



# REMERCIEMENTS

*A Mon Maître*

*Monsieur le Professeur Mustapha MAHMOUD*

*Permettez-moi cher maître de vous exprimer mon profond respect et mon dévouement profond, puissions-nous être votre égal tant sur le plan professionnel qu'humain, votre dévotion et votre acharnement, sont l'exemple même du biologiste que nous souhaitons tous devenir.*

*A Mon Maître*

*Madame le Professeur Bouchra OUMOKHTAR*

*Permettez-moi de vous remercier quant à vos efforts et le temps que vous nous avez consacré tant bien humainement parlant que professionnellement, Vos conseils précieux, votre encadrement permanent et vos qualités pédagogiques ont permis la réalisation de ce travail.*

*Veillez trouver dans ce mémoire, l'expression de ma plus grande estime, mon profond respect et ma sincère gratitude.*

*A Mon Maître*

*Madame le Professeur Ghita YAHYAOUI*

*Je vous remercie pour vos conseils et votre encadrement au cours de mon cursus de résidanat. Veillez accepter mes remerciements et mon admiration pour vos qualités humaines et professionnelles.*

*A Mes parents*

*Vous avez guidé mes pas depuis mon enfance, et votre amour pour votre métier a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*Je vous remercie pour votre amour et votre soutien inconditionnel sans lesquels ce travail n'aurait pas vu le jour.*

*Je vous aime très fort.*

*A mes sœurs,*

*Ces quelques mots ne suffiront jamais à exprimer ma gratitude et tout l'amour que je vous porte. Merci d'être à mes côtés et me soutenir chaque jour que dieu fait.*

*A mon Mari,*

*Mon Amour, aucune ébauche de vie n'est à peine imaginable sans toi à mes côtés. Ta présence, ton soutien et ta dévotion font de toi le pilier qui a permis à ce travail de voir le jour et d'accomplir ma carrière professionnelle.*

*A Mon fils Abdullah,*

*Depuis le jour où tu es entrée dans ma vie, cette dernière s'ait embellie. Tout l'amour que je te porte ne pourraient être contenues dans ces quelques lignes.*

# Sommaire

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES GRAPHIQUES.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>13</b>
I. La leucocidine de Panton–Valentine .....	14
1. Historique .....	14
2. Origine et support génétique de la toxine de Panton–Valentine .....	14
3. Structure et mécanisme d'action.....	16
II. Physiopathologie et modèles proposés .....	20
1. Rôle de la PVL dans les infections cutanées.....	20
2. Rôle de la PVL dans les pneumopathies nécrosantes .....	22
III. Détection biologique de la PVL.....	26
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>29</b>
1. Étude bactériologique.....	30
2. Analyse moléculaire .....	30
3. Données cliniques .....	32
4. Analyse statistique .....	32
<b>RESULTATS .....</b>	<b>36</b>
I. Données épidémiologiques .....	37
1. Age .....	37
2. Sexe.....	37
3. L'origine .....	38
4. Service .....	39

5. Nature du prélèvement.....	40
II. Clinique .....	41
III. Données biologiques .....	42
1. Leucopénie.....	42
2. La protéine C réactive .....	42
IV. Sensibilité aux antibiotiques.....	43
V. Recherche du gène codant la PVL .....	44
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>46</b>
I. Epidémiologie des infections à S. aureus PVL+.....	47
1. Données épidémiologiques aux Etats–Unis .....	47
2. Prévalence estimée de la PVL en France.....	49
3. Facteurs de risque associés .....	51
II. Sémiologie clinique des infections à S. aureus sécréteurs de PVL.....	53
1. Infections cutanées .....	54
2. Pneumopathie nécrosante .....	55
3. Infections ostéo–articulaires .....	57
III. Stratégies thérapeutiques des infections à S. aureus PVL+ .....	58
1. Infections cutanées .....	58
2. Infections pulmonaires .....	61
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>62</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>68</b>

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Mécanisme de recombinaison permettant l'insertion des gènes phagiques codant la PVL dans le génome bactérien.
- Figure 2** : Structure de  $\Phi$ Sa2958.
- Figure 3** : Représentation tridimensionnelle de la structure tertiaire des sous-unités LukF–PV et LukS–PV déterminée par cristallographie.
- Figure 4** : Modèle du pore formé par la leucocidine de Panton–Valentine sous forme d'octamère.
- Figure 5** : Séquence d'assemblage de la leucocidine de *S. aureus*.
- Figure 6** : déclenchement de l'apoptose par la toxine PVL
- Figure 7** : hypothèse physiopathologique In Vitro proposée pour les infections cutanées à *S. aureus* PVL+.
- Figure 8** : hypothèse physiopathologique In Vitro. Mécanisme indirect de toxicité de la PVL par lyse des polynucléaires et relargage de médiateurs.
- Figure 9** : modèle physiopathologique chez le lapin des pneumopathies nécrosantes associées à *S. aureus* sécréteur de leucocidine de Panton–Valentine.
- Figure 10** : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du produit d'amplification
- Figure 11** : profil caractéristique de résistance du clone européen ST80.
- Figure 12** : pyramide clinique des infections associées à la toxine de Panton–Valentine.

## LISTE DES GRAPHIQUES

**Graphique 1** : Répartition selon le sexe.

**Graphique 2** : Répartition selon l'origine.

**Graphique 3** : Répartition selon les services.

**Graphique 4** : Répartition selon le site infectieux

**Graphique 5** : Répartition selon le motif de consultation/hospitalisation

**Graphique 6** : Répartition selon le profil de résistance

**Graphique 7** : Répartition des différents complexes clonaux de *S. aureus* aux USA et la prévalence de la leucocidine de Panton–Valentine au sein de chacun de ces complexes.

**Graphique 8** : Courbes de survie des patients en fonction du génotype des souches isolées du tractus respiratoire.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1** : Amorces utilisées pour la détection des gènes luk–PV.

**Tableau 2** : **Caractéristiques** épidémiologiques et cliniques des souches PVL+.

**Tableau 3** : Sensibilité aux antibiotiques des différents *S.aureus* PVL+.

**Tableau 4**: Résultats de l'étude de Gilles Prévost sur la prévalence des toxines synergohyménotropes au sein de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

**Tableau 5** : Résultats de l'étude de Pascal Del Giudice et son équipe sur des patients porteurs d'infections cutanées à *S. aureus*.

