au typage de *S. aureus* en 2002 par Sabat *et al.* Cinq loci de VNTR ont été utilisés, comprenant *sdr*, *clfA*, *clfB*, *ssp* et *spa*. Les séquences répétées comportent de 9 à 81 pb. La longueur des fragments amplifiés a été mesurée par électrophorèse en gel (figure I.8). Toutes les souches étudiées ont pu être typées. La méthode a été comparée au *gold-standard*, la PFGE, et a donné des résultats comparables avec une excellente reproductibilité, un fort pouvoir discriminant, au moins équivalent à celui de la PFGE ou de la RAPD (58).

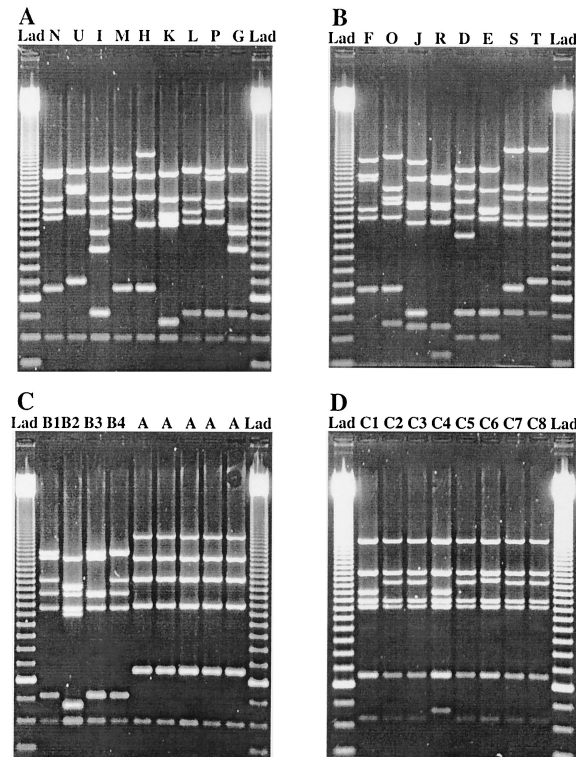


Figure I.8 : Profil MLVA de 34 souches de *S. aureus*, nommées par leur pulsotype (58)

Ikawaty *et al.* ont montré des performances équivalentes par comparaison à la MLST et au *spa*-typing avec un schéma de MLVA utilisant 7 VNTR, nommés SIRUs (*staphylococcal interspersed repeat units*) comportant 24 à 131 pb et répétés de 1 à 26 fois. L'étude a montré un pouvoir discriminant de la MLVA (0,987) supérieur à celui de la MLST (0,941) ou du *spa*-typing (0,963), avec une excellente typabilité. La comparaison ultérieure de ce schéma avec la PFGE a également montré le pouvoir discriminant supérieur de la MLVA sur cette dernière (0,971 vs 0,908). Les différentes méthodes testées donnent par ailleurs des résultats globalement concordants (60).

En 2008, Pourcel *et al.* ont publié un schéma de MLVA comportant 10 VNTR de première intention, et 4 VNTR complémentaires. Ces VNTR appartiennent aux gènes *spa*, *coa*, à des *S. aureus repeat elements* (STAR) ou à des éléments intergéniques. Les unités répétées comprennent entre 24 et 159 pb. La révélation est faite par migration sur gel d'agarose. La méthode s'est avérée être parfaitement reproductible et stable après repiquage des souches, et avoir une bonne typabilité. La comparaison avec la MLST et le *spa*-typing a montré des résultats globalement concordants entre les techniques et un plus

grand pouvoir discriminant de la MLVA. L'expression des résultats en une suite de chiffres permet leur portabilité (61).

Chaque étude a mis en évidence la simplicité de la méthode, son faible coût et sa facilité d'interprétation. Sa répétabilité intra comme inter-laboratoires, permettant la constitution de bases de données internationales, associée à son fort pouvoir discriminant, font de la MLVA une des techniques de typage de *S. aureus* les plus réactives et performantes.

PARTIE 2 : TYPAGE MOLECULAIRE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PAR TECHNIQUE MULTI-LOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM ANALYSIS AVEC DETECTION EN HIGH RESOLUTION MELTING

1. Contexte scientifique : technologie HRM

1.1. Principe de l'HRM

La technologie de fusion haute résolution (FHR), plus communément appelée HRM pour *high resolution melting*, est une extension de l'analyse en courbe de fusion utilisée en PCR en temps réel depuis 1997 avec des agents marqués se liant à l'ADN double-brin de type SYBR Green I.

Son principe repose sur la détermination de la température de fusion des fragments préalablement amplifiés (figure II.1) par PCR. Cette température de fusion varie selon le nombre, le type de nucléotides et la spécificité de leur appariement.

La caractérisation des amplicons se fait par acquisition d'une courbe de fusion (figure II.2) en fin de PCR, obtenue par la mesure en continu (25 acquisitions par degré Celsius) de la fluorescence lors de l'augmentation progressive de la température de 55 °C à 95 °C par paliers de 0,01 à 0,05 °C (62).

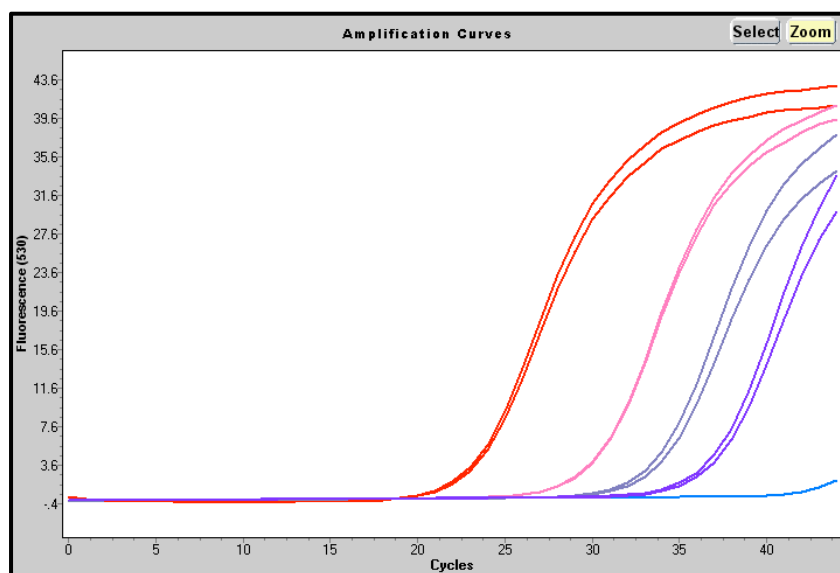


Figure II.1 : Courbes d'amplification

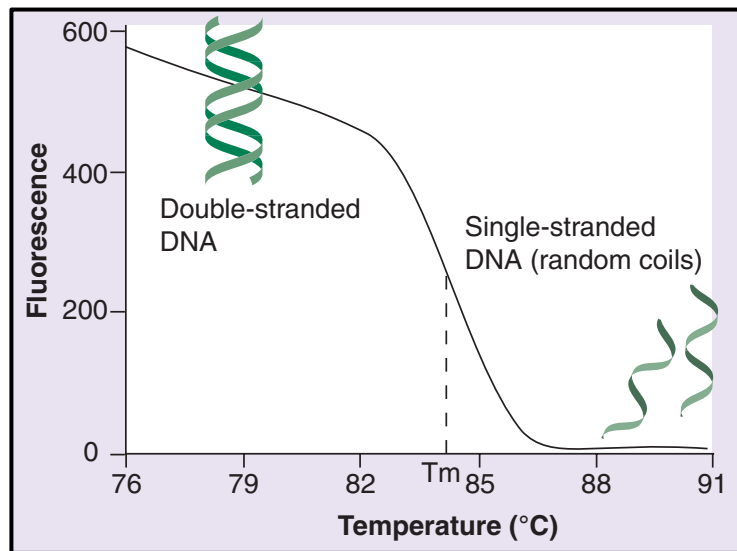


Figure II.2 : Courbe de fusion

La dérivée première de la courbe (figure II.3) permet la visualisation d'un pic, appelé température de fusion (T_m). Le T_m est la température pour laquelle 50% de l'ADN double-brin est dénaturé. Il dépend du type et du nombre de nucléotides composant les amplicons.

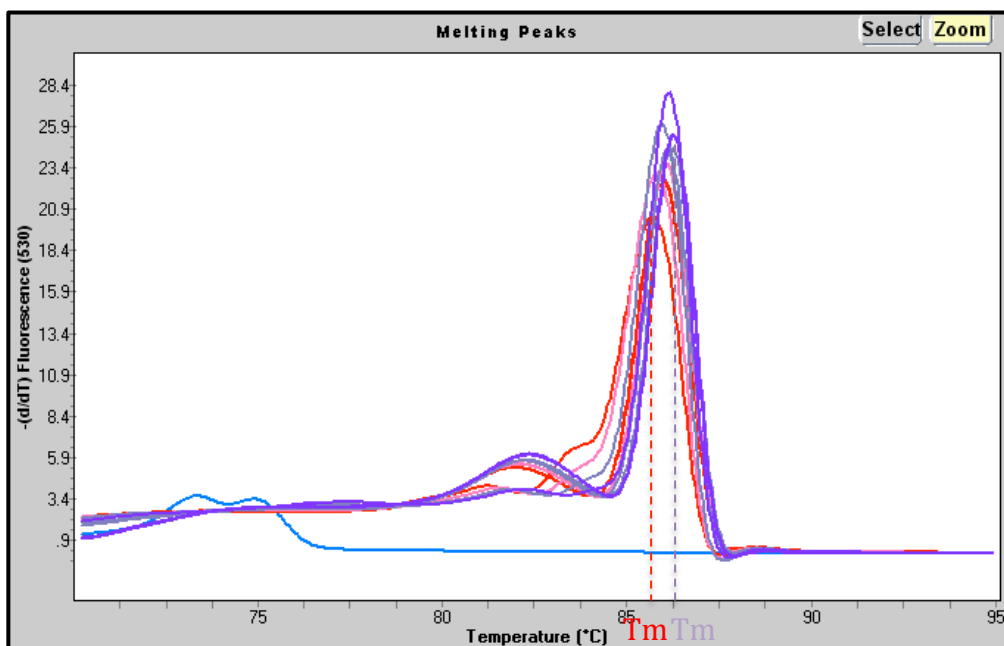


Figure II.3 : Pics de fusion

Des changements minimes de fluorescence doivent pouvoir être observés lors de l'acquisition des courbes de fusion afin de permettre une détermination fine et précise du T_m . Pour cela, la résolution de la courbe de fusion a été optimisée par l'utilisation d'une instrumentation spécifique et de réactions de PCR adaptées (63).

1.2. Avantages de l'HRM

L'acquisition d'une courbe de fusion haute résolution se fait dans le même capillaire que celui utilisé pour l'amplification, généralement sur le thermocycleur ayant réalisé la réaction de PCR, et dans les suites immédiates de la PCR. La durée d'acquisition est environ de deux minutes par capillaire.

Elle ne nécessite donc aucune étape de manipulation ou de traitement post-PCR, ce qui en fait une technique beaucoup plus rapide et simple que les autres méthodes de détection utilisées pour le typage moléculaire. De plus, l'analyse en système clos diminue très fortement le risque de contaminations.

Aucun équipement spécifique n'est requis, si ce n'est un thermocycleur possédant la fonction d'acquisition de la fusion haute résolution, et dont le coût est modéré en regard des méthodes de référence (PFGE, séquençage, etc.).

Cette technique présente donc de nombreux avantages pratiques : rapidité, faible coût, accessibilité. De plus, l'HRM est une méthode non spécifique de détection des mutations, permettant de détecter des mutations présentes sur la séquence amplifiée, que celles-ci soient connues ou non. Cette caractéristique présente un avantage pour une technique de criblage large et rapide (63).

1.3. Aspects techniques de l'HRM

L'acquisition de courbes de fusion optimisées impose de satisfaire à certaines exigences quant au choix des techniques, des réactifs et des automates.

1.3.1. Mode de détection de la PCR

Différents modes de détection de la PCR en temps réel peuvent être utilisés.

1.3.1.1. Agents se liant à l'ADN double-brin

Classiquement, les PCR réalisées en vue de l'utilisation de la fusion haute résolution sont des PCR utilisant un fluorochrome se liant à l'ADN double brin.

Ces composés, peu fluorescents à l'état libre, se lient à l'ADN double brin dans le sillon mineur, provoquant une augmentation de l'émission de fluorescence (figure II.4) (64). La quantité d'ADN est mesurée tout au long de la PCR par mesure de la fluorescence émise en phase d'élongation, dont l'émission est directement proportionnelle au nombre d'amplicons produits.

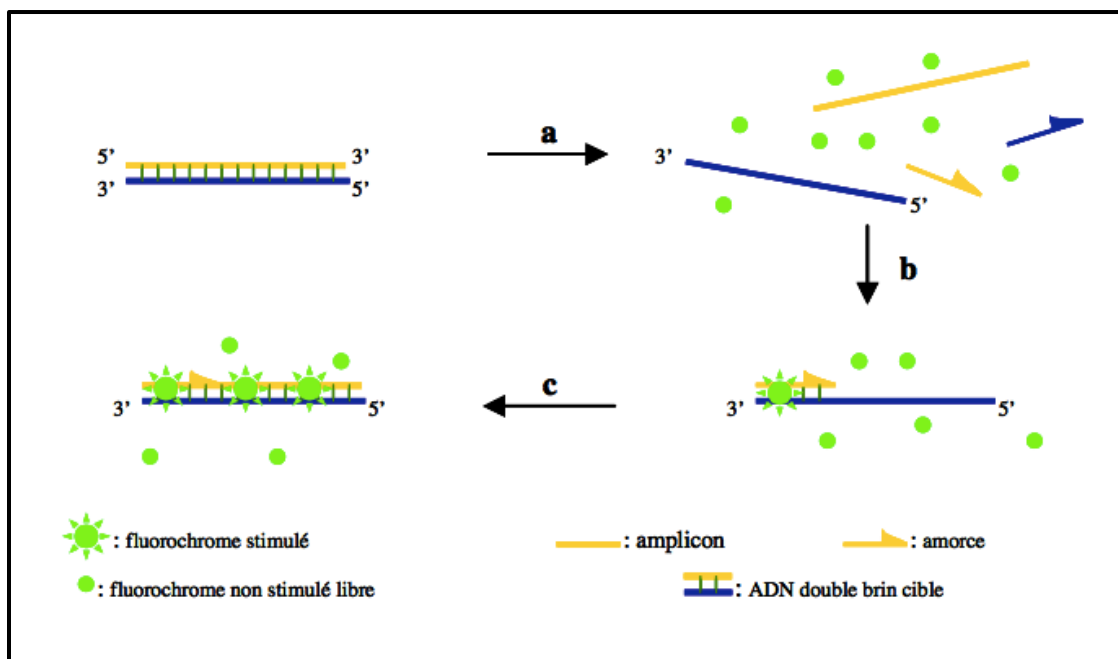


Figure II.4 : Agents se liant à l'ADN double brin (64)

- (a) Dénaturation : le fluorochrome exhibe peu de fluorescence.
- (b) Température d'appariement : l'agent intercalant se lie au double brin d'ADN, en résulte une émission de fluorescence.
- (c) Elongation : la fluorescence est maximale en fin de phase, où elle est mesurée.

L'acquisition de la courbe de fusion en fin de PCR permet de visualiser la libération du fluorochrome lors de l'augmentation progressive de la température, provoquée par la dénaturation de l'ADN double-brin.

1.3.1.2. Sondes d'hybridation

La technologie HRM peut également faire appel à des PCR utilisant des sondes d'hybridation de type FRET (*fluorescence resonance energy transfer*).

La méthode repose sur l'utilisation de deux sondes complémentaires, choisies de façon à s'hybrider à leurs séquences cibles en n'étant séparées que de 1 à 5 nucléotides pour maximiser la spécificité du signal (65). La première sonde est bloquée à son extrémité 3' afin de prévenir son extension durant la phase d'élongation. Elle porte à cette extrémité un fluorochrome donneur (FITC) produisant une lumière fluorescente verte lorsqu'il est excité par une source de lumière.

Cette émission de fluorescence excite le fluorochrome accepteur attaché à l'extrémité 5' de la seconde sonde, qui émet alors une fluorescence rouge lorsque ce dernier est à proximité (figure II.5).