**Tableau 6** : Recommandations ANSM juillet 2010.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ANSM	: Agence Nationale de Sécurité du Médicament
BET	: Bromure d'éthidium
BHI	: Bouillon coeur–cervelle (BrainHeart Infusion)
CASFM	: Comité français de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CN	: Gentamicine
CNR	: Centre National de Référence des staphylocoques de Lyon
Désoxyribonucléase	: ADNase
E	: Erythromycine
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FOX	: Céfoxitine
FD	: FusidicAcid (acide fusidique)
ICT	: Test immunochromatographique
LCR	: Liquide céphalo–rachidien
LEV	: Levofloxacin
MY	: Lyncomycine
PCR	: Polymerase chain reaction
PG	: Pénicilline G
PVL	: Leucocidine de Panton–Valentine
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SASM	: <i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SSTIs	: Skin and Soft Tissues Infections

- ST : Strain Type
- SXT : Sulfaméthaxazole-triméthoprim (cotrimoxazole)
- TEC : Teicoplanine
- TAE : Tampon Tris-acétate
- VA : Vancomycine

# INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est un agent pathogène colonisant 20 à 30% de la population générale et entraînant un large spectre d'infections suppuratives (cutanée, pulmonaire, cardiaque, osseuse, ostéo-articulaire, ...) et de maladies toxiques, aussi bien dans un contexte nosocomial que communautaire [1,2]. Derrière cette variété de tableaux cliniques, se cache une grande diversité génotypique et phénotypique des souches isolées au laboratoire.

*S. aureus* se caractérise des autres staphylocoques par l'expression d'un arsenal de toxines, de molécules d'adhésions, d'enzymes et autres facteurs de virulence qui lui permettent d'envahir son hôte et d'échapper à ses défenses immunitaires.

Parmi ces toxines, la Leucocidine de Panton–Valentine (PVL). C'est une exotoxine synergohymenotropique (action synergique de deux composés LukS–PV et LukF–PV) appartenant à la famille des toxines, Les souches de *S. aureus* hébergeant la PVL sont classiquement associées à des infections cutanées comme les furoncles, des infections ostéo-articulaires sévères et des pneumonies nécrosantes [3]. Leur évolution est marquée par la chronicité ou la récurrence de l'infection malgré une antibiothérapie et un suivi adaptés.

La PVL n'est pas recherchée de manière systématique mais plusieurs études de caractérisation génotypique des staphylocoques dorés ont été menées en France. La recherche des gènes lukS–PV et lukF–PV est souvent réalisée à cette occasion et permet donc d'avoir une estimation de la prévalence de ces gènes sur les souches de *S. aureus* isolées au laboratoire, la PVL n'est produite que par 2% des souches de *S. aureus* isolés.

La situation française est très différente de certains pays notamment aux Etats–Unis où des souches communautaires de *S. aureus* comme le clone USA300 – très souvent producteur de leucocidine de Panton–Valentine – sont très répandues parmi la population. Des caractères génétiques particuliers de ces clones ainsi que des

facteurs associés à l'hôte expliquent leur diffusion très importante voire épidémique dans certaines populations [4].

Parallèlement au développement de l'antibiothérapie, des mécanismes de résistance sont apparus chez *S. aureus* jusqu'à l'émergence de staphylocoques dorés multi-résistants (SARM). Ces germes de traitement difficile étaient autrefois cantonnés au milieu hospitalier. Depuis le début des années 2000, les microbiologistes assistent à l'émergence rapide de souches de SARM communautaires notamment aux Etats–Unis où le nombre de ce type d'infection a considérablement augmenté en dix ans. Ces SARM communautaires ont pour particularité d'exprimer fréquemment la leucocidine de Panton–Valentine qui peut donc servir de marqueur épidémiologique dans ce contexte.

L'objectif de notre travail est de :

Estimer la fréquence du *S. aureus* producteur de la PVL,

Étudier les caractéristiques de ces souches et des patients infectés.

# RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

# I. La leucocidine de Panton–Valentine

## 1. Historique

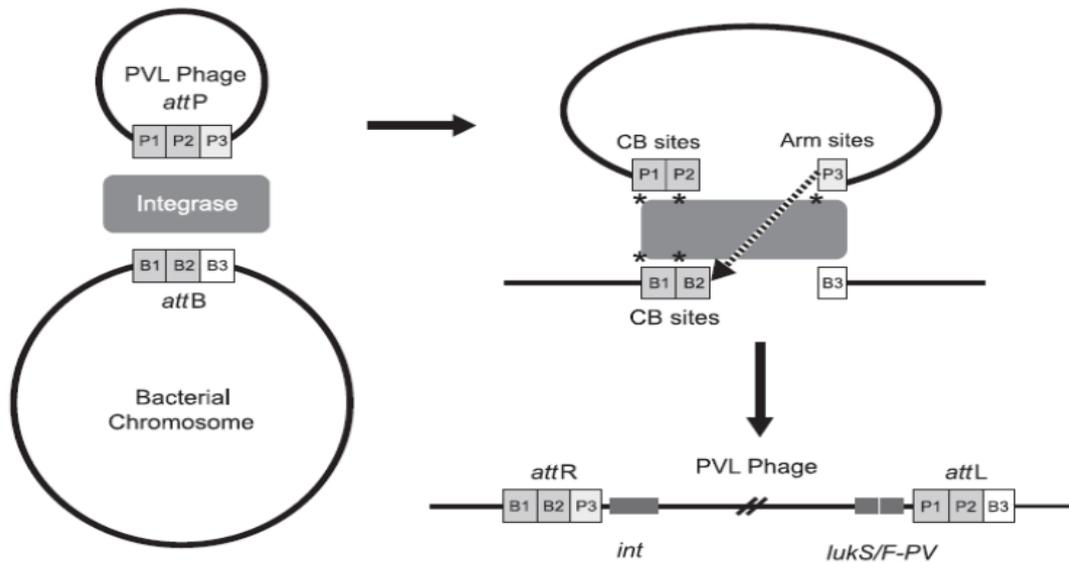
La leucocidine de Panton–Valentine fut initialement découverte par Van de Velde en 1894 grâce à sa capacité à lyser les leucocytes. Elle fut nommée d'après Sir Philip Noel Panton et Francis Valentine qui l'associèrent en 1932 aux infections des tissus mous [5, 6].

## 2. Origine et support génétique de la toxine de Panton–Valentine

De nombreux facteurs de virulence bactériens sont portés par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les phages ou les transposons. La PVL n'est produite que par 2% des souches de *S. aureus* isolés en France [4]. Devant cette faible prévalence, il était probable que la transmission des gènes codant pour les sous-unités de la leucocidine de Panton–Valentine se fasse selon un mode horizontal par le biais d'un élément génétique mobile. Chez de nombreuses espèces bactériennes, les gènes codant les toxines sont portés par des phages. C'est le cas de *Corynebacterium diphtheriae*, du streptocoque A, de *Clostridium botulinum* ou encore de *Vibrio cholerae*[7].

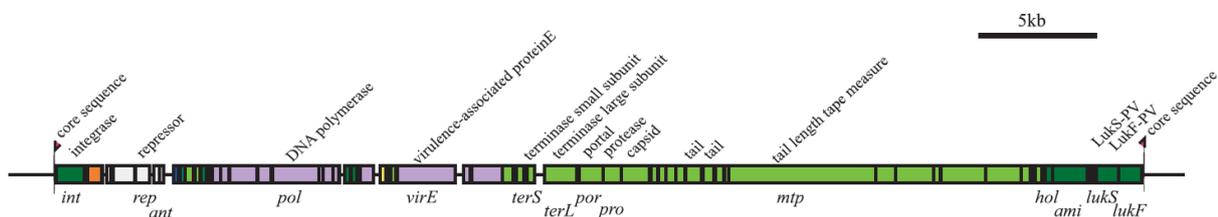
L'hypothèse de l'acquisition de la PVL par *S. aureus* par le biais d'un phage lysogénique a été postulée très tôt. Dès 1972, Jan C. M. van der Vijver a démontré que l'action d'un bactériophage sur une souche de staphylocoque pouvait amener celle-ci à produire une leucocidine sans toutefois préciser laquelle et sans mettre en évidence le transfert des gènes codant la PVL[8]. Ces gènes ont été mis en évidence dans le génome de plusieurs phages lysogéniques :  $\phi$ Sa2958,  $\phi$ Sa2MW,  $\phi$ PVL, 108PVL,  $\phi$ SLT, and  $\phi$ Sa2USA[9]. Le mécanisme de conversion lysogénique par un phage porteur des gènes codant la PVL a été démontré en 2001 par Kamio et al, qui ont utilisé  $\phi$ SLT pour transformer une souche de *S. aureus* PVL– en souche productrice de

leucocidine (Figure1).



**Figure 1** : mécanisme de recombinaison permettant l’insertion des gènes phagiques codant la PVL dans le génome bactérien. Le phage et la bactérie possèdent un site d’attachement spécifique (attP et attB). Une intégrasephagique est capable de couper le double brin d’ADN au niveau de ces sites puis d’effectuer une ligation selon le schém\_a détaillé ci-dessous[10].

Les génomes de ces différents phages partagent une structure très proche. On retrouve chez chacun d’entre eux les éléments génétiques nécessaires à l’intégration, la réplication et la synthèse du phage. La PVL est encodée par deux gènes cotranscrits correspondant aux sous-unités protéiques LukS–PV et LukF–PV (Figure 2).

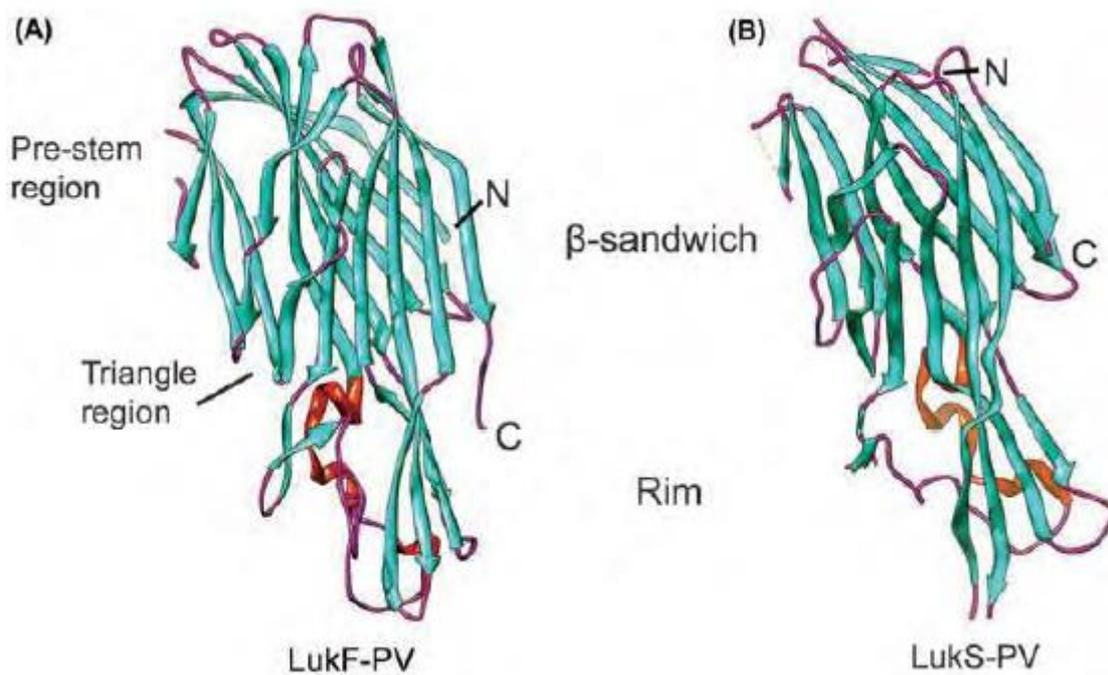


**Figure 2** : Structure de  $\Phi$ Sa2958. Les deux flèches aux extrémités marquent les sites d’attachement (att), les différents éléments sont schématisés sous forme de rectangles [11].

Ces séquences sont ainsi retrouvées au sein du génome des souches de *S. aureus* PVL+ sous forme de prophage. Ce mode de réplication virale est appelé cycle lysogénique, la bactérie n'est pas lysée lors de sa réalisation et le prophage est transmis lors de la division bactérienne. Sous certaines conditions, la réplication peut aussi se faire par un cycle lytique beaucoup plus rare (1 fois sur 100 000)[12].