Le transfert d'énergie par le principe FRET dépend de la distance existant entre les sondes. Tant qu'elles ne sont pas fixées à l'ADN, elles sont séparées et aucune fluorescence rouge n'est mesurée. Pendant l'étape d'hybridation, les deux sondes se fixent à leurs séquences cibles respectives. La proximité des deux fluorochromes permet le transfert énergétique de la fluorescence verte par le fluorochrome donneur au fluorochrome rouge accepteur et provoque son émission fluorescente.

L'étape de polymérisation sépare les deux sondes, supprimant ainsi l'émission de fluorescence rouge (64). L'accroissement de la fluorescence rouge au cours de la PCR est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé durant la réaction.

polymérase « *hot start* » permettant d'éviter tout début de réaction intempestif et, ce faisant, la production d'amplifications non spécifiques (63).

Les recommandations relatives aux conditions de PCR avec HRM préconisent d'obtenir des produits d'amplification courts, avec un optimum entre 100 et 250 paires de bases, et un maximum de 500 paires de bases. Les fragments de tailles supérieures sont susceptibles de posséder plusieurs domaines de fusion, compliquant l'interprétation (63).

La quantité d'ADN purifié utilisée doit être de 5 à 30 ng par réaction, et la même procédure de purification et le même tampon doivent être utilisés pour tous les échantillons. De plus, la concentration en ADN doit être ajustée pour tous les échantillons afin d'éviter les dispersions en point final des courbes de fusion. Il est préférable d'obtenir un cycle seuil (CT) inférieur à 30 cycles d'amplification (63).

Les paramètres les plus fréquemment utilisés pour obtenir une PCR efficace sont des concentrations en amorces de 0,1 à 0,3 μM , une température d'hybridation moyenne de 60 °C (58 – 63 °C), une concentration en MgCl_2 de 3 mM, une température de fusion comprise entre 65 et 95 °C et 25 acquisitions par degré Celsius (63).

1.3.2. Agent marqué se liant à l'ADN double-brin

Dans le cas de l'utilisation d'un agent marqué se liant à l'ADN double brin, ses caractéristiques sont des éléments clefs de la technique, et doivent répondre à certaines exigences (63).

Comme tous les agents intercalants utilisés en PCR temps réel, leur fluorescence à l'état libre doit être la plus faible possible, et augmenter fortement à l'état lié à l'ADN double brin afin d'avoir un différentiel d'émission de fluorescence maximal.

Il ne doit pas se fixer à l'ADN simple brin, sous peine d'obtenir une mauvaise spécificité de la courbe de fusion.

Les agents marqués utilisés en HRM sont ajoutés à fortes concentrations dans les réactions de PCR afin de permettre une saturation maximale de l'ADN double brin, et donc une meilleure résolution de la technique. Il est donc nécessaire d'utiliser des agents qui ne soient pas toxiques pour la réaction enzymatique de PCR, même à forte concentration, pour ne pas altérer l'efficacité de la PCR. De plus, leur densité intercalante doit être

importante, avec un optimum recherché d'une molécule intercalante par paire de bases, soit une densité dix fois supérieure à celle du Sybr Green I, intercalant conventionnel le plus utilisé en PCR en temps réel (66). La saturation en molécule intercalante permet également de limiter la redistribution du fluorochrome durant la phase de fusion haute résolution (figure II.6). Celle-ci doit être la plus faible possible pour ne pas fausser les données. Lorsque les fragments analysés par HRM possèdent plusieurs domaines de fusion, une redistribution de fluorescence au cours de l'acquisition a pour effet d'écraser les pics (figure II.7) ayant les températures de fusion les plus basses, pouvant même les faire disparaître et rendre les données inexploitable (67).

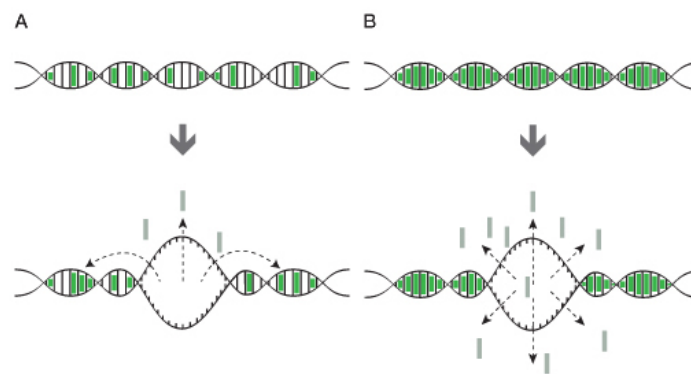


Figure II.6 : Redistribution de fluorescence en fonction de la saturation (66)

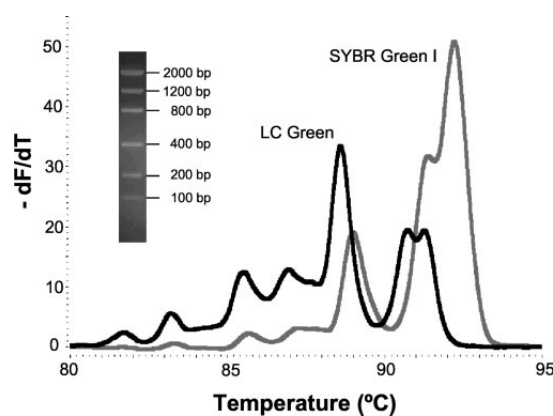


Figure II.7 : Effet de la redistribution de fluorescence lors de l'utilisation de SYBRGreen vs LCGreen (67)

Enfin, pour certaines applications telles que la recherche de mutations à l'état hétérozygotes, il doit permettre la formation d'hétéroduplex.

Les molécules répondant à ces caractéristiques les plus couramment utilisées sont le EvaGreen® (Medibena), le ResoLight® (Roche) ou encore le LCGreen® (Idaho Technology).

1.3.3. Automates

Les prérequis techniques pour augmenter la résolution de la courbe de fusion sont une bonne homogénéité de température du thermocycleur et une grande sensibilité optique du scanner (63). Les instruments utilisés pour l'HRM doivent de plus permettre un nombre élevé d'acquisitions par seconde.

Plusieurs automates permettent l'amplification et la détection par HRM : l'ABI 7500[®] (Applied Biosystems), le RotorGene[®] (Qiagen), le LightCycler480 (Roche Diagnostics[®]) et le LightScanner32[®] (Idaho Technology).

Il est également possible de coupler un thermocycleur standard à un scanner HRM type LightScanner[®] (Idaho Technology), qui réalise l'acquisition de la courbe de fusion haute résolution après la PCR et permet l'utilisation des mêmes capillaires.

1.4. Analyse des courbes de fusion

L'exploitation des courbes de fusion haute résolution permet une analyse plus fine et plus informative que le simple T_m .

La normalisation des courbes consiste en une standardisation de la fluorescence entre les différents capillaires, transformant la valeur absolue de mesure du signal en une fluorescence relative : pour chaque échantillon, 100 % représente le signal pré-fusion, 0 % le signal post-fusion (figure II.8). Les courbes ainsi obtenues sont plus comparables.

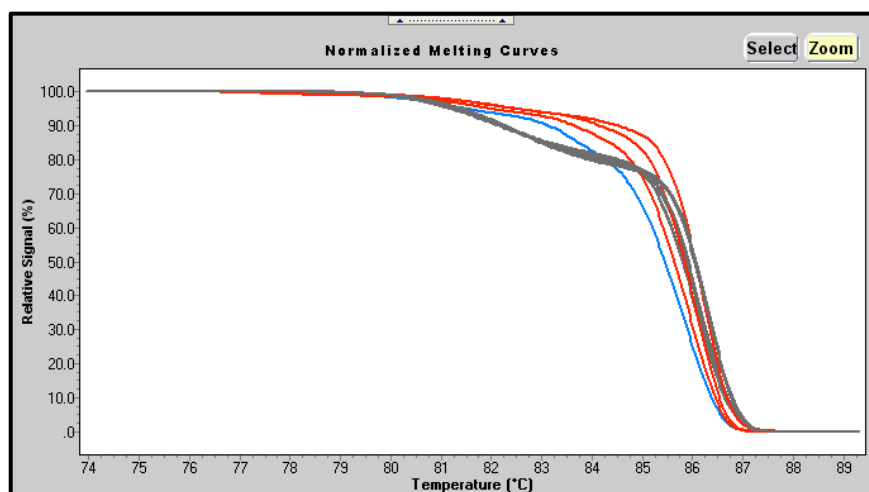


Figure II.8 : Courbes de fusion normalisées

Dans certains cas, une normalisation du signal ou « *T_m shift* » est utilisée pour compenser la dispersion entre les échantillons d'un même groupe et en améliorer l'homogénéité : l'axe de chaque courbe est ajusté à un niveau défini de fluorescence dans le but de les superposer (figure II.9). Ce niveau de fluorescence correspond au point où la totalité de l'ADN double brin est complètement dénaturé, par défaut 5 %. Cette opération permet une meilleure séparation des groupes hétéroduplex – homoduplex.

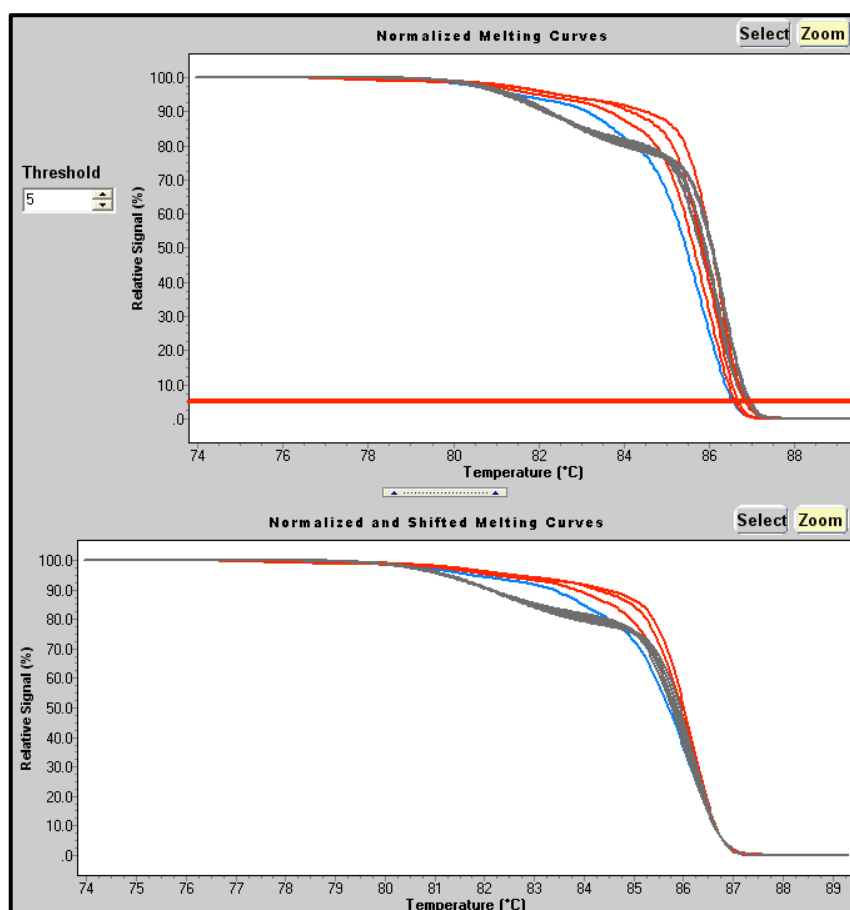


Figure II.9 : Courbes de fusion avec normalisation du signal

Les différents génotypes sont plus facilement mis en évidence par la « *difference plot* » : la courbe de fusion normalisée d'une souche choisie comme souche de référence est soustraite aux autres courbes de fusion, donnant un aspect en grappe des génotypes identiques (figure II.10).

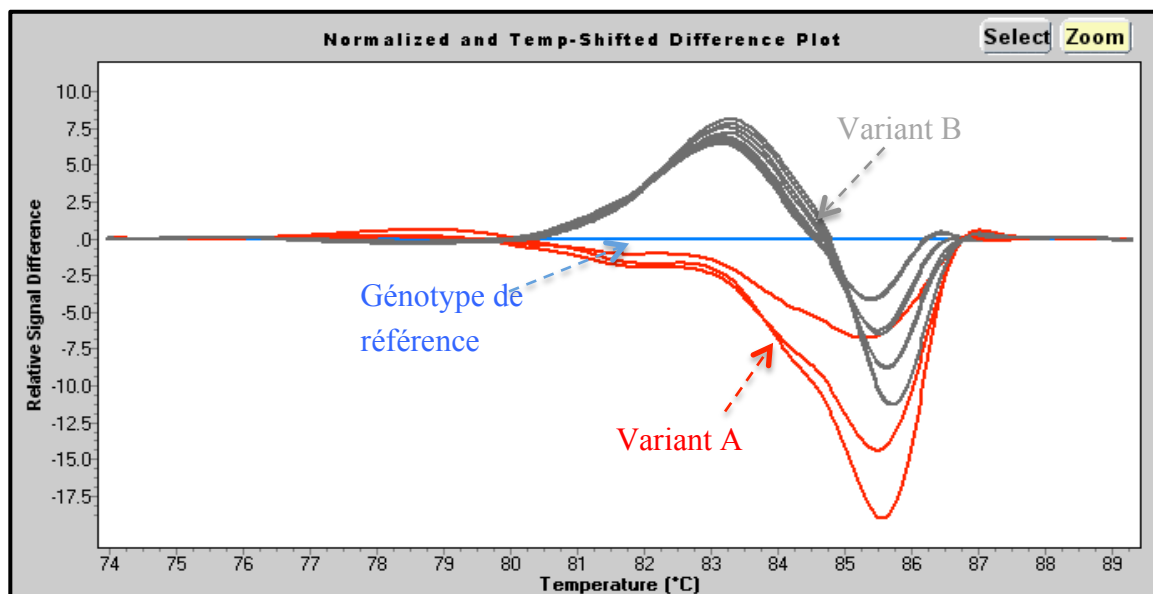


Figure II.10 : Analyse en *difference plot*

1.5. Applications de l'HRM

L'HRM a été développée initialement dans le but de détecter des variants, qu'ils soient connus ou non, même de très petites tailles, sur des amplicons entiers en utilisant des amorces spécifiques de la région étudiée.

Les domaines d'application de l'HRM sont maintenant variés, allant de la génétique humaine à la microbiologie, et leur nombre est en constante augmentation.

1.5.1. Applications en génétique humaine

Les premières utilisations, décrites dès 2003, ont pour objet la recherche de mutations constitutionnelles et acquises en oncologie et hématologie.

1.5.1.1. Distinction des homozygotes - hétérozygotes

La mise en évidence par technique HRM d'un polymorphisme à l'état hétérozygote du gène *CFTR*, dont la mutation à l'état homozygote est responsable de la mucoviscidose, a été publiée par Wittwer *et al.* en 2003 (67).

Cet état hétérozygote est mis en évidence par la présence d'hétéroduplex, définis par l'appariement de l'allèle muté et de l'allèle non muté lors de l'amplification par PCR. Cet appariement, imparfait, présente une température de fusion plus faible que celle d'un

homoduplex. Le profil de courbe de fusion est alors modifié, mettant en évidence deux pics de fusion, le premier étant celui des hétéroduplex et le second celui des homoduplex présents dans le capillaire (figure II.11).

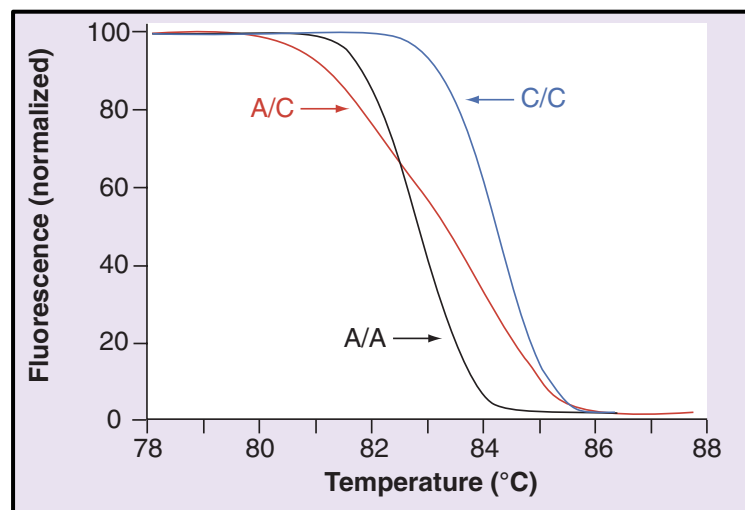


Figure II.11 : Détection des hétéroduplex

Le même principe est utilisé pour la détection des mutations du gène de la bêta-globine (hémoglobines C et S) (67).