### 3. Structure et mécanisme d'action

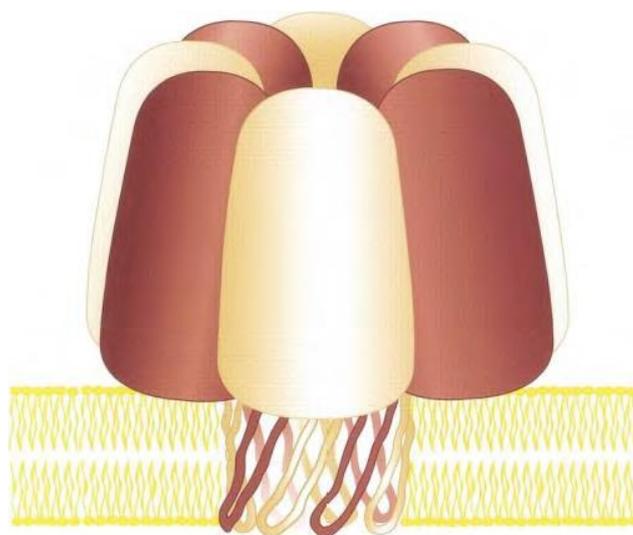
La leucocidine PVL est une toxine synergohyménotrope composée de deux sous-unités protéiques : LukF–PV, 34 kDa et LukS–PV, 32 kDa.<sup>8</sup> Ces deux composés sont capables de s'assembler en oligomères et de se fixer spécifiquement sur la membrane des cellules phagocytaires de l'humain et du lapin mais pas sur celles des rongeurs ou des macaques[13]. (Figure 3)



**Figure 3** : représentation tridimensionnelle de la structure tertiaire des sous-unités LukF–PV et LukS–PV déterminée par cristallographie. On remarquera la richesse des structures en feuillets  $\beta$ [14].

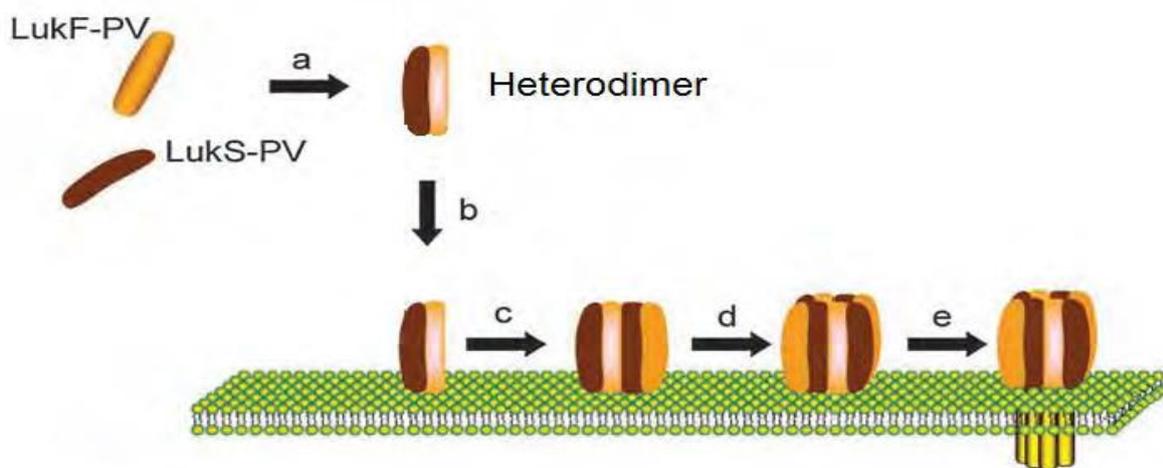
La toxine appartient à la famille des beta-PFTs (beta-barrel pore-forming toxins) comme les autres enzymes cytolitiques des staphylocoques, l' $\alpha$ -hémolysine par exemple. Ces molécules s'assemblent dans le milieu extérieur pour former de grands ensembles protéiques capables de s'enchâsser dans la bicouche phospholipidique des membranes après liaison avec un récepteur spécifique. Ces multimères forment des pores capables de laisser passer les ions calcium à travers les membranes des cellules. Ce mécanisme semble être la base de la cytotoxicité de la PVL [15].

Le complexe assemblé n'a pas été encore décrit mais plusieurs observations de ces pores ont été faites soit de manière directe (microscopie électronique) soit indirecte (mise en évidence du relargage d'un marqueur cellulaire). Le modèle le plus étayé est celui d'un octamère [16] composé de 4 sous-unités LukS–PV et de 4 LukF–PV s'alternant régulièrement autour d'un axe central. Ce complexe viendrait se fixer à la paroi des polynucléaires, des macrophages et des monocytes suggérant un récepteur d'origine myéloïde [17]. (Figure 4)



**Figure 4 :** Modèle du pore formé par la leucocidine de Panton–Valentine sous forme d'octamère [15].

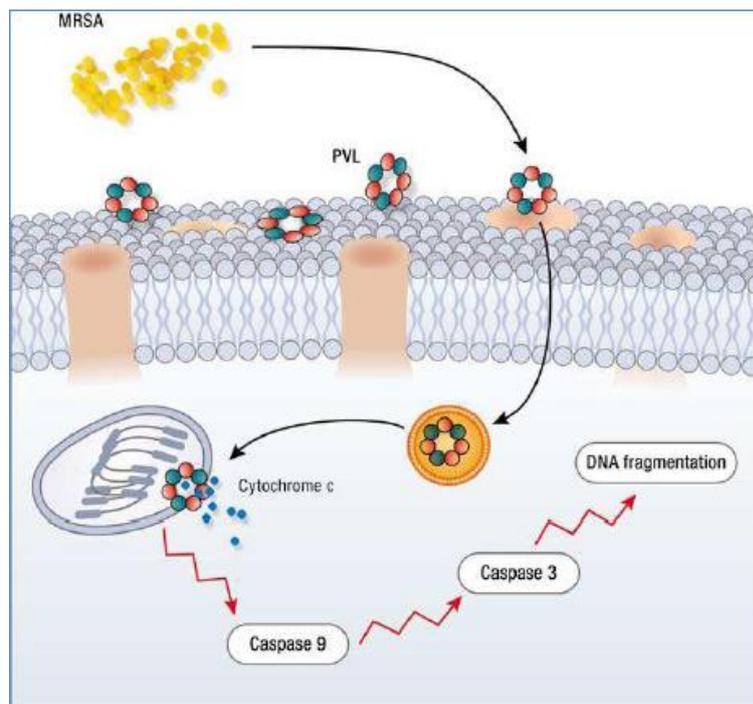
L'assemblage et la fixation de la toxine se feraient selon un processus en plusieurs étapes (Figure 5) : sécrétion des deux sous-unités LukS-PV et LukF-PV sous forme hydrosoluble, formation d'hétérodimères puis d'hétérotétramères (2S+2F) et assemblage en octamères (4S+4F). A ce stade, les sous-unités forment un pré-pore qui subit des changements de conformation majeurs encore mal connus. Ces dernières modifications provoquent l'ouverture du pore et le passage des composés de moins de 2 kD comme les ions calcium et potassium[18]. Ce passage incontrôlé des ions à travers les membranes des cellules aboutit à leur destruction.