L'étude de Jimenez *et al.* parue en 2009 sur l'utilisation de l'HRM pour la recherche de mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (68), impliqués dans le cancer du sein, met en évidence que l'HRM permet non seulement de révéler la présence d'une mutation sur les séquences amplifiées, que cette mutation soit déjà connue ou non, mais qu'elle permet également de grouper les mutations identiques entre elles et de déceler la présence de plusieurs mutations sur un même fragment grâce à l'analyse en « *difference plot* » (figure II.12).

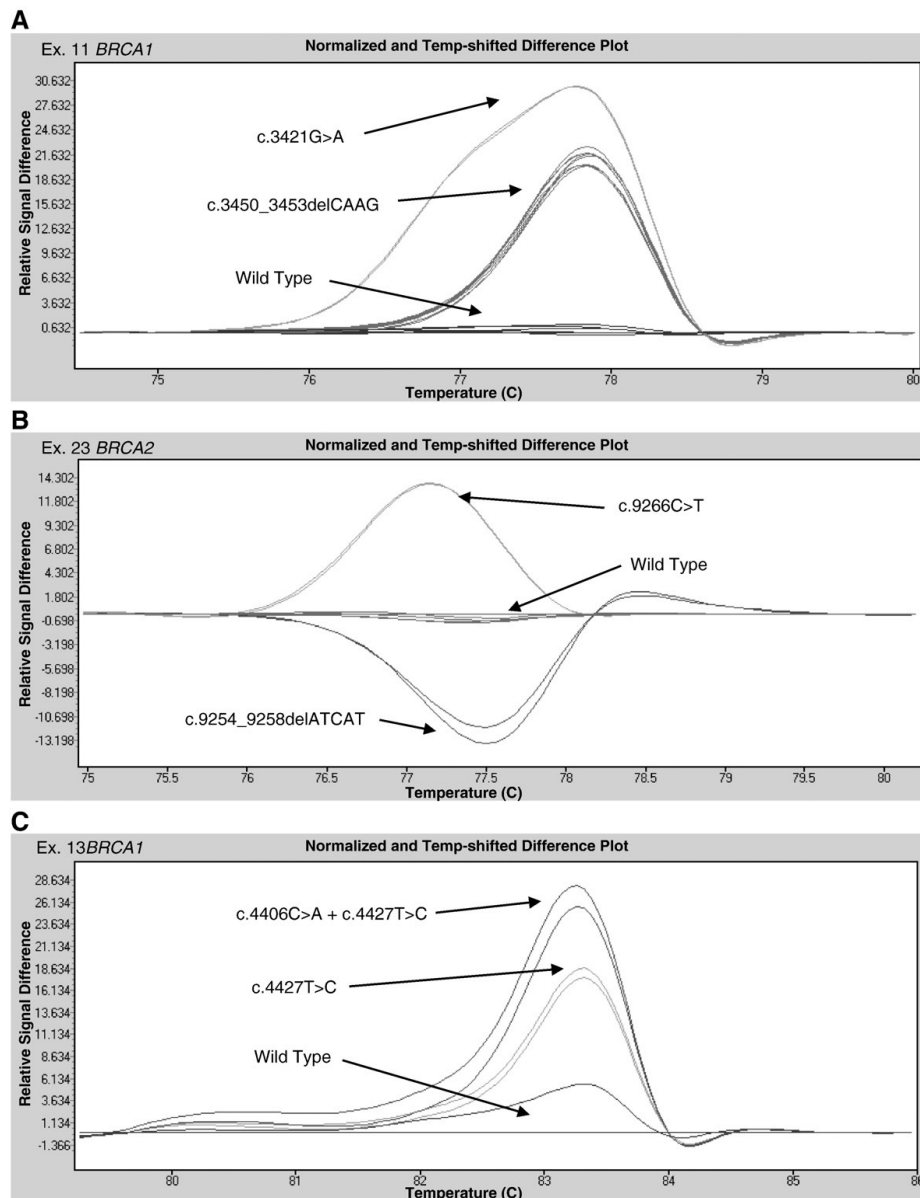


Figure II.12 : Analyse en *difference plot* de polymorphismes, variants non classés et mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (68)

1.5.1.2. Détection des SNP

Outre la détection et la caractérisation des hétéroduplex, une autre étude des mutations du gène *CFTR*, publiée par Krenkova en 2009 (69), montre que l'HRM permet de détecter des mutations ponctuelles présentes à l'état homozygote et de les caractériser.

Si les hétéroduplex sont détectés en *difference plot* par modification du profil de la courbe de fusion, les mutations homozygotes sont mises en évidence par une modification significative de la température de fusion.

L'HRM a également fait ses preuves pour la détection rapide des mutations des exons 12 et 14 de *JAK2* (70), responsables de syndromes myéloprolifératifs, en utilisant des sondes d'hybridation. La technique a une sensibilité et une spécificité comparables aux techniques classiques, et permet également pour un coût moindre de mettre en évidence des mutations qui n'étaient pas connues auparavant.

D'autres applications peuvent également être citées : la recherche de la polyclonalité ou de la monoclonalité des lymphomes non-hodgkiniens, la recherche des mutations des gènes *NMP1* ou *FLT3* dans les leucémies aiguës myéloïdes, la caractérisation des gènes de sensibilité aux traitements anti-cancéreux ou encore l'identification de certains sous-types de cancers (63).

1.5.2. Applications en microbiologie

Les applications en infectiologie sont plus récentes, mais désormais nombreuses : identifications d'espèces microbiennes, typage épidémiologique de souches bactériennes ou virales, différenciation de souches vaccinales et sauvages, détection de mutations sur des gènes de résistance ou encore différenciation de souches sauvages et mutées.

1.5.2.1. Identification d'espèces

Des méthodes de détection et d'identification utilisant l'HRM ont été développées, telle celle des leishmanies publiée par Nasereddin *et al.* en 2010 (71). L'amplification du gène de l'ARN 7SL, testée en parallèle avec les méthodes traditionnelles (ITS1 et kDNA), permet l'identification de *Leishmania tropica*, *L. major* et *L. donovani* complex avec une sensibilité et une spécificité supérieures aux méthodes les plus fréquemment utilisées dans ce but.

La détection et l'amplification des zygomycètes a été développée sur un principe similaire. Le gène de l'ARN ribosomal 18S spécifique des mucorales est amplifié, et ses variations de séquences sont analysées par HRM, permettant l'identification de l'espèce avec une excellente sensibilité et spécificité, que ce soit à partir d'une culture ou directement à partir de tissus (72).

1.5.2.2. Détection de mutations de résistance

La détection de mutations par HRM dans le but de rechercher des résistances aux traitements a été étudiée, notamment pour *Mycobacterium tuberculosis*, dont les délais de croissance rendent pertinentes les techniques moléculaires. Les résistances à la rifampicine (73), aux fluoroquinolones (73) et à la streptomycine ont été recherchées par cette technologie avec des résultats intéressants par rapport à la culture, qui reste le *gold-standard*. En effet, des sensibilités analytiques allant de 74 % pour les fluoroquinolones à 95 % pour la rifampicine, et des spécificités de 100 % ont été décrites. Ces résultats sont en outre totalement concordants avec ceux obtenus par séquençage.

1.5.2.3. Génotypage par amplification d'un locus polymorphe

L'HRM est utilisée dans de nombreuses techniques de génotypage à visée épidémiologique.

Plusieurs d'entre elles ciblent *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*, dont la technique publiée par Merchant-Patel *et al.* en 2009 (74) ciblant le gène *flaA*, codant le flagelle de la bactérie et considéré comme un marqueur intéressant de génotypage. Le fragment amplifié comporte 620 paires de bases, ce qui est supérieur à la taille des fragments généralement analysés par HRM. Malgré cela, les performances de la méthode sont bonnes, permettant d'identifier tous les variants testés.

Une méthode de génotypage par HRM de *S. aureus* utilisant le *spa*-typing a été publiée en 2008 dans *Clinical Chemistry* par Stephens *et al.* en 2008 (75).

Le locus *spa* est une région polymorphe hypervariable (plus de 2000 *spa*-types sont décrits) du génome de *S. aureus* codant la protéine A staphylococcique. Cette région contient 100 à 300 paires de bases.

Les souches testées avaient préalablement été génotypées par *spa*-typing en MLST. L'HRM a fait preuve d'un fort pouvoir discriminant, permettant de séparer la plupart des *spa*-types, y compris ceux n'ayant qu'une paire de base de différence. La reproductibilité de la méthode a été excellente, permettant sa portabilité. Le *spa*-typing par HRM paraît donc être un outil intéressant pour le génotypage de *S. aureus*.

1.5.2.4. Génomotypage par MLVA : application à *Bacillus anthracis*

L'utilisation de l'HRM dans le cadre de la MLVA a, quant à elle, été testée sur *B. anthracis* en 2007 par Fortini *et al.* (76). Vingt cinq loci de VNTR de *B. anthracis*, utilisés dans les techniques MLVA classiques par électrophorèse en gel d'agarose, ont été étudiés. La majorité des marqueurs testés ont pu être différenciés par HRM, à l'exception de BamS31, un locus au fort pouvoir discriminant mais composé d'un nombre important de répétitions, et donc de grande taille (supérieure à 500 paires de bases).

L'analyse globale des loci par HRM a permis d'identifier 7 génotypes sur 10, permettant de distinguer les génotypes majoritaires.

Si l'HRM semble être une alternative utile pour un criblage rapide de première intention, elle ne permet pas d'atteindre les performances des techniques usuelles comme la MLVA avec détermination du nombre de répétitions par électrophorèse ou par séquençage.

En somme, outre ses avantages pratiques évidents, l'HRM se caractérise par une bonne reproductibilité et une bonne portabilité. Si la méthode a fait ses preuves dans de nombreux domaines, son utilisation pour la MLVA est actuellement peu décrite.

2. Problématique

De nombreuses souches de *S. aureus* PVL+ responsables d'infections cutanées récidivantes sont observées chez des militaires de retour d'opérations extérieures (OPEX). Elles sont associées à des profils de résistance aux antibiotiques inhabituels (SAMS/doxyR/PVL+) par rapport à ceux retrouvés en France métropolitaine, ce qui a fait se poser la question de leurs origines. S'agit-il de la diffusion d'un clone ou d'une accumulation de cas non liés mais provoqués par des souches PVL+ ayant acquis une résistance à la doxycycline par pression de sélection liée à la chimioprophylaxie du paludisme dans les armées (DOXYPALU®) (77) ?

La MLVA, en raison de son excellent pouvoir discriminant, de sa reproductibilité et de sa portabilité, a été utilisée par les Hôpitaux d'Instruction des Armées (HIA) pour le typage de ces souches de *S. aureus*. Son utilisation a été élargie avec succès à l'étude des populations hospitalières (78).

Dans le but de simplifier sa réalisation technique, de réduire son coût, le temps de manipulation, et d'augmenter la reproductibilité de la méthode en éliminant l'électrophorèse en gel d'agarose, la MLVA avec comme mode de détection l'HRM a été proposée.

L'objet de ce travail est de tester la transposition de la MLVA classique, avec révélation par électrophorèse en gel d'agarose, en MLVA utilisant la technologie HRM comme mode de détection, et plus spécifiquement la mesure de la température de fusion pour distinguer les variations inter-souches au niveau des zones de répétitions.

Ainsi, les VNTR utilisés dans la MLVA classique issus des travaux de Pourcel *et al.* en 2008 (61) et utilisés au sein des HIA ont été repris et adaptés à l'HRM.

Ce travail a été réalisé en deux temps : la mise au point des PCR en temps réel pour chaque VNTR avec la souche de référence Mu50, puis l'application de cette MLVA adaptée sur un panel de souches cliniques de *S. aureus* isolées chez des militaires afin de tester ce mode de détection original.

3. Mise au point de la PCR en temps réel

3.1. Objectif

La mise au point de la PCR en temps réel a consisté à tester les amorces adaptées à l'HRM et à rechercher les conditions de PCR optimales pour une amplification spécifique la plus efficace possible, compatible avec l'interprétation de l'HRM.

L'efficacité de la PCR est un paramètre important en HRM. L'objectif fixé est donc d'obtenir une efficacité ($E_{PCR} = 10^{-1/\text{pente}} - 1$) compatible avec la PCR quantitative, c'est à dire la plus proche possible de 1, sans perdre en spécificité. Les paramètres d'ajustement sont la température d'hybridation et la concentration en amorces. L'utilisation de $MgCl_2$, déconseillée pour l'HRM, n'a pas été retenue.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Souche de référence

La recherche des caractéristiques optimales de PCR a été effectuée avec la souche de référence Mu50 dont le génome a servi initialement à l'identification des loci de VNTR et qui a été utilisée pour la mise au point de la MLVA classique dans sa description initiale.

Mu50 est un SARM VISA isolé en 1997 dans un pus prélevé chez un petit garçon japonais dont l'infection ne répondait pas à la vancomycine. Le génome de Mu50 a été intégralement séquencé et analysé en 2001 par Kuroda *et al.* (79).

3.2.2. Extraction de l'ADN

La souche, conservée en cryobilles à $-80^{\circ}C$, a étéensemencée sur gélose au sang et incubée 24 heures en aérobiose avec 5 % de CO_2 pendant 24 heures. Elle a été repiquée sur le même milieu et dans les mêmes conditions après vérification de la pureté.

L'extraction a été réalisée par choc thermique selon le protocole suivant :

- Réaliser une suspension d'une densité de 3 Mac Farland dans de l'eau qualité biologie moléculaire (QBM)

- Incuber à 4°C pendant 10 minutes
- Incuber à 100°C au bain-marie pendant 15 minutes
- Vortexer
- Incuber à 4°C pendant 10 minutes
- Incuber à 100°C au bain-marie pendant 15 minutes
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 5 minutes pour éliminer les débris cellulaires
- Récupérer le surnageant.

L'ADN extrait a été dilué dans de l'eau QBM au 1/10^{ème}, 1/100^{ème} et 1/1000^{ème}. Les solutions obtenues ont été aliquotées et congelées à -20°C.

3.2.3. Amplification

3.2.3.1. Choix des amorces

Les cibles d'amplification sont les 10 VNTR du panel principal publié par Pourcel *et al.* en 2008 (61) et dont les caractéristiques sont décrites dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : VNTR décrits par Pourcel *et al.*

Locus VNTR	Taille (pb) de l'unité de répétition	Nombre de répétitions pour Mu50	Taille (pb) du produit de PCR pour Mu50	Gène ou région amplifiée
Sa0122	24	10	392	<i>spa</i>
Sa0266	81	6	630	<i>coa</i>
Sa0311	55	3	272	STAR
Sa0704	67	4	380	Intergenique
Sa1132	63	6	532	SAV1078
Sa1194	67	7	524	Intergenique
Sa1291	64	4	369	Intergenique
Sa1729	56	5	499	STAR
Sa1866	159	3	607	SAV1738
Sa2039	56	3	282	STAR

Des amorces spécifiques et adaptées à la technologie HRM ont été dessinées (tableau II.2) par le logiciel fourni par Idaho Technology (LSPD Software®). Les critères de choix sélectionnés étaient l'amplification de la région VNTR d'intérêt en limitant celle des régions flanquantes afin de réduire au maximum la taille des amplicons.

Cette analyse bio-informatique a été réalisée grâce aux séquences des VNTR et de leurs régions flanquantes, disponibles pour la souche Mu50 dans GenBank (n° d'accès NC_002758), ainsi que celles des amorces de PCR classique publiées par Pourcel (61).

Tableau II.2 : Amorces de PCR classique et de PCR temps réel pour chaque VNTR

Cible (taille des amplicons)	Amorces de PCR classique (61)	Amorces d'HRM
Sa0122 (447 pb)	F : AGCAGTAGTGCCGTTTGCTT R : AAGACGATCCTTCAGTGAGCA	F : GCTAATTTGTTATCTGCAGCAATTT R : ACGTAACGGCTTCATCCA
	ACCAGGTTTGATCATGTTTTATCAGCTAATTTGTTATCTGCAGCAATTTGTCAGCAGTAGTGCCGTTT GCTTTTGCAATGTCATTTACTGTATCACCAGGTTTAACGACATGTACTCCGTTGCCGTCTTCTTTACCAG GTTTGTGGCCGTCTTCTTTACCAGGCTTGTGGCGTCTTCTTTACCAGGCTTGTGTGTCTTCTTTACC AGGCTTGTGGCGTCTTCTTTGCCAGGTTTGTGTGTCTTCTTTACCAGGCTTGTGGCGTCTTCTTTA CCAGGTTTTTGTGTCTTCTTTACCAGGCTTGTGGCGTCTTCTTTGCCAGGTTTGTGGCGTCTTCTT TACCAGGTTTTTGTGTCTTCTTCTTTGGTGCTTGAGCATCGTTAGCTTTTGTAGCTTCTGCTAAAAAT TTCTTTGCTCACTGAAGGATCGTCTTAAAGGCTTTGGATGAAGCCGTTACGTTGTCTTCGTTTAAAGTTA	
Sa0266 (405 pb)	F : TTGGATATGAAGCGAGACCA R : CTTCCGATTGTTTCGATGCTT	F : TCGCCCAACACAAAACAAAG R : GGCCCATATGTCGCAGT
	GTATCCGTGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAAC AAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAGATATCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAACAAAG CCAAGTGAACAAACGCATATAACGTAAACACATGCAATGGTCAAGTATCATACGGTCTCGCCCAA CACAAAAAAGCCAAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAACACACATGCAATGGTCAAGTATCATATGG CGCTCGCCGACACAAAAAAGCCAAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAAACACATGCAATGGTCAA GTATCATACGGAGCTCGCCGACATACAAGAAGCCAAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAACACACATG CAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCGACACAAAAAAGCCAAAGCAAAACAAACGCATATAACGT AACAAACATGCGAGTGGTACTGCGACATATGGCCCTAGAGTAACAAAATAAATTTATAACTCTATCCAA AGACATACAGTCAATACAAGAATTATGTATCTATACAACAGTAATCATGCATTCTATGATGCTTCTAAC TGAATTAAGCATCGAACAAATCGGAAGCATATTTCTAAATTTATTATTATTATAGTCTTAAACATAACA	
Sa0311 (283 pb)	F : AGGGTTAGAGCCCGAGACAT R : CACGGGATTGGAACAGAAAT	F : GGGTTAGAGCCCGAGAC R : TTTAACATCACGGGATTGGAAC
	TTTAGGGTTAGAGCCCGAGACATAAATTAATATAGTAGGACCTACAGTGTATAATGGCGGGCCCCAAC ACAAAGAAATTTGAAAAGAAATTTACAGGTAATGCAAGTTGGCGGGGCCCCAACACAGAGAAATTCGAA AAGAAATTTACAGGCAATGCAAGTTGGCGGGGCCCCAACACAGAGAAATTTGAAAAGAAATTTACAGG TAATGCAAGTTGGGGAAGGACAGGAATAAATTTGCGAAAATATCATCTTCTGTTTCCATCCGTGATGTT AAAATTTTAAAAAATAATGCCACTAACTAAGTATAGTGTTAATGTTTGAGTGTTTATGAAAGCTTTTA	
Sa0704 (393 pb)	F : CGCGCGTGAATCTCTTTTAT R : AGTCCCATATCGTGCGTTAA	F : CGCGCGTGAATCTCTTTTAT R : GTCGAAGGCTAATAGTCCCA
	ATGTAATACAATTTATTTAGCGCGGTGAATCTCTTTTATAAGAGTGTGTAGGGAATGGCGTTGTATAAAT TGTATTAGAAGAACTTCTAACGCATCTCTGTGGTTAAAAGAGATGAAGGGAACGACAGTTTAATTAACAC TGCATAAAGAACTTCTAGCTTTTCTCTTTTCTGTTCAAAGAGAAGCAGCTGTTTCGAGTTTAAATCAAACAC ATAAAGCTTTTAACTTTACTCTTTGATTTAAAGAGTGACAAATGTTTACAGTTTAATTAACATGCATAA GACTTCTAGCTTTTCTCTTTTCTGTTCAAAGAGAAGTTCTAATACCACCATATCGTGCATCGGGAACGCT ATATATATTAATAGGAGGTAATATATATTTAACGCACGATATGGGACTATTAGCCTTCGACTTTGTTAT	
Sa1132 (443 pb)	F : CGTGCATAATGGCTTACGAA R : AAGCAGCAGAAAAGCTAAAGAA	F : CGTGCATAATGGCTTACGA R : ATCCAAGATACACTAAATTAATTTAAATCC
	TTATCAATCATACCTCTTTAACAACAGTGAAGAACCCTGTCATAATGGCTTACGAATTATAGTTTGTAGG GTAAAAGAGGGATACATGCGCCGAGCAGATGCAAAAAAGCCCTAACAACTAAAAGTTGTAAGGTAAAAG AGGGATACATGCGCCGAGCAGATGCAAAAAAGCCCTAACAACTAAAAGTTGTAAGGTAAAAGAGGGATA CATGCACCAGCGCAAGCAAAAAAGCCCTAACAACTAAAAGTTGTAAGGAAGAAGAGGGATACATGCAC CGAGCAGATGCATAAAATCCCCTAACAACTAAAAGTTGTAAGGTAAAAGAGGGATACATGCGCCGAGCAC ATGCATAAAATCCCCTAACAACTAAAAGTTGTAAGGAAGAAGAGGAACACATGCGCCGAGCAGCAGTGCATA AAAGCCCCTAACAACTAAAAGTTGTAAGGGGATTTAAATTAATTTAGTGTATCTTGGATATCTTGTGTTG TTTGATTAAATATCTTCTGTTTTTCTTCTTTTATCTTTAATTTTCTTCAACTCTTTAGCTTTTTC TGCTGCTTTTATTTGATTTCATTAGACATGATTAATTCCTCCCAATTTGGATAATTATTTATATAT	
Sa1194 (446 pb)	F : AGTGCAAGCGGAATTGAAG R : ATCGTGAAAAGGCCAAAAA	F : TGGATTCACCAATTAGGTTTCG R : GGTCTTTCACGTTTAGATACCAT
	ATACGTTTAAATTTATTTAGACACAGAAGAAACATTGACAGATGAGCGGTTTCAAAGTGCAAGCGGAA TTGAAGCAGCATTAATTGAACAAGGTGCTGTTATTAGATAATGATTTAAACCCCATGTATAAGGATATCT GAAGTAGATTGATATCCTTAACATGGGGTTTATTTTGGATTACCAATTAGGTTTCGATTCTATTAA AATCAAAGAGGCACAGCGGAATACAGATGATGCTTCTCACAACGCATATAAAGTCATACTTATGAGCAA AGCAAATTAGTATGACTTACCTAATAGGATTTCCATTAGGATCCAATTTATCTTGATTTTATAAATCAT AGAGGCACAGTGGATTACAGATGATGCTTCGCATCACTGCATATAAAGTCATACTTATGAGCAAGCAAA TTAGTATGACTTACCTAATAGGATCACTTATAGGATCCAATTTATTTATAAATCAAAGAGGAACGCG GAATACAGATGATGCTTCGCACAACGCTGCAATAAAGCCTCTAATGATTAAAAATCAAAGAGGCTTTAAAT TTTTTGGGCTTTTTCACGATTTTAAAAATGCTTTTTTGAATGGTATCTAAACGTAAGACCGTATTTT	
Sa1291 (423 pb)	F : GGGGGAATTTCTAAGCAACC R : CGAAATTTTCCACGTCGATT	F : TGACCTAGTCAACTTTGCGG R : CACCTAAACGGTCAACGATG
	GGTCATCCAAATGGAGAATTGTCTGACCTAGTCAACTTTGCGGGGGAATTTCAAGCAACCTAGATAAGGT TCCAGAATTTCTCCCTAAGAAACACTAATCAATAAATTGATAAGAAGATTAGAGGAACGCTTGAGCTAAA GCTCAAGATAAAGACGCAGAAATCAATAAATTGATAACTGGGATAGAGGTACGCCTGAGCTAAAGCTCAA GATAAAGACGCAGTAATCAATAAATTGATAACTGGGATAGAGGTACACCTGAGCTAAAGCTCATGCATAA GAAACAGCTAATCAATAAATTGATAAGTGTCTTCTAAAATTTCTACTTGTGTTTTTGAATTTTAAAGTAA AATATAATAGTCTATGTATAGGCATTTTAAAGGAGGTGAATCGACGTGGAAATTTTCGATAAAGTAAAA GATATCATCGTTGACCGTTAGGTGTAGACGCTGATAAAGTAAGTGAAGATGCATCTTTCAAAGATGATT	

Sa1729 (365 pb)	F : TACTTAAAAATAGGAATACATAATTAG R : CAACAATAAATTACTTATTTGAAGTT	F : TAGGGAGTGGGACAGAAATGAT R : ATGTCCTAGGCTCTACAATGTTAT
	CCACATTAGCCACCACCTATTATGTACTTAAAAATAGGAATACATAAATTAGATTTCATGCATAGGGAGTGGG ACAGAAATGATATTTTAACAAAAATTAAATTCGTTATCCCCAACTGGCATTGCCTGTAGAATTCTTTACG AAATTCTCTGTGTGGGGCCCCATCCCCAACTTGCACATTATTGAAAGCTGACTTTTGGTCAGCTTCTAT GTTGGGGGGCCCCGTCCCCAACTTCCATTGCCTGTTGAAATTAGGGTTCCAATTTCTCTGTGTGGGGCCCC CGCCAACCTCCATTGCCTGTTGAAATTGGGGTTCCAATTTCTCTATGTTGGGGCCCCGTCCCCAACTTCC ATTGCCTGTAGAATTCTTTACGAAATTCTCTATGTTGGGGCCCCGCAATATAACATTGTAGAGCCTAG GACATTGTGATGTCCAGACTCTATCATCATGAATTATTCTCATCAAAACTGTCTTTCGTCATTTTCGA CGTTGAAACTTCAAATAAGTAATTTATTGTTGCCATTGTTTATACACAAAATTAATTGACCTTCATTT	
Sa1866 (346 pb)	F : CTGTTTTGCAGCGTTTGCTA R : GCAACTTGAAGAAACGGTTG	F : ACAGCTGCACTTTATCTGT R : ATACAAAAGAAGTGTGAAGGA
	CTCTCTTTTGAACCTGGTGTTAATTTAGCTTGCTTCTGTTTTGCAGCGTTTGCTAATCTTTCAGCTTGTG ACTCTGGTTTTGATACTTCTACCTTTGCTGCACCTGCATCTTTAGTTGATGTGTCACTGTCTTTCTCTGC TTGTGCTTCTTTTTTAGCTTCTTGAACCTCTTGTGCCTCTTGTGATGTATCACTTAAATTATTGCACTT GCTTCTTTCTTTTATCGCTGCTTGTGTGCTTTCAATGCCACTGCTTTTGGTTCTTCATTGATACAGCTG CACTTTTATCTGTTCCTGCTTGTGCTTCTTTTTTAGCTTCTTGAATCTCTTGTGCCTCTTGTGACGTGTC ACTTAAATTATTGCACTTGCTTCTTTTATTGCTGCTTGTGTACTTTAATGCCGATGCTTTTGAC TCTTCATTGATACAGCCACACTTTTATCCGCTTCTGCTTGTGCTTCTCTTTTAGCTTCTTGAATCTCTT GTGCTTCTTGTGATGTATCACTTAAATTATTGCACTTGCTTCTCTTTTATCGCTGCTTGTGTGCTT TAATGCCGCTTGTCTATTTTAGATTGTTTAAAAAACCCTTCAACACGTTCTTTTGTATAGGCAACCGTT TCTTCAAGTTGCGTTTTTCTTCTTCAAACTTTTTCGACAGTTCTTGTCTTTGACTTTTAAATCATCTG	
Sa2039 (199 pb)	F : TTCGTTCTACCCCACTTGC R : GAGCCTGGGTCATAAATTCAA	F : TGCATTGCTGTAGAATTTCTTT R : AAAATACGCTTGTACAAGCTTT
	ATAGGGAGTGGGACAGAAATAATATTTAACAAAATTTATTTCGTTCTACCCCACTTGCATTGTCTGTAG AATTTCTTTTCGAAATTCTCTTTGTGGGGCCCCACCCCACTTGCACATTATTGTAAGCTGACAGAAA GTCAGCTTCTATGTTGGGGCCCCGCCAACTTGCACATTATTGTAAGCTGACAGAAAGTCAGCTTCTATGT TGGGGCCCCCTAGAATTGAAAAAGCTTGTACAAGCGTATTTTCTTTCAGTCAACTCTGCCAATATA ACATTGTAGTGCCTAGGACATTGAATTTATGACCCAGGCTCAGTCTTATTTCATCATTTCTTAATATCGTT	

Les amorces, purifiées en HPLC, ont été produites par la société Tib MolBiol (Allemagne).

3.2.3.2. Composition du mix

Le milieu réactionnel utilisé est le LightScanner Master Mix[®] (Idaho Technology), contenant du LCGreen[®] Plus, un agent marqué spécifiquement conçu pour l'HRM. Son optimum d'excitation est compris entre 440 et 470 nm et son optimum d'émission entre 470 et 520 nm. Selon les recommandations du fournisseur et pour un volume final de 10 µL par capillaire, la constitution du mélange réactionnel utilisé est celle décrite dans le tableau II.3.

Tableau II.3 : Constitution du mélange réactionnel

Composant	Volume (µl)	Concentration finale
2.5 X MasterMix	4	1 X
Primer F	1	à déterminer
Primer R	1	à déterminer
Eau	2	
DNA	2	fonction de la dilution étudiée
Volume Final	10	

3.2.3.3. Schéma de PCR

Afin de tester l'efficacité de la PCR, des dilutions de l'ADN extrait de Mu50 ont été réalisées. Chaque dilution (solution pure, 1/10^{ème}, 1/100^{ème} et 1/1000^{ème}) est passée en triple. Un témoin négatif permet de valider la spécificité de la réaction et de valider la ligne de base utilisée pour le calcul du T_m. Le schéma de chaque manipulation est décrit dans le tableau II.4.

Tableau II.4 : Schéma de PCR

Position	Capillaire
1	témoin négatif
2	pur
3	pur
4	pur
5	1/10
6	1/10
7	1/10
8	1/100
9	1/100
10	1/100
11	1/1000
12	1/1000
13	1/1000

3.2.3.4. Amplification et HRM

L'amplification et l'HRM sont réalisées sur le thermocycleur LightScanner 32[®] (Idaho Technology). Ce thermocycleur 32 capillaires dispose d'un scanner HRM, permettant l'acquisition de données de fusion haute résolution directement après l'amplification.

L'acquisition des données est réalisée sur le canal adapté à une longueur d'onde de 530 nm. Les étapes de l'amplification et de l'HRM sont celles recommandées par le fournisseur. Elles sont décrites dans les tableaux II.5 et II.6. La température d'hybridation, propre à chaque cible, est à déterminer.

Tableau II.5 : Etapes de PCR

Phase	Etape	Température (°C)	Durée (sec)	Nombre de cycles
Amplification	Dénaturation	95	20	45
	Hybridation	à déterminer	20	
	Elongation	72	30	
Pré-HRM	Dénaturation	95	5	1
	Refroidissement	40	30	1

Tableau II.6 : Etapes d'HRM

Phase	Etape	Intervalle de température (°C)	Vitesse d'augmentation de température (°C/sec)	Nombre de cycles
HRM	Hybridation	60 - 70	2,3	1 / capillaire
	Acquisition	70 - 95	0,3	

3.2.4. Validation et calcul de l'efficacité de la PCR en temps réel

Les critères de validation de la PCR sont :

- la négativité du témoin négatif
- la présence au minimum de trois dilutions interprétables, avec des T_m comparables pour valider le calcul de la pente.

L'efficacité de la PCR ($E_{PCR} = 10^{-1/pente} - 1$) est déduite à partir de la pente de la droite, qui est calculée par le logiciel du thermocycleur en mode « *Absolute quantitative / 2nd derivative max* » à partir des CT des différentes dilutions en fonction des logarithmes de la quantité d'ADN.

3.3. Résultats

Les PCR des dix VNTR sélectionnés ont été mises au point. Les résultats obtenus sont illustrés par ceux du VNTR Sa1866 (figures II.13 à II.15). La négativité du témoin négatif, l'obtention de 4 dilutions interprétables avec des CT proches pour les différents passages d'une même dilution et une efficacité de 97 % permettent de valider ce marqueur.