**Figure 5** : séquence d'assemblage de la leucocidine de *S. aureus*[14].

La fixation de la toxine se fait par le biais de la sous-unité LukS-PV qui reconnaît avec une forte affinité le récepteur de la fraction C5a du complément C5aR. La découverte de cette cible a permis de beaucoup mieux comprendre la spécificité de la leucocidine. En effet, le C5aR n'est présent en abondance que sur les polynucléaires, les macrophages et les monocytes. De plus, il présente des variations inter-espèces importantes ce qui explique l'échec des modèles murins utilisés par le passé et la résistance à la PVL des polynucléaires de souris et de macaques. La fraction LukS-PV est aussi capable de se lier au récepteur C5L2 (C5a anaphylatoxin chemotactic receptor) mais son rôle serait mineur par rapport à celui de C5aR [13].

La toxicité cellulaire de la PVL s'exprime de deux façons. A faible concentration, elle a essentiellement une activité pro-apoptotique sur les polynucléaires. L'apoptose est déclenchée par la voie mitochondriale par ouverture de pores directement sur les mitochondries. Pour des concentrations plus élevées, il semblerait que l'effet dominant de la PVL soit la nécrose[19]. (Figure 5)



**Figure 6** : déclenchement de l'apoptose par la toxine PVL[6].

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

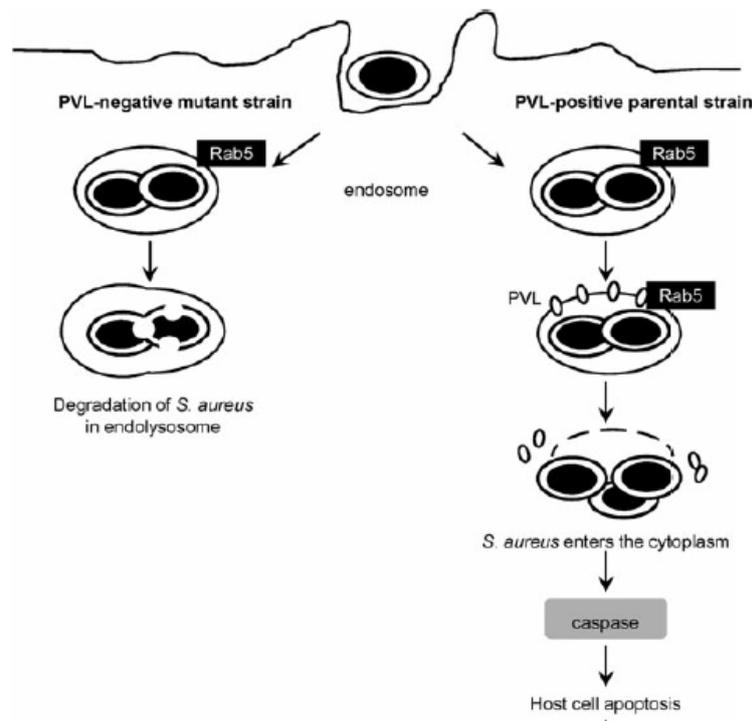
## II. Physiopathologie et modèles proposés

Les associations entre les infections staphylococciques et le portage des gènes codant la PVL reposent essentiellement sur des études épidémiologiques. Ces travaux mettent en évidence deux grandes entités pathologiques associées à la leucocidine de Panton–Valentine : les infections de la peau et des tissus mous (SSTIs – Skin and Soft Tissues Infections) [20], [21], [22] et [23] et les pneumopathies nécrosantes[24]. Les lésions nécrotiques semblent être le point commun des différentes infections impliquant la leucocidine de Panton–Valentine[3].

### 1. Rôle de la PVL dans les infections cutanées

Il n'existe pas à ce jour de modèle physiopathologique complet qui décrit le rôle de la PVL dans les infections de la peau et des structures cutanées. De plus, le rôle de la leucocidine en tant que facteur de virulence majeur dans les infections de la peau et des tissus mous reste controversé[25], [26] et [27]. Il y aurait néanmoins une association épidémiologique probante entre ces infections et la présence de la PVL[28], [29], [3] et [4]. Plusieurs auteurs rapportent cependant des arguments en faveur d'un rôle de la PVL dans ces infections. Yu F. et al ont montré que le niveau d'expression de l'ARNm du gène codant pour LukS–PV était plus élevé dans les prélèvements cutanés que dans les hémocultures. Il était aussi plus élevé chez les enfants que chez les adultes[30]. Un modèle cellulaire in vitro a été proposé en 2013 par Chia–Yu Chi et son équipe pour étudier la physiopathologie des infections cutanées à *S. aureus* PVL+. Le kératinocyte (lignée RHEK–1, cellules épithéliales humaines immortalisées) a été retenu comme modèle à cause de son rôle dans la défense immunitaire innée des infections staphylococciques. En effet, les kératinocytes sont capables de former des endosomes, de détruire les bactéries par ce biais et donc de limiter la prolifération bactérienne intracellulaire. La leucocidine

est capable de former des pores dans les membranes des endosomes limitant leur action. Il est important de noter que d'autres toxines staphylococciques possèdent cette capacité notamment l' $\alpha$ -toxine. Ce mécanisme permet à la bactérie d'échapper à la destruction par les endosomes[31] (Figure 7).



**Figure 7** : hypothèse physiopathologique In Vitro proposée pour les infections cutanées à *S. aureus* PVL+[32]. Chia–Yu Chi et al Journal of Infectious Diseases. 15 jan 2014

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

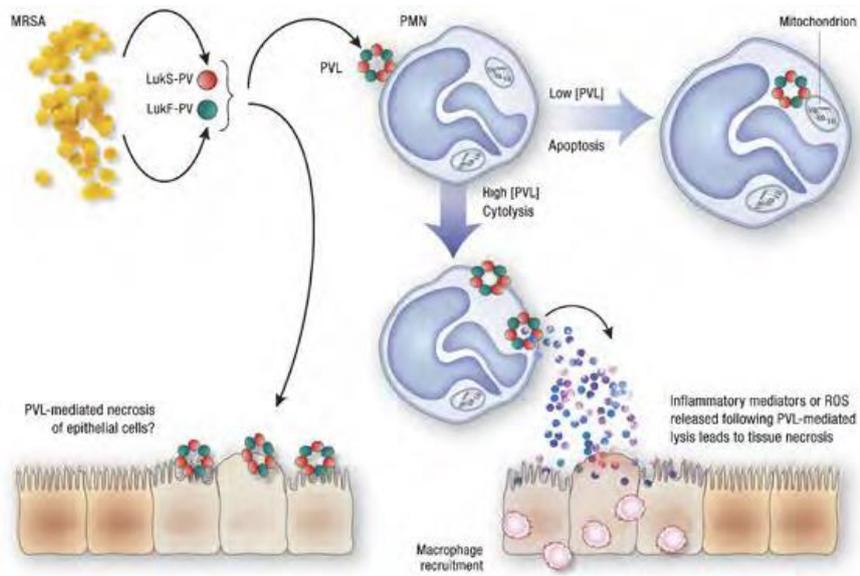
Le modèle animal le plus pertinent pour explorer la physiopathologie de la PVL dans les infections cutanées semble être le lapin puisque ses polynucléaires sont très sensibles à l'action de la leucocidine comme le sont ceux de l'humain. Lipinska et al ont administré une souche de *S. aureus* PVL+ et la souche KO correspondante à des lapins au niveau du derme et du muscle. Les lapins ayant reçu la PVL ont développé des lésions nécrotiques de plus grande taille que ceux ayant reçu la souche KO. Ces animaux ont aussi produit des anticorps dirigés contre la toxine[33]. Les articles parus sur le modèle du lapin sont cependant peu nombreux et certains résultats pourraient être expliqués par l'impact d'un autre facteur : l' $\alpha$ -hémolysine du staphylocoque[34].

## **2. Rôle de la PVL dans les pneumopathies nécrosantes**

La toxicité de la leucocidine s'exprimerait aussi par la lyse des polynucléaires. Cette hypothèse est plus ancienne, elle découle directement du mécanisme d'action de la toxine et de son affinité pour les polynucléaires humains. En 1995, B. König et G. Prevost ont étudié l'effet de la PVL sur la libération In vitro de différents médiateurs de l'inflammation par les granulocytes [35]. Ils ont observé une libération importante de plusieurs composés :

- L'histamine par les polynucléaires basophiles et les mastocytes qui est un facteur vasodilatateur majeur,
- Des enzymes contenues dans les granules des polynucléaires (lysozyme et  $\beta$ -glucuronidase),
- Du leucotriène B<sub>4</sub>, composé dérivé de l'acide arachidonique pro-inflammatoire et puissant chémo-attractant,
- De l'interleukine 8 qui participe à la formation d'un gradient chémotactique nécessaire au recrutement des polynucléaires sur le site de l'infection,

- Des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène qui ont une action bactéricide.
- Ce sont ces produits et non la leucocidine qui entraîneraient les lésions tissulaires observées. Dans ce modèle, la PVL agit par un effet indirect (Figure 8).



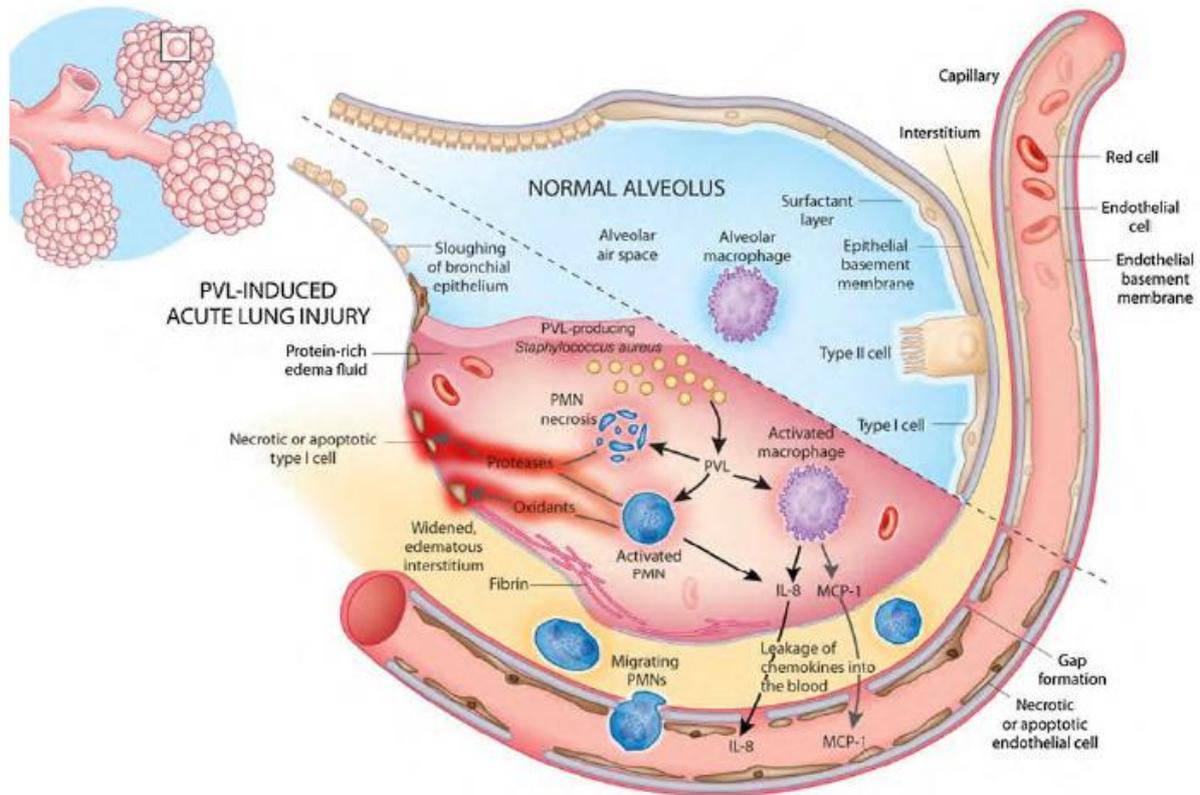
**Figure 8** : hypothèse physiopathologique In Vitro. Mécanisme indirect de toxicité de la PVL par lyse des polynucléaires et relargage de médiateurs [6].