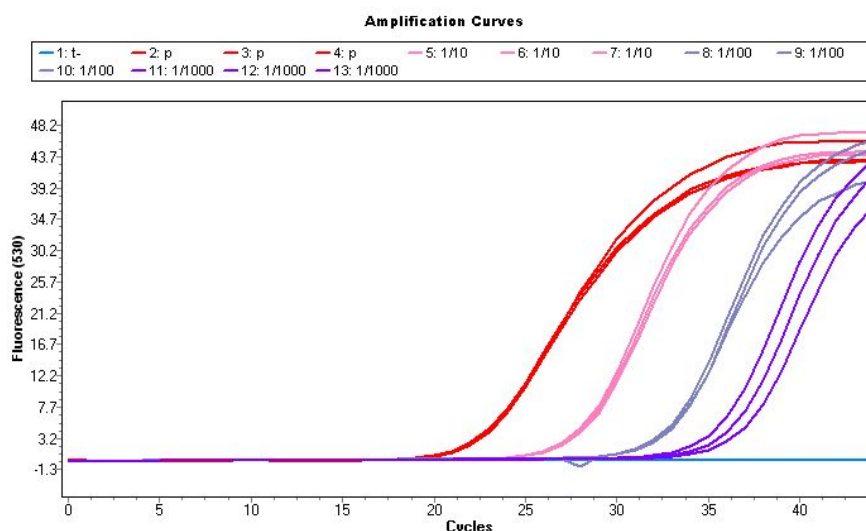


Figure II.13 : Courbes d'amplification de Sa1866 obtenues à partir des dilutions de Mu50.

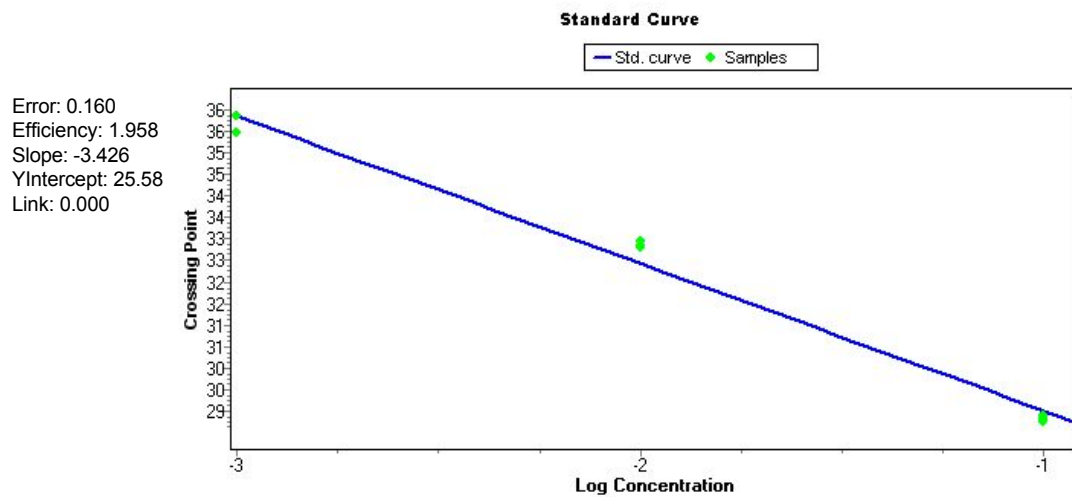


Figure II.14 : Courbe standard de la PCR de Sa1866 obtenue à partir des dilutions de Mu50.

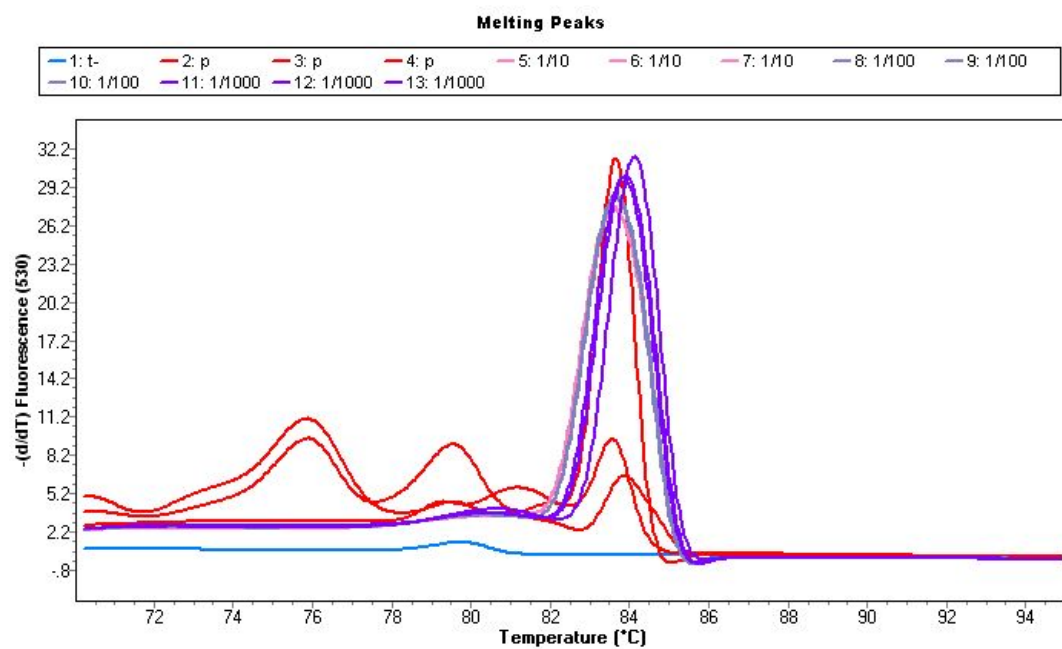


Figure II.15 : Pics de fusion de Sa1866 obtenus à partir des dilutions de Mu50.

Les paramètres de PCR ayant permis d'obtenir la meilleure efficacité et retenus dans les protocoles pour chaque VNTR sont résumés dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : Conditions de PCR retenues et efficacité obtenue pour chaque VNTR

VNTR	T° hybridation (°C)	Concentration finale en amorces (μM)	Pente	Efficacité (%)
Sa0122	65	0,6	-3,6	90
Sa0266	64	0,9	-3,5	93
Sa0311	64	0,6	-3,7	86
Sa0704	65	0,4	-3,9	80
Sa1132	64	0,8	-3,9	80
Sa1194	65	0,8	-3,5	93
Sa1291	64	0,25	-4,05	77
Sa1729	64	0,6	-3,6	90
Sa1866	64	0,6	-3,4	97
Sa2039	64	0,7	-3,4	97

L'ajustement de la température d'hybridation et de la concentration en amorces a permis, à l'exception du VNTR Sa1291, d'obtenir des PCR efficaces permettant de réaliser l'étude de faisabilité de typage moléculaire.

La température d'hybridation et la concentration en amorces retenues pour Sa1291 sont celles ayant permis d'obtenir la meilleure efficacité sans perte de spécificité. Une amplification non spécifique a été observée dans le capillaire du témoin négatif à chaque tentative d'augmentation de la concentration en amorces ou de diminution de la température d'hybridation, sans gain réel d'efficacité, expliquant la différence de concentration en amorces observée avec les autres VNTR.

4. Détection par HRM du typage de *Staphylococcus aureus* par MLVA

4.1. Objectif

L'objectif de cette étude est d'utiliser la technologie HRM comme mode de détection pour le typage moléculaire de *Staphylococcus aureus* par MLVA.

Une comparaison sera réalisée pour chaque VNTR entre sa température de fusion déterminée en HRM et le nombre de ses répétitions (et donc sa taille) préalablement déterminé par MLVA couplée à l'électrophorèse en gel d'agarose.

Cette approche devrait permettre d'étudier une possible corrélation entre ces deux modes de détection.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Souches cliniques

4.2.1.1. Origine

Les souches utilisées pour cette étude de faisabilité sont Mu50 et 21 souches de *S. aureus* colligées à l'HIA Legouest (Metz) chez des militaires de retour d'OPEX entre 2007 et 2008. Dix-neuf des 21 souches ont été isolées à partir de prélèvements cutanés : 13 abcès, 4 surinfections de plaies ou de dermatose préexistante, 1 impétigo et 1 ulcère. Les deux autres souches étaient isolées d'une urine et d'un liquide articulaire.

Après identification par méthode conventionnelle (Vitek2®, carte Gram Positif), les isolats ont été génotypés à l'HIA Robert Picqué (Bordeaux) par MLVA classique avec détermination du nombre de répétitions de chaque VNTR par électrophorèse en gel d'agarose (78).

Le choix des souches n'a pas été guidé par une recherche de clonalité, mais au contraire par la volonté de disposer d'un panel le plus hétérogène possible et présentant le plus d'allèles possibles pour chaque VNTR dans la perspective d'une évaluation de la corrélation entre nombre de répétitions et Tm (tableau II.8).

Tableau II.8 : Nombre de répétition par VNTR pour chaque souche

Souche	Nombre de répétitions									
	Sa0122	Sa0266	Sa0311	Sa0704	Sa1132	Sa1194	Sa1291	Sa1729	Sa1866	Sa2039
Mu50	10	6	3	4	6	7	4	5	3	2
SE009	4	8	1,5	4	0	7	2	4	3	0
SE016	6	6	3	2	6	7	4	5	3	1
SE017	7	5	4	8	1	4	2	3	3	0
SE018	6	4	1	2	3	7	1	4	4	1
SE022	9	5	1,5	4	4	7	1	3	3	0
SE043	10	5	2	6	2	3	1	1	3	1
SE044	5	6	2,5	4	7	7	4	5	3	2
SE045	6	7	2,5	3	2	5	2	4	2	2
SE049	2	6	2,5	4	7	7	4	5	3	2
SE062	12	8	1,5	4	2	7	2	5	3	0
SE072	10	6	3	6	8	8	3	5	3	1
SE101	0	5	2	8	3	4	2	4	3	0
SE106	8	6	3	3	2	5	2	5	2	5
SE118	11	5	2,5	2	8	5	4	3	3	1
SE121	9	6	2,5	2	6	7	5	5	3	2
SE122	5	6	2,5	4	5	7	4	3	3	2
SE137	8	5	3	5	4	5	3	2,5	2	3
SE138	12	6	5,5	5	1	7	1	0	3	0
SE139	10	4	3	4	6	7	4	2	3	1
SE173	8	7	0	5	1	6	3	1	3	0
SE195	9	9	1,5	4	2	7	1	4	3	0

4.2.1.2. Contrôle des souches cliniques

La stabilité des résistances a été contrôlée par l'antibiogramme selon les recommandations du CA-SFM en cours tout comme celle de la virulence par la recherche de PVL.

4.2.1.2.1. Antibiotogramme

Un antibiogramme a été réalisé pour chaque souche. Les souches, conservées en cryobilles à -80 °C, ont été ensemencées sur gélose au sang et incubées 24 h à 37 °C avec 5 % de CO₂. Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en disques (I2A) sur milieu gélosé MH2® (Biomérieux) avec ensemencement par inondation et lecture par SirScan® (I2A). Ils ont été interprétés selon les recommandations du CASFM 2013 (80).

4.2.1.2.2. Recherche de PVL

Une recherche de PVL par PCR a également été effectuée sur chaque souche. Après extraction rapide par choc thermique, l'amplification d'un fragment d'ADN du gène *lukSF-PV* codant la PVL a été réalisée par PCR en temps réel avec révélation par l'agent intercalant SybrGreen® (technique CNR) sur thermocycleur Lightcycler 2.0® (Roche).

4.2.2. Extraction

L'extraction de l'ADN a été réalisée par choc thermique selon le même protocole que celui utilisé pour la mise au point de la PCR.

L'ADN extrait a été dilué au 1/50^{ème} pour obtenir une quantité d'ADN dans les bornes recommandées pour l'HRM. Les solutions obtenues ont été aliquotées et congelées à - 20 °C.

4.2.3. Quantification de l'ADN

La concentration d'ADN contenu dans chaque solution a été mesurée par spectrophotométrie UV à l'aide du BioSpec-nano® (SCHIMADZU BIOTECH), dans le but de vérifier que les quantités d'ADN soient homogènes entre les différentes solutions et entrent dans la gamme des recommandations.

4.2.4. Amplification et HRM

L'amplification et l'HRM sont réalisées sur LightScanner 32® avec les paramètres (concentration en amorces, température d'hybridation) déterminés pour chaque VNTR lors de la mise au point de la méthode et décrits dans le tableau II.7. Le témoin négatif et les souches sont passés en simple exemplaire.

4.2.5. Analyse des données moléculaires

L'amplification est analysée sur le mode « *absolute quantitative / 2nd derivative max* » du logiciel du thermocycleur. Les amplifications tardives (> 40 cycles) ne sont pas prises en compte et considérées comme négatives. L'HRM est analysée avec le mode « *unlabeled probe genotyping* », qui permet une normalisation des pics de fusion.

4.3. Résultats

4.3.1. Caractérisation des souches

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques et la présence du gène codant la PVL pour les différentes souches sont résumées dans le tableau II.9.

Tableau II.9 : Antibiogramme et production de PVL des souches contrôlées

(Péni : pénicilline ; Vanc : vancomycine ; Teico : teicoplanine ; Kana : kanamycine ; Tobr : tobramycine ; Gent : gentamicine ; Ery : érythromycine ; Linc : lincomycine ; Pristi : pristnamycine ; Doxy : doxycycline ; FQ : fluoroquinolones ; Ac. F : acide fusidique)

Souche	PVL	Péni G	Péni. M	Vanc	Teico	Kana	Tobr	Gent	Ery	Linc	Pristi	Doxy	FQ	Ac.F
Mu50	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
SE009	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SE016	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE017	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SE018	-	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
SE022	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE043	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SE044	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SE045	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE049	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SE062	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
SE072	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE101	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE106	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SE118	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE121	-	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
SE122	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
SE137	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE138	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE139	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE173	-	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
SE195	+	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Les données obtenues montrent que les souches présentent bien les caractéristiques initiales.

Une souche sur 21 (5 %) est un SARM. Huit souches sont résistantes à la doxycycline (38 %). La plupart des souches ont une pénicillinase (19/21, soit 91 %), qui est la seule résistance observée dans 53 % des cas (10/19).

Huit souches sur 21 (38 %) possèdent le gène codant la PVL, dont 4 sont résistantes à la doxycycline. Les souches PVL+ sont comparées dans le tableau II.10.

Tableau II.10 : Caractéristiques des souches PVL

	PVL	Doxy	Sa0122	Sa0266	Sa0311	Sa0704	Sa1132	Sa1194	Sa1291	Sa1729	Sa1866	Sa2039
SE009	+	R	4	8	1,5	4	0	7	2	4	3	0
SE017	+	R	7	5	4	8	1	4	2	3	3	0
SE062	+	S	12	8	1,5	4	2	7	2	5	3	0
SE072	+	S	10	6	3	6	8	8	3	5	3	1
SE106	+	R	8	6	3	3	2	5	2	5	2	5
SE122	+	R	5	6	2,5	4	5	7	4	3	3	2
SE137	+	S	8	5	3	5	4	5	3	2,5	2	3
SE195	+	S	9	9	1,5	4	2	7	1	4	3	0

La comparaison phéno/génotypique des deux groupes de souches PVL+ (doxyS et doxyR) met effectivement en évidence l'absence de lien de clonalité en leur sein.

4.3.2. Quantification de l'ADN

La concentration d'ADN extrait dans les solutions est indiquée dans le tableau II.11.

Tableau II.11 : Concentrations d'ADN

Souche	ADN (ng/μL)
Mu50	25,39
SE009	24,19
SE016	23,67
SE017	22,81
SE018	22,93
SE022	23,93
SE043	27,43
SE044	24,6
SE045	21,75
SE049	22,66
SE062	24,75
SE072	28,8
SE101	26,35
SE106	24,31
SE118	27,6
SE121	26,78
SE122	29,23
SE137	27,82
SE138	19,26
SE139	18,85
SE173	20,76
SE195	20,85

La concentration d'ADN de chaque solution utilisée pour les expérimentations est incluse dans les bornes recommandées pour l'HRM, soit entre 5 et 30 ng/μL (63).