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

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

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

Pour répondre à cette question les auteurs ont évalué le nombre de bactéries à des intervalles de temps réguliers sur des biopsies pulmonaires des deux groupes test. Il n'y avait pas de différence en termes d'inoculum bactérien entre les deux groupes suggérant un effet indépendant de la PVL. De plus, sur les LBA du groupe ayant reçu la souche PVL+, le taux des protéines totales (origine plasmatique) était significativement plus important ce qui est en faveur d'une destruction des cellules épithéliales alvéolaires. La mesure des taux d'IL–8 et de MCP–1 sur ces mêmes liquides montre des résultats allant dans le sens d'une infiltration et d'une lyse plus importante des polynucléaires dans le groupe ayant reçu la PVL [36] (Figure9).



**Figure 9** : modèle physiopathologique chez le lapin des pneumopathies nécrosantes associées à *S. aureus* sécréteur de leucocidine de Panton-Valentine. Les flèches noires indiquent des séquences argumentées, les flèches grises sont des hypothèses [37].

### III. Détection biologique de la PVL

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

La technique la plus couramment utilisée consiste à rechercher les gènes *lukS–PV* et *lukF–PV* par PCR en utilisant un couple d'amorce spécifique. Cette recherche peut être soit isolée (PCR simplex) ou combinée avec la recherche d'autres gènes d'intérêt (PCR multiplex). Le délai de rendu final de résultat est long si l'on prend en compte le temps nécessaire pour isoler la bactérie et réaliser la PCR (minimum 72 heures). Ces techniques sont très sensibles et très spécifiques. D'autre part les tests de détection phénotypiques type ELISA (enzyme–linked immunosorbent assay) ou test immunochromatographique (ICT) ne sont pas utilisés en routine mais plusieurs auteurs ont mis au point et évalué des tests « maison » qu'ils ont confrontés aux résultats de la PCR.

#### ❖ Détection de la PVL par RT–PCR

La détection rapide des souches de *S. aureus* productrices de PVL constitue un élément essentiel pour optimiser la prise en charge des patients notamment en cas de suspicion de pneumopathie nécrosante. La mise à disposition d'un tel outil peut permettre une confirmation rapide de ce diagnostic et la mise en place de thérapie ciblée (antibiotiques « anti–toxiques », Immunoglobulines, ECMO) ou à l'inverse une exclusion du diagnostic permettant l'exploration d'autres hypothèses cliniques. Une technique d'amplification génique par PCR en temps réel des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine a été mise en place au centre national de référence de Lyon (CNR) à partir des isolats. La technique utilise une extraction rapide

et des amorces spécifiques permettant d'amplifier sur LightCycler 1 (Roche Diagnostic) un fragment d'ADN du gène lukSF–PV. L'utilisation de SYBR GREEN, capable de s'intercaler dans l'ADN double brin, assure la révélation des produits d'amplification. Le résultat est disponible en 3 heures et peut être transmis immédiatement au laboratoire prescripteur.

#### ❖ Dosage de la PVL par ELISA

Ce test permet la quantification de la production de PVL dans un échantillon biologique ou dans le surnageant d'une culture bactérienne. L'objectif était de : pouvoir déterminer si certaines souches de *S. aureus* contenant les gènes de la PVL, et notamment les souches à potentiel épidémique comme les SARM communautaire, sont productrices ou non de quantités élevées de PVL, pouvoir déterminer les concentrations de PVL produite localement dans les différents tissus, détecter la production de PVL directement sur des prélèvements cliniques afin de pouvoir établir le diagnostic dès les premières heures de prise en charge des patients.

La technique repose sur un test ELISA utilisant un anticorps polyclonal de lapin et un anticorps monoclonal recombinant produit en collaboration avec le laboratoire bioMérieux®. Afin de valider ce nouvel outil, nous avons utilisé à un large panel de souches et de prélèvements biologiques. Plus de 300 souches de divers fonds génétiques ont été analysées et nous avons observé une concordance parfaite entre le test ELISA PVL et la PCR. De même, le test appliqué sur les échantillons cliniques, pus cutanés et osseux, liquides articulaires, aspirations trachéales, liquides de lavage broncho–alvéolaire et liquides pleuraux a confirmé les données obtenues après cultures. Sur ces prélèvements, le test ELISA PVL a présenté une spécificité de 100% et une sensibilité de 95%, ce qui en fait un test diagnostic fiable et rapide, le résultat pouvant être obtenu en moins de 3 heures.

Cette technique reste pour l'instant du domaine R&D et n'est pas utilisée en routine mais est en cours d'implémentation au sein du CNR.

❖ **ICT pour la détection rapide de la PVL.**

Méthode de détection de la PVL plus rapide que le test ELISA, facilement industrialisable et commercialisable. De plus, les tests immunochromatographiques sont simples d'utilisation, faciles à conserver (température ambiante) et beaucoup moins coûteux que les techniques de PCR commercialisées actuellement ou les tests ELISA car ils ne requièrent aucun matériel spécifique et aucun prérequis spécifique pour le personnel amené à les réaliser. Les résultats peuvent être obtenus dans l'heure, directement à partir des échantillons cliniques (y compris les écouvillons) en l'absence de tout matériel spécifique. Le développement de ce type de test permet d'envisager une détection rapide et simple de la PVL dans tous les laboratoires, permettant d'identifier rapidement les patients atteints d'infections sévères PVL+ et assurant ainsi la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée [38] et [39].

# MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective sur une durée de deux ans (du janvier 2017 au décembre 2018) incluant l'ensemble des isolats de *S. aureus*, identifiés au laboratoire de microbiologie à partir de prélèvements cliniques de patients hospitalisés ou consultants au CHU Hassan II de Fès.

## **1. Étude bactériologique**

L'identification de *S. aureus* a été faite sur la base des caractères morphologiques, culturels et biochimiques : la coloration de Gram, la production de la catalase, le test d'agglutination rapide aux particules de latex (Slidex1 Staph–kit bioMérieux®, France) et La désoxyribonucléase (ADNase).

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose, et l'interprétation a été réalisée selon les recommandations du Comité Français de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA–SFM).

Si le staphylocoque était sensible à la pénicilline, une recherche de pénicillinase par méthode chromogénique a été réalisée (Céfinase1, bioMérieux®, France). En cas de doute sur la sensibilité du staphylocoque à la méticilline, la recherche de la protéine liant la pénicilline additionnelle (PLP2a) a été effectuée, après induction avec un disque de céfoxitine (Slidex1 MRSA Detection, bioMérieux®, France).

## **2. Analyse moléculaire**

L'étude moléculaire concerne la recherche du gène *lukS–PV* et *lukF–PV* par PCR dans les isolats du *S. aureus*.

### ➤ Extraction d'ADN

Pour extraire l'ADN total, nous avons adopté la méthode du choc thermique. A partir des cultures jeunes, nous avons prélevé cinq colonies à l'aide d'une anse stérile et on les a mis dans des tubes eppendorfs contenant 500 µl d'eau distillée stérile. Les tubes doivent être homogénéisés par vortex. Ensuite, ils sont mis dans un bain marie

à 100 °C pendant 10 minutes puis immédiatement dans la glace durant 2 min. enfin, une centrifugation de 14000tr/min pendant 10 minutes a été réalisées pour récupérer l'ADN présent dans le surnagent et qui va servir dans la réaction PCR. Une aliquote de chaque ADN a été conservé à -20°C.

➤ Amplification génique ou PCR

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel d'amplification de 25 µl contenant 2µL de l'ADN des souches, des amorces sens et antisens, de l'eau ultra pure, des déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP), de la Taq ADN polymérase, du MgCl<sub>2</sub> et du tampon de la réaction.

**Tableau 1** : Les amorces utilisées pour la détection des gènes luk–PV. [40]

Gène	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille d'amorce	Taille fragment (pb)
<i>LukS/F-PV</i>	pvl-1	(ATC ATT AGG TAA AAT CGT TGG ACA TGA TCCA)	31N	433
	pvl-2	(GCA TCA AGT GTA GTA TTG AGC AAA AGC)	27N	

Pour confirmer les résultats de l'amplification génique, nous avons utilisé deux témoins :

Un témoin négatif qui est constitué de tous les composants de la réaction sauf l'ADN.

Un témoin positif qui contient, en plus des composants de la réaction, le gène PVL.

Après dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 minutes, l'ADN est amplifié grâce à 25 cycles. Chaque cycle est constitué des étapes suivantes :

- Incubation à 94°C pendant 1 minute
- Incubation à 53°C pendant 30 secondes
- Incubation à 72°C pendant 1 minute

Après, on réalise une extension finale à 72°C pendant 6 min.

- Révélation du produit d'amplification par électrophorèse

Les produits amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%, coloré au bromure d'éthidium (BET).

### **3. Données cliniques**

Les données ont été recueillies sur une fiche d'exploitation comportant :

- Numéro de demande, IP, sexe, âge,
- Le motif d'hospitalisation.
- Les données biologiques (CRP, nombre de leucocytes)
- Les caractères bactériologiques de l'hémoculture.
- L'antibiogramme.

### **4. Analyse statistique**

Les données ont été saisies et analysées à l'aide du logiciel Excel 2010.

FICHE D'EXPLOITATION

N° : .....

Date : ...../...../.....

I. Identité :

Date d'entrée : ...../...../.....

Age : .....

Date de sortie : ...../...../.....

Sexe :  M  F

Service: .....

Origine :  urbaine  rurale

profession : .....

II. Antécédents :

Hospitalisation :  oui  non

Service : ..... Date : .....

durée : .....

Antibiothérapie :  oui  non

Type : .....

Durée : .....

Preuve bactériologique : .....

Tabagisme:  oui  non

Alcoolisme :  oui  non

Drogue IV :  oui  non

Animaux domestiques: ..... oui non type : ...

Autres : .....

.....

III. Clinique :

Etat général :

AEG :  oui  non

Fièvre:  oui  non T °c : .....

Infections cutané–muqueuses :

- folliculite
- impétigo
- cellulites
- furoncle
- abcès
- lymphangite
- anthrax
- fasciites
- nécrosantes
- ecthyma

Infections toxiques :

Epidermolyse staphylococcique aigue

Syndrome de choc toxique staphylococcique

Scarlatine

Staphylococcies ostéo–articulaires : .....

Staphylococcies pleuro–pulmonaires : .....

Staphylococcies neuro–méningées :.....

Bactériémies : .....

Endocardites : .....

Autre :.....

IV.Paraclinique :

Biologie :

GB : ..... Lymphocytes : PNN : .....

CRP :      •oui    •non                      si oui : .....

Imagerie :

Radio standard : •oui •non

Normale :      •

Pathologique :    •

Echographie :    •oui                      •non

Normale :      •

Pathologique :    •

TDM–IRM    •oui    •non                      Compte rendu : .....

Diagnostic retenue : .....

V.Traitement :

Traitement médical :

Antibiothérapie :

Monothérapie : .....

Bithérapie :

Date de sortie : ...../...../.....

Relais par voie orale : .....

Durée du traitement : .....

traitement chirurgical :

•oui      •non

Type :

Evolution :

**Microbiologie :**

N° prélèvement:

Date :

Nature du prélèvement :

Localisation :

Sensibilité aux antibiotiques :

Sensible à :

Résistant à :

# RESULTATS

## I. Données épidémiologiques