Les concentrations extrêmes, 18,85 et 29,23 ng/μL, ont un rapport inférieur à 2, ce qui ne paraît pas significatif au regard des variations minimales de T_m observées lors de la mise au point de la méthode sur des dilutions au $1/10^{\text{ème}}$. Un ajustement des concentrations n'est pas nécessaire.

4.3.3. Analyse des résultats de l'HRM

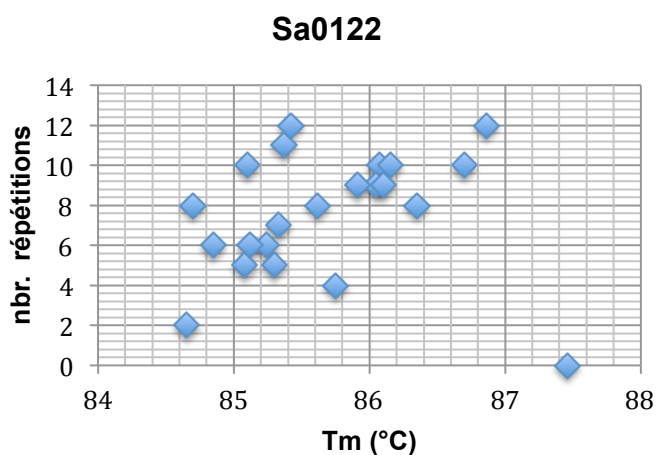
La typabilité des souches est globalement bonne (100 % pour Sa0122, Sa0266, Sa0704, Sa1291, 95 % pour Sa1866 et 91 % pour Sa0311 et Sa1729), à l'exception des VNTR Sa1132 (73 %), Sa1194 (73 %) et Sa2039 (68 %).

L'amplification est conforme aux recommandations (63) car les cycles de sortie des différentes souches sont généralement inférieurs à 30 CT, à l'exception du VNTR Sa1194 pour lequel 5 souches sur 22 (23 %) ont un cycle seuil compris entre 35 et 39.

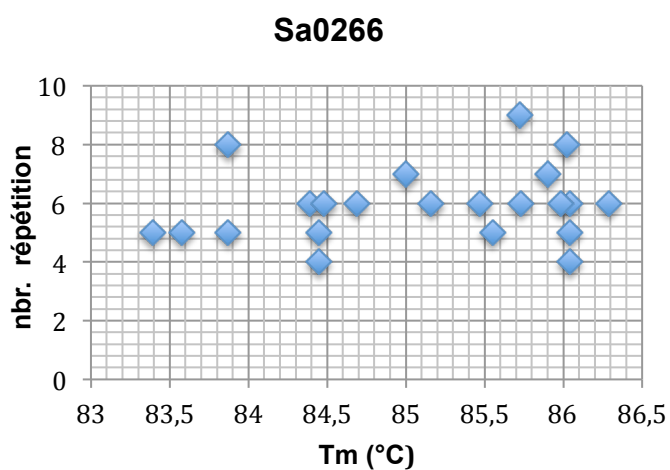
Les températures de fusion obtenues pour chaque VNTR sont résumées dans le tableau II.12 et comparées aux résultats de la MLVA classique exprimés en nombre de répétitions dans les graphiques correspondants.

Tableau II.12 : Comparaison Tm - nombre de répétitions pour les différents VNTR

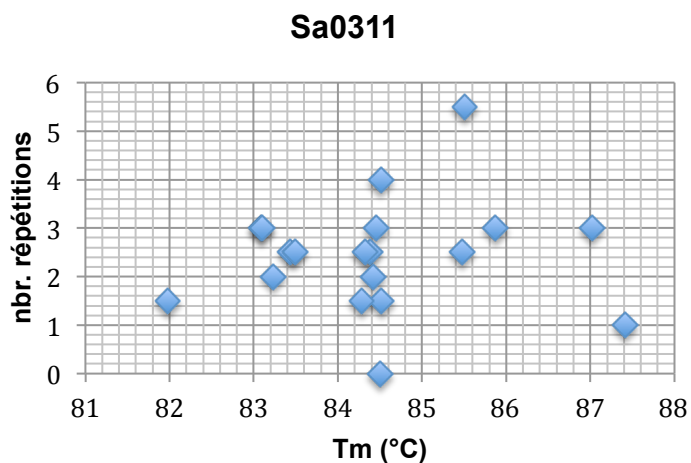
Souche	Sa0122	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	10	86,07
SE009	4	85,75
SE016	6	85,24
SE017	7	85,33
SE018	6	84,85
SE022	9	86,05
SE043	10	85,1
SE044	5	85,08
SE045	6	85,12
SE049	2	84,65
SE062	12	86,86
SE072	10	86,7
SE101	0	87,46
SE106	8	85,62
SE118	11	85,37
SE121	9	85,91
SE122	5	85,3
SE137	8	86,35
SE138	12	85,42
SE139	10	86,15
SE173	8	84,7
SE195	9	86,1



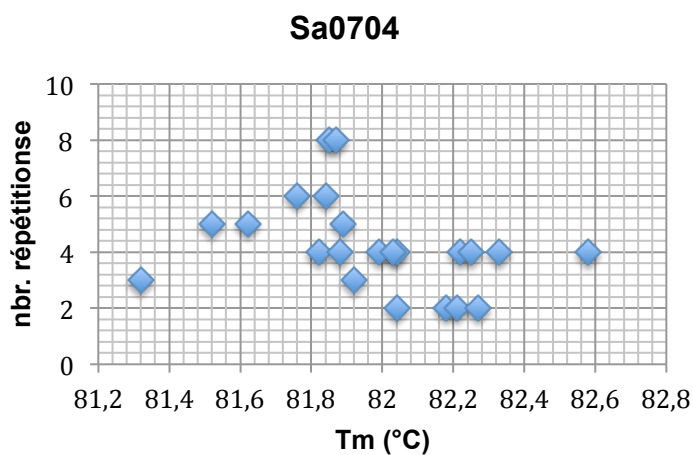
Souche	Sa0266	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	6	84,69
SE009	8	83,87
SE016	6	84,39
SE017	5	83,58
SE018	4	84,45
SE022	5	85,55
SE043	5	83,87
SE044	6	84,48
SE045	7	85,9
SE049	6	85,16
SE062	8	86,02
SE072	6	86,04
SE101	5	83,39
SE106	6	86,29
SE118	5	84,45
SE121	6	85,47
SE122	6	85,73
SE137	5	86,04
SE138	6	85,98
SE139	4	86,04
SE173	7	85
SE195	9	85,72



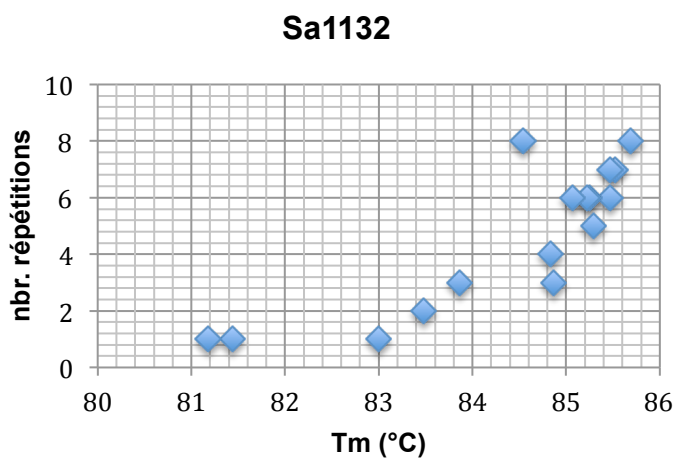
Souche	Sa0311	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	3	84,52
SE009	1,5	83,09
SE016	3	84,51
SE017	4	87,42
SE018	1	81,98
SE022	1,5	83,23
SE043	2	83,44
SE044	2,5	84,38
SE045	2,5	85,48
SE049	2,5	84,28
SE062	1,5	83,1
SE072	3	84,42
SE101	2	85,87
SE106	3	
SE118	2,5	83,49
SE121	2,5	84,32
SE122	2,5	84,46
SE137	3	85,51
SE138	5,5	87,02
SE139	3	84,5
SE173	0	
SE195	1,5	83,26



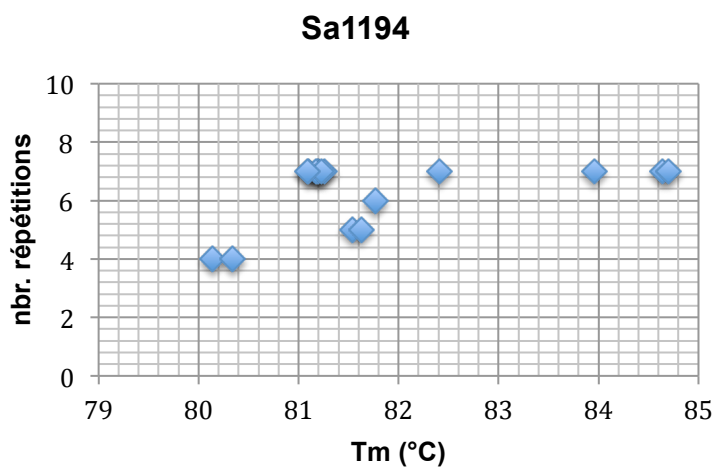
Souche	Sa0704	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	4	81,82
SE009	4	82,58
SE016	2	82,04
SE017	8	81,85
SE018	2	82,18
SE022	4	82,22
SE043	6	81,76
SE044	4	81,88
SE045	3	81,92
SE049	4	82,04
SE062	4	82,25
SE072	6	81,84
SE101	8	81,87
SE106	3	81,32
SE118	2	82,21
SE121	2	82,27
SE122	4	81,99
SE137	5	81,62
SE138	5	81,52
SE139	4	82,03
SE173	5	81,89
SE195	4	82,33



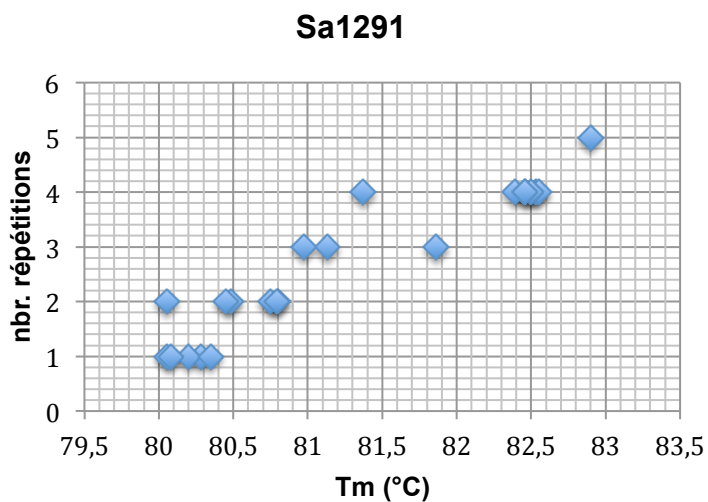
Souche	Sa1132	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	6	85,47
SE009	0	
SE016	6	85,25
SE017	1	81,44
SE018	3	83,86
SE022	4	
SE043	2	83,48
SE044	7	85,52
SE045	2	
SE049	7	85,47
SE062	2	
SE072	8	85,69
SE101	3	84,87
SE106	2	
SE118	8	84,54
SE121	6	85,22
SE122	5	85,29
SE137	4	84,83
SE138	1	83
SE139	6	85,07
SE173	1	81,18
SE195	2	



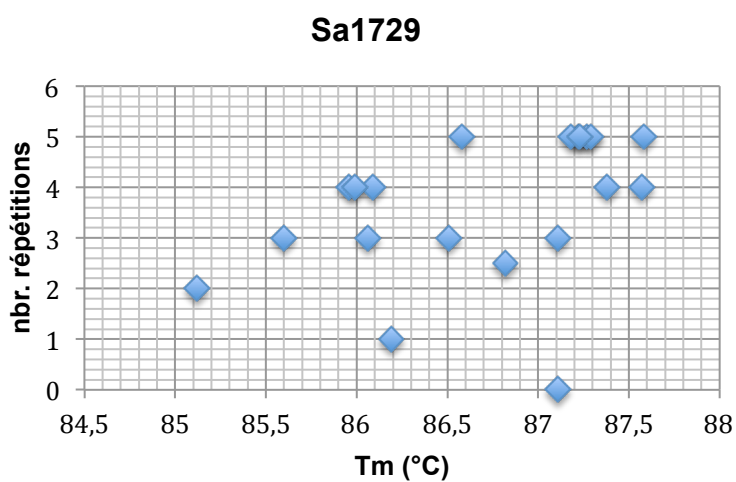
Souche	Sa1194	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	7	81,26
SE009	7	
SE016	7	81,1
SE017	4	80,14
SE018	7	83,96
SE022	7	
SE043	3	
SE044	7	81,2
SE045	5	
SE049	7	81,19
SE062	7	84,64
SE072	8	
SE101	4	80,34
SE106	5	
SE118	5	81,54
SE121	7	81,17
SE122	7	81,233
SE137	5	81,63
SE138	7	82,41
SE139	7	81,09
SE173	6	81,77
SE195	7	84,7



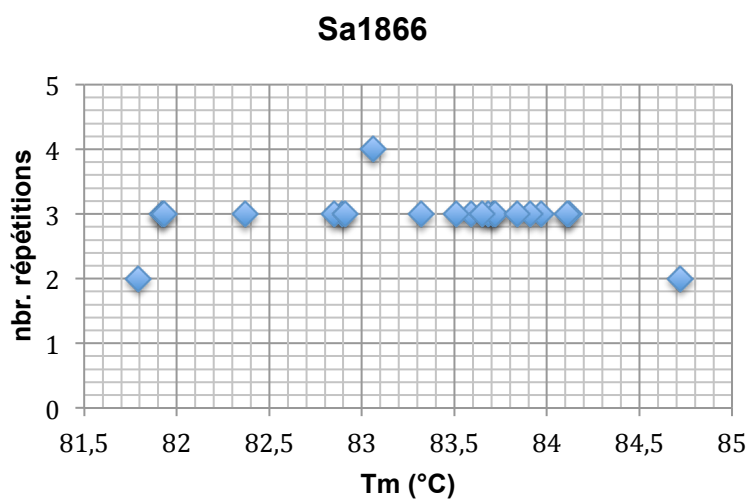
Souche	Sa1291	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	4	82,53
SE009	2	80,75
SE016	4	82,55
SE017	2	80,48
SE018	1	80,28
SE022	1	80,2
SE043	1	80,35
SE044	4	82,39
SE045	2	80,8
SE049	4	82,46
SE062	2	80,05
SE072	3	81,86
SE101	2	80,45
SE106	2	80,79
SE118	4	81,37
SE121	5	82,9
SE122	4	82,5
SE137	3	80,97
SE138	1	80,05
SE139	4	82,46
SE173	3	81,13
SE195	1	80,08



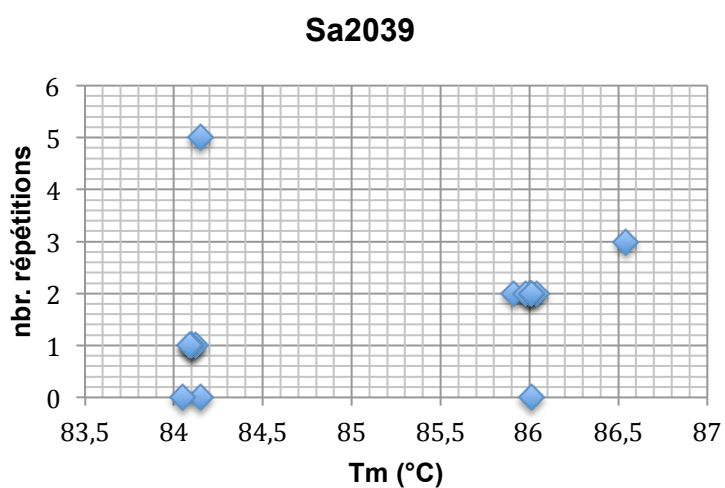
Souche	Sa1729	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	5	87,22
SE009	4	86,09
SE016	5	87,58
SE017	3	87,11
SE018	4	87,57
SE022	3	85,6
SE043	1	
SE044	5	87,27
SE045	4	85,96
SE049	5	87,18
SE062	5	86,58
SE072	5	87,29
SE101	4	87,38
SE106	5	
SE118	3	86,51
SE121	5	87,23
SE122	3	86,06
SE137	2,5	86,82
SE138	0	87,11
SE139	2	85,12
SE173	1	86,19
SE195	4	85,99



Souche	Sa1866	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	3	83,71
SE009	3	82,89
SE016	3	83,97
SE017	3	81,92
SE018	4	83,06
SE022	3	82,85
SE043	3	83,91
SE044	3	84,12
SE045	2	
SE049	3	84,11
SE062	3	82,91
SE072	3	83,68
SE101	3	81,93
SE106	2	84,72
SE118	3	83,72
SE121	3	83,59
SE122	3	83,65
SE137	2	81,79
SE138	3	83,51
SE139	3	83,84
SE173	3	83,32
SE195	3	82,37



Souche	Sa2039	
	Répétitions	Tm (°C)
Mu50	2	86,04
SE009	0	
SE016	1	84,1
SE017	0	
SE018	1	
SE022	0	
SE043	1	84,12
SE044	2	86
SE045	2	85,91
SE049	2	85,98
SE062	0	
SE072	1	
SE101	0	84,15
SE106	5	84,15
SE118	1	84,1
SE121	2	86,01
SE122	2	86,01
SE137	3	86,54
SE138	0	86,01
SE139	1	84,09
SE173	0	84,05
SE195	0	



Si une tendance à l'augmentation du T_m avec l'augmentation du nombre de répétitions se dessine pour les VNTR Sa0122, Sa1132 et Sa1291, aucune corrélation entre le T_m et la longueur des fragments amplifiés n'est observée pour les autres VNTR.

5. Discussion

5.1. Démarche suivie

L'objectif de ce travail était de tester la faisabilité de la MLVA en temps réel avec révélation par HRM et sa corrélation avec la technique source, la MLVA classique avec révélation par électrophorèse en gel d'agarose.

L'expérimentation s'est déroulée en deux étapes : la mise au point des PCR des différents VNTR dans des conditions de PCR quantitatives, puis le typage de souches de *S. aureus* et la comparaison des résultats obtenus avec la technique classique.

La première étape a permis d'obtenir des qualités de PCR correspondant aux critères fixés, avec une efficacité supérieure ou égale à 90 % pour 6 VNTR sur les 10 sélectionnés, et supérieure ou égale à 80 % pour 9 VNTR sur 10.

Ces résultats ont été jugés suffisants pour permettre d'initier la seconde étape qui consistait en une comparaison entre les deux techniques de MLVA sur des souches cliniques de *S. aureus*. Cette seconde étape constituait une approche préliminaire à une démarche plus globale de vérification de méthodes, qui doit être effectuée avant l'utilisation en routine de toute nouvelle technique.

Le choix de souches hétérogènes avait pour but de tester le pouvoir discriminant de la méthode sur un panel étendu d'allèles en mettant en évidence des différences de température de fusion significatives pour des nombres de répétitions différents. L'absence de corrélation observée entre température de fusion et nombre de répétitions d'un VNTR est un facteur limitant, rendant l'utilisation de l'HRM comme mode de détection de la MLVA non réalisable dans les conditions actuelles pour le typage moléculaire de *S. aureus*.

En conséquence, les autres critères de validation d'une méthode de typage moléculaire tels que l'aptitude à caractériser des liens de clonalité, la reproductibilité et la stabilité n'ont pas été testés.

5.2. Analyse des causes

L'absence de corrélation entre les résultats de MLVA classique, avec révélation par électrophorèse en gel d'agarose, et ceux de MLVA en détection HRM peut être liée à différents paramètres.

5.2.1. Concentrations en ADN

L'importance de la standardisation de la concentration en ADN pour l'analyse en HRM est soulignée dans la littérature (63). L'étude du génotypage par MLVA de *Bacillus anthracis* a montré une meilleure reproductibilité pour des concentrations standardisées de 20 à 40 ng/μL d'ADN purifié sur colonnes (76). Une des causes possibles de l'absence de corrélation entre les techniques pourrait être expliquée par l'absence d'ajustement de la quantité d'ADN dans les différentes solutions.

Cependant, différentes observations ne sont pas en faveur de cette hypothèse :

- les variations des concentrations en ADN observées ici ont un rapport inférieur à 2 en considérant les concentrations extrêmes. Or les résultats de mise au point des PCR montrent que les différences de températures de fusion entre des suspensions dont les concentrations ont des rapports de 10 voire 100 sont minimales et insuffisantes pour expliquer les différences observées. Par exemple, pour Sa1132, les températures de fusion moyennes sont 85,41 °C pour la solution pure, 85,67 °C au 1/10^{ème}, 86,04 °C au 1/100^{ème} et 86,26 °C au 1/1000^{ème} (figure II.16), soit moins de 0,4 °C d'écart entre des concentrations de rapport 10.

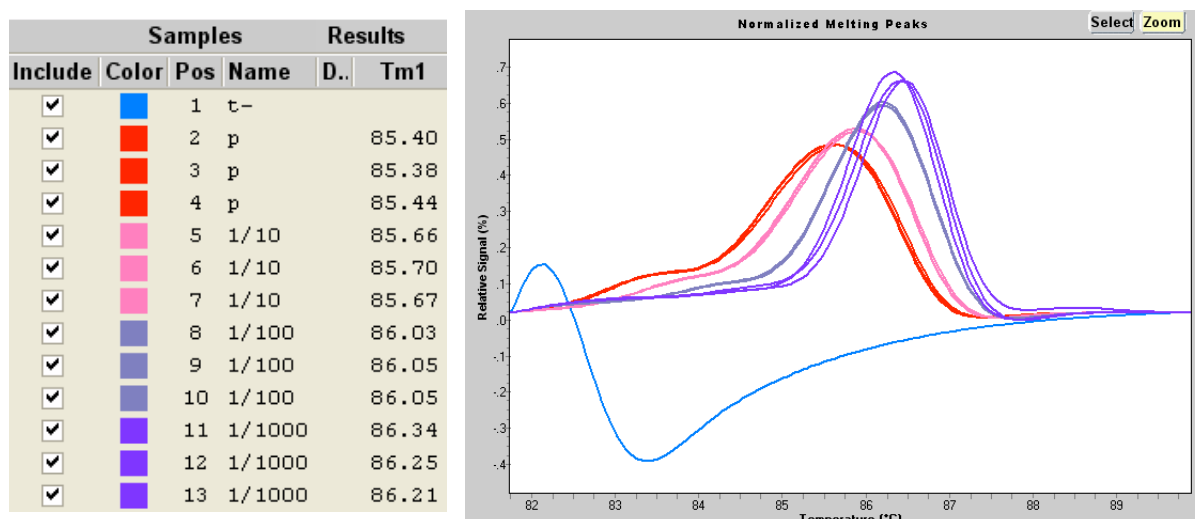


Figure II.16 : Tm et courbes de fusion des dilutions pour Sa1132

- des souches, possédant le même nombre de répétitions d'un VNTR, dont les solutions ont des concentrations en ADN différentes, ont néanmoins des T_m proches (tableau II.13 et figure II.17)
- inversement, des souches ayant le même nombre de répétitions et des concentrations en ADN proches peuvent avoir des T_m différents (tableau II.13 et figure II.18)

Tableau II.13 : Exemples de T_m du VNTR Sa0122

Souche	Nombre de répétitions	Concentration en ADN (ng/μL)	T _m (°C)
Mu50	10	25,39	86,06
SE043	10	27,43	85,09
SE072	10	28,80	86,70
SE139	10	18,85	86,14

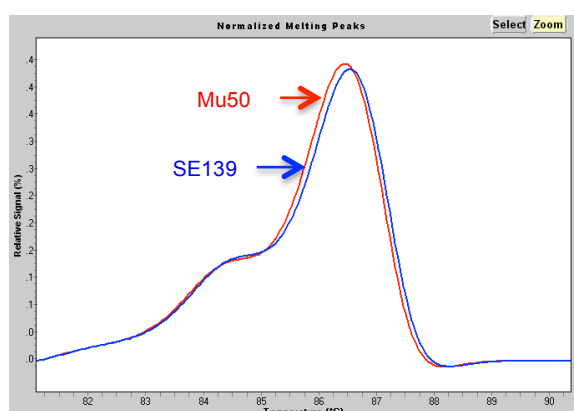


Figure II.17 : Courbes de fusion de Mu50 et SE139

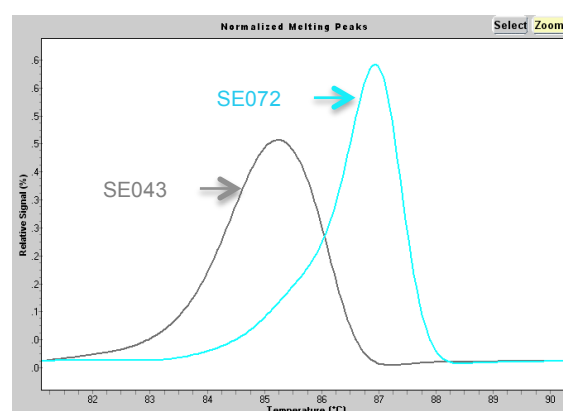


Figure II.18 : Courbes de fusion de SE043 et SE072

Les différences minimales de concentration en ADN des différentes solutions ne semblent donc pas expliquer les discordances obtenues. Une étape supplémentaire de purification de l'ADN extrait aurait peut être pu être évaluée.

5.2.2. Caractéristiques des VNTR

5.2.2.1. Taille des amplicons

Les séquences répétées des VNTR utilisés dans le schéma de MLVA testé ont des tailles relativement importantes, comprises entre 24 et 159 paires de bases. La longueur des

fragments amplifiés ($T_{\text{frgt}} = N_{\text{répet}} \times T_{\text{répet}} + \text{séquences flanquantes}$) est donc souvent supérieure à la longueur optimale, comprise entre 100 et 250 pb, voire même supérieure à la taille maximale recommandée de 500 pb (63). De manière plus générale, les VNTR d'intérêt de *S. aureus*, c'est à dire polymorphes en terme de nombre de répétitions, sont de tailles importantes (figure II.19) (59).

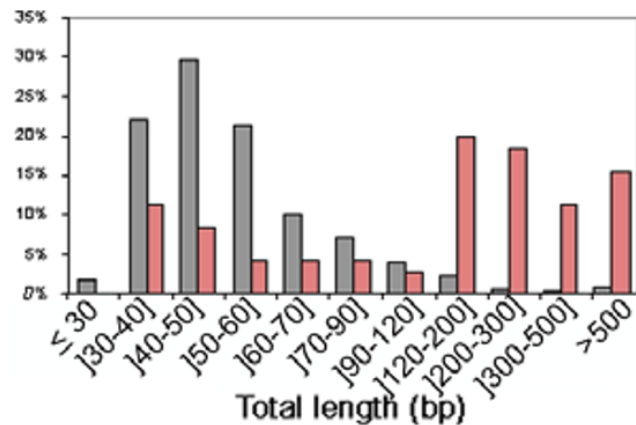


Figure II.19 : Répartition des différents VNTR de *S. aureus*, monomorphes (gris) et polymorphes (rose), selon leur taille (59)

Or les différences de température observées entre les petits amplicons sont plus importantes que celles séparant les amplicons de grandes tailles (67), ce qui pourrait expliquer un manque de sensibilité de la méthode, illustré par la figure II. 20 représentant différents allèles du VNTR Sa0311 possédant tous le même T_m .

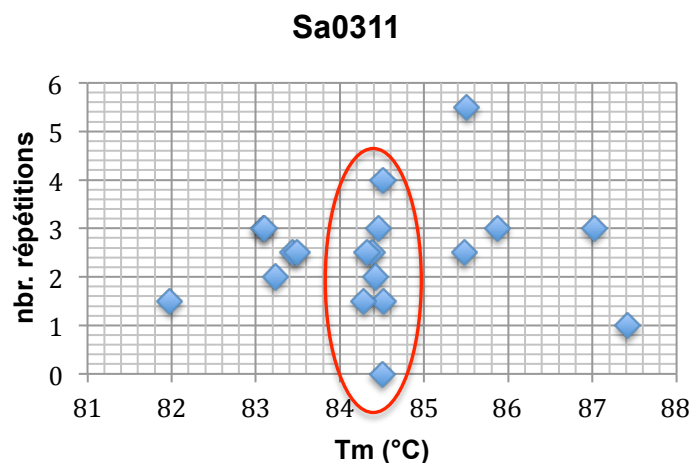


Figure II.20 : Exemple d'allèles différents de Sa0311 possédant des T_m identiques

De plus, un domaine de fusion mesure habituellement 50 à 300 pb. En conséquence, les fragments plus longs possèdent de multiples domaines de fusion (67), comme cela a été observé sur la souche Mu50 pour le VNTR Sa1729 (figure II.21). Si cela permet tout de même la détection de SNP par analyse de l'aspect la courbe de fusion, il n'en est pas de même pour l'estimation de la longueur des fragments en fonction de la température de fusion puisque plusieurs T_m seront observés.

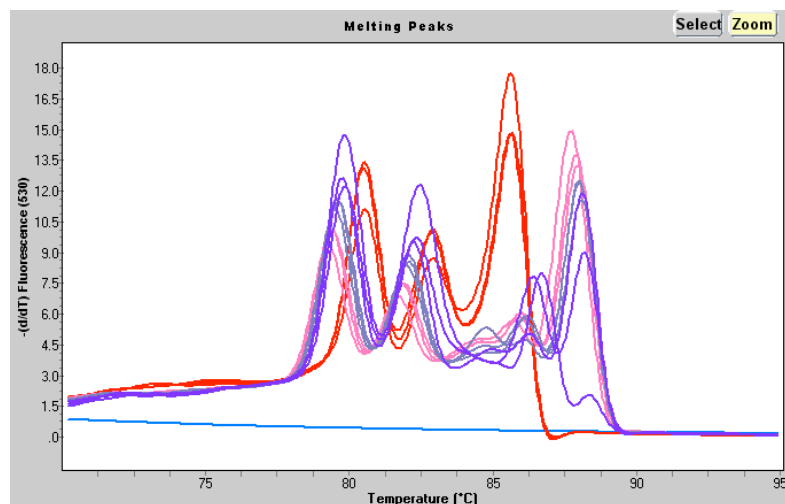


Figure II.21 : Souche Mu50 - VNTR Sa1729 : observation de multiples domaines de fusion

La taille des fragments amplifiés semble un élément critique, qui a déjà été mis en évidence lors du génotypage de *Bacillus anthracis* par MLVA avec détection en HRM et où l'HRM n'a pas permis de distinguer différents allèles du VNTR le plus long (76).

5.2.2.2. Séquences des VNTR

La taille des fragments amplifiés n'est pas le seul facteur ayant un effet sur la température de fusion. La composition en nucléotides est également un paramètre à prendre en compte. Or les séquences répétées utilisées en MLVA ne sont pas des répétitions parfaites d'une même séquence (59). Les pourcentages de recoupement entre les répétitions varient d'un VNTR à l'autre (figure II.22).

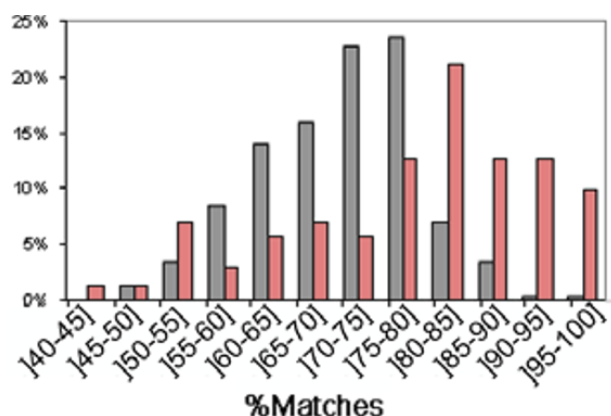


Figure II.22 : Pourcentage de recouvrement entre les répétitions des VNTR polymorphes (roses) et monomorphes (gris) de *S. aureus* (59)

Si ces pourcentages sont relativement élevés pour les VNTR polymorphiques de *S. aureus*, les GC % peuvent néanmoins en être affectés et expliquer l'absence de corrélation entre Tm et longueur du fragment amplifié, illustré par la figure II.23 représentant des allèles identiques du VNTR Sa1866 possédant des Tm différents.

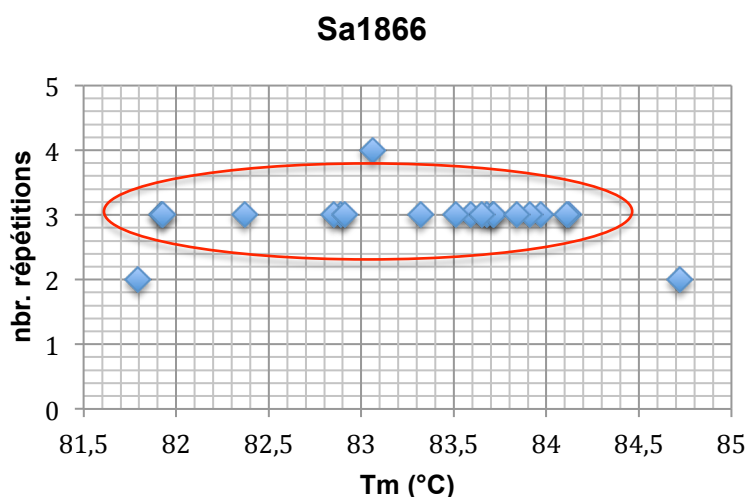


Figure II.23 : Exemple d'allèles identiques de Sa1866 possédant des Tm différents

Le séquençage des loci amplifiés serait nécessaire pour permettre de mieux appréhender l'influence de ce paramètre.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Staphylococcus aureus est un agent pathogène majeur de l'homme et constitue un réel problème de santé publique, justifiant l'existence d'un PHRC en cours, relatif aux pneumopathies communautaires à PVL. Des éléments génétiques mobiles sont responsables de l'apparition de souches hypervirulentes sécrétrices de toxines (TSST-1, PVL) impliquées dans des infections potentiellement létales, parfois couplées à une multi-résistance aux antibiotiques n'offrant que peu d'alternatives thérapeutiques.

La forte transmissibilité de ces souches, en milieu hospitalier comme en milieu communautaire, peut être à l'origine d'épidémies d'infections graves en l'absence de moyens de prévention adaptés. Le typage épidémiologique joue un rôle important dans la compréhension de leur diffusion : il permet de mettre en évidence l'implication de souches clonales dans une épidémie, d'identifier les vecteurs et les modes de transmission, et d'organiser une prévention opérationnelle et efficace.

Pour cette raison, de nombreuses méthodes de typage de *Staphylococcus aureus* ont été développées. Parmi elles, la MLVA se démarque par son fort pouvoir discriminant et sa reproductibilité inter-laboratoires permettant la constitution de bases de données internationales.

L'association de la MLVA à l'HRM a été proposée dans le but d'accroître l'accessibilité d'un laboratoire au génotypage. Cette technologie, encore peu employée, est prometteuse du fait de sa simplicité, de sa reproductibilité, de sa rapidité et de son faible coût, autant de caractéristiques intéressantes. Elle a d'ores et déjà fait ses preuves dans de nombreuses applications, dont certaines techniques de typage en microbiologie.

Après une phase d'optimisation des PCR quantitatives des différents VNTR réalisée avec succès, des souches cliniques hétérogènes, préalablement typées pour les mêmes VNTR par MLVA traditionnelle, ont été utilisées pour tester le pouvoir discriminant de l'HRM.

L'absence de corrélation entre les révélations par migration électrophorétique et par HRM, observée dès cette étape, exclut l'utilisation de l'HRM comme alternative simple à la migration en gel d'agarose.

Des écueils, liés à la technique, permettent d'avancer des hypothèses quant à cette absence de corrélation : la taille des amplicons de MLVA traditionnelle, trop importante, et l'absence d'homogénéité parfaite des séquences répétées, probablement à l'origine de variations en GC%, ne permettent pas de montrer une évolution linéaire du Tm en

fonction de la taille des amplicons. Un séquençage des amplicons obtenus serait nécessaire pour valider ces hypothèses.

Les résultats de ce travail, associés à l'absence de publications ou de trousse commerciales dans ce domaine, permettent de supposer que l'HRM n'est probablement pas le mode de détection le plus adapté à la MLVA de *S. aureus*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hill LR. Taxonomy of the staphylococci. *The staphylococci*. Aberdeen University Press; 1981.
2. Bes M, Brun Y. *Staphylococcus*: actualités taxonomiques et identification. *Rev Francoph Lab*. 2002;(343):23–30.
3. Flandrois J-P. *Bactériologie médicale*. Presse Universitaire de Lyon; 1997.
4. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, *et al*. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(12):751–62.
5. Caby F, Bismuth R, Bossi P. Infections à staphylocoques. *EMC - Traité Médecine AKOS*. 2010;5(1):1–7.
6. Centre National de Référence des Staphylocoques. *Les infections à Staphylocoques* [en ligne]. Disponible sur <http://cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr/webapp/website/website.html?id=2021394&pageId=129389> 2013 [consulté le 30 Août 2013].
7. Bernard L. Mécanismes physiopathologiques des infections sur matériel orthopédique. *Rev Rhum*. 2006;73(4):327–31.
8. Bantel H, Sinha B, Domschke W, Peters G, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU. α -toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol*. 2001;155(4):637–48.
9. Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Lab*. 2008;(407):61–9.
10. Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(2):183–200.
11. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, *et al*. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol*. 2001;183(24):7341–53.
12. Ferry T. Toxines super-antigéniques et état de choc. *Sympo Staph*; 2008.
13. Batard E, El Kouri D, Potel G. Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC - Mal Infect*. 2007;4(3):1–8.
14. Vandenesch F, Laurent F, Tristan A. Rapport d'activité du CNR des Staphylocoques 2011. *INVS* 2011.
15. Domart Y. Principes thérapeutiques des infections à staphylocoques. Place et limites des molécules classiques. *Ann Fr Anesth Réanim*. 2002;(21):392–8.

16. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, *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(9308):753–9.
17. Rafai M, Abouelalaa K, Sekhsokh Y, Balkhi H, Belyamani L, Dimou M. Évolution fatale d’une arthrite septique à *Staphylococcus aureus* méti-S producteur de la leucocidine de Panton et Valentine (LPV). *Rev Rhum* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1169833013000367>. 2013 [consulté le 12 Août 2013].
18. Nhan T-X, Gillet Y, Vandenesch F. Diagnostic et traitements des infections toxiques à *Staphylococcus aureus*. *J Anti-Infect*. 2012;14(3):117–26.
19. Libert N, Batjom E, Cirodde A, de Rudnicki S, Grasser L, Borne M, *et al.* Traitements antitoxiniques et pneumopathies nécrosantes à *Staphylococcus aureus* sécréteurs de leucocidine de Panton-Valentine. *Médecine Mal Infect*. 2009;39(1):14–20.
20. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain J-M. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton–Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(5):467–70.
21. Dumitrescu O. Effet inducteur des antibiotiques sur la production de leucocidine de Panton Valentine par *S. aureus*. *10èmes Journées Nationales d’Infectiologie*; 2009.
22. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy M-E, *et al.* Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1515–9.
23. Traoré O, Souweine B, Leclercq R. Dans quelles situations instituer des précautions de type « contact » chez les patients porteurs de bactéries multi-résistantes ? *Réanimation*. 2002;11(6):451–63.
24. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2008;8(6):747–63.
25. Ganesan A, Crawford K, Mende K, Murray CK, Lloyd B, Ellis M, *et al.* Evaluation for a novel methicillin resistance (*mecC*) homologue in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from injured military personnel. *J Clin Microbiol*. 2013;51(9):3073–5.
26. Monecke S, Gavier-Widen D, Mattsson R, Rangstrup-Christensen L, Lazaris A, Coleman DC, *et al.* Detection of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in diseased european hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e66166.

27. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):99–139.
28. Leclercq R. Glycopeptides et staphylocoques. *L'antibiogramme*. Editions ESKA; 2012. p. 323.
29. Howden BP, Peleg AY, Stinear TP. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infect Genet Evol* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813001366> [consulté le 13 Août 2013].
30. Selvey LA, Michael Whitby M, Barbara Johnson R. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: is it any worse than nosocomial methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21(10):645–8.
31. Lucet J. Intérêt du dépistage du staphylocoque doré résistant à la méticilline en réanimation. *Ann Françaises Anesthésie Réanimation*. 2002;21(5):384–91.
32. Coignard B, Rahib D. Infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Sarm) dans les établissements de santé, France, 2005-2008. *INVS*; 2009.
33. Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA). *Rapport d'activité 2009-10*. [En ligne]. Vivactis Plus Ed 2011; Disponible sur : www.onerba.org [consulté le 20 Août 2013].
34. Alfandari S, Carre N, Coignard B, Del Giudice P, Dupon M, Lepape A, *et al*. 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). *Haut Conseil de la Santé Publique*; 2009.
35. Garnier F, Chainier D, Walsh T, Karlsson A, Bolmström A, Grelaud C, *et al*. A 1 year surveillance study of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* strains in a French hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(1):146–9.
36. Traitement des infections à staphylocoques résistant à la méticilline (MRSA) acquises dans la communauté. *Med Lett*. 2006;28(6):1.
37. Llarrull LI, Fisher JF, Mobashery S. Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new β -lactams that meet the challenge. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(10):4051–63.
38. Anderson SD, Gums JG. Ceftobiprole: An extended-spectrum anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin. *Ann Pharmacother*. 2008;42(6):806–16.

39. Bert F. Facteurs de risque et traitement des infections à *Staphylococcus aureus* méticilline-résistant. *Presse Med.* 2002;(31):1792–6.
40. Astagneau P, Seringe E. Infections nosocomiales et associées aux soins. *EMC - Savoirs Soins Infirm.* 2010;60-590-B-10:1–7.
41. Astagneau P, Gambotti L. Infections nosocomiales. *EMC - Traité Médecine AKOS.* 2007;2(1):1–5.
42. Thiolet J, Vaux S, Lamy M, Gautier A, Barret A, Léon L, *et al.* Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2012. Résultats. *INVS*; 2012.
43. Cholley P, Thouverez M, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Talon D. Application des méthodes de typage génomique au laboratoire d'hygiène. *Rev Francoph Lab.* 2013;(453):65–70.
44. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;13 Suppl 3:1–46.
45. Gerner-Smidt P, Hyytiä-Trees E, Rota P. Molecular epidemiology. *Man Clin Microbiol.* 10th Edition. ASM Press; 2011. p. 100–23.
46. Centre National de Référence des légionnelles. *Glossaire des souches endémiques* [en ligne]. Disponible sur http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR_legionelles/ [consulté le 30 Août 2013].
47. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* 2002;35(7):819–24.
48. Belkum A van, Struelens M, Visser A de, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(3):547–60.
49. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, *et al.* Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(2):407–15.
50. C H Zierdt IKH. Phage pattern-specific oxacillin-resistant and borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals: epidemiological significance. *J Clin Microbiol.* 1992;30(1):252–4.
51. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233–9.

52. Tambic A, Power EG, Talsania H, Anthony RM, French GL. Analysis of an outbreak of non-phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol.* 1997;35(12):3092–7.
53. Deplano A, Schuermans A, Eldere JV, Witte W, Meugnier H, Etienne J, *et al.* Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(10):3527–33.
54. Lina G, Durand G, Berchich C, Short B, Meugnier H, Vandenesch F, *et al.* Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(12):1175–84.
55. Oliveira D, Milheiriço C, Vinga S, de Lencastre H. Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:23–30.
56. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, *et al.* Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 1996;15(1):60–4.
57. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, *et al.* Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa*-typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3095–100.
58. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, *et al.* New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1801–4.
59. Denœud F, Vergnaud G. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains : a web-based resource. *BMC Bioinformatics.* 2004;5(1):1–12.
60. Ikawaty R, Willems RJL, Box ATA, Verhoef J, Fluit AC. Novel multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis method for rapid molecular typing of human *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):3147–51.
61. Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, Sakwinska O, Deurenberg RH, Vergnaud G. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, Providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3121–8.

62. Leroy-Terquem É. Les nouvelles technologies de biologie moléculaire en diagnostic. *Option Bio*. 2009;20(412):9–13.
63. Chomarat M, Breysse F. Technique d'analyse des courbes de fusion haute résolution (FHR) ou High Resolution Melting analysis (HRM) en infectiologie. *Immuno-Anal Biol Spécialisée*. 2011;26(4):207–11.
64. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications. *Biol Biotechnol*. 2002;2(2):2–11.
65. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*. 1997;22(1):130–1, 134–8.
66. Mao F, Leung W-Y, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol*. 2007;7(1):76.
67. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003;49(6):853–60.
68. Jiménez I de J, Cardeñosa EE, Suela SP, González EB, Gilabert PB. Advantages of the high resolution melting in the detection of *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers. *Clin Biochem*. 2009;42(15):1572–6.
69. Krenková P, Norambuena P, Stambergová A, Macek M Jr. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the *CFTR* gene. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(6):238–42.
70. Rapado I, Grande S, Albizua E, Ayala R, Hernández J-A, Gallardo M, *et al*. High resolution melting analysis for *JAK2* exon 14 and exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2009;11(2):155–61.
71. Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid diagnosis of old world leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2240–2.
72. Hrnčířová K, Lengerová M, Kocmanová I, Racil Z, Volfová P, Paloušová D, *et al*. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3392–4.
73. Chen X, Kong F, Wang Q, Li C, Zhang J, Gilbert GL. Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10):3450–7.
74. Merchant-Patel S, Blackall PJ, Templeton J, Price EP, Tong SYC, Huygens F, *et al*. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(2):493–9.
75. Stephens AJ, Inman-Bamber J, Giffard PM, Huygens F. High-resolution melting analysis of the *spa* repeat region of *Staphylococcus aureus*. *Clin Chem*. 2008;54(2):432–6.

76. Fortini D, Ciammaruconi A, Santis RD, Fasanella A, Battisti A, D'Amelio R, *et al.* Optimization of high-resolution melting analysis for low-cost and rapid screening of allelic variants of *Bacillus anthracis* by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Clin Chem.* 2007;53(7):1377–80.
77. Lesens O, Haus-Cheymol R, Dubrous P, Verret C, Spiegel A, Bonnet R, *et al.* Methicillin-susceptible, doxycycline-resistant *Staphylococcus aureus*, Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):488–90.
78. Védy S, Garnotel E, Koeck J-L, Simon F, Molinier S, Puidupin A. Étude des populations staphylococciques hospitalières : apport des techniques récentes de biologie moléculaire. *Pathol Biol.* 2007;55(8–9):382–9.
79. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, *et al.* Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001;357(9264):1225–40.
80. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations 2013.* 2013.

VU

NANCY, le **23 septembre 2013**

Le Président de Thèse

NANCY, le **23 septembre 2013**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur A. LOZNIEWSKI

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE N°6631

NANCY, le 30/09/2013

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Professeur P. MUTZENHARDT

RÉSUMÉ DE LA THESE

Staphylococcus aureus est un agent pathogène majeur de l'homme. Cette espèce est capable d'acquérir à la fois de nombreux facteurs de virulence et de multiples résistances aux antibiotiques. Le fort pouvoir de dissémination des souches peut être à l'origine d'épidémies d'infections graves en l'absence de moyens de prévention adaptés. Le typage épidémiologique joue un rôle important dans la compréhension de leur transmission et permet d'organiser une prévention opérationnelle et efficace. De nombreuses méthodes de typage de *Staphylococcus aureus* ont été développées, dont la MLVA qui se démarque par son pouvoir discriminant.

L'association de la MLVA à l'HRM a été proposée dans ce travail dans le but d'accroître l'accessibilité d'un laboratoire au génotypage. Cette technologie, encore peu employée, est simple, reproductible, rapide, possède un faible coût et a déjà fait ses preuves dans de nombreuses applications.

Ce travail a été réalisé en deux étapes. Après une phase d'optimisation des PCR quantitatives des différents VNTR réalisée avec succès, des souches cliniques hétérogènes, préalablement typées pour les mêmes VNTR par MLVA traditionnelle, ont été utilisées pour tester le pouvoir discriminant de l'HRM. L'absence de corrélation entre les révélations par migration électrophorétique et celles obtenues par HRM ne permet pas de proposer l'utilisation de cette dernière comme alternative simple à la migration en gel d'agarose.

Différentes hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette absence de corrélation. Un séquençage des amplicons obtenus serait nécessaire pour valider ces hypothèses.

TITRE EN ANGLAIS

Typing of *Staphylococcus aureus* by MLVA : study of feasibility of detection by HRM

THESE : Médecine spécialisée – Année 2013

MOTS-CLES : *Staphylococcus aureus*, typage épidémiologique, MLVA, HRM

INTITULE ET ADRESSE

Université de Lorraine
Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex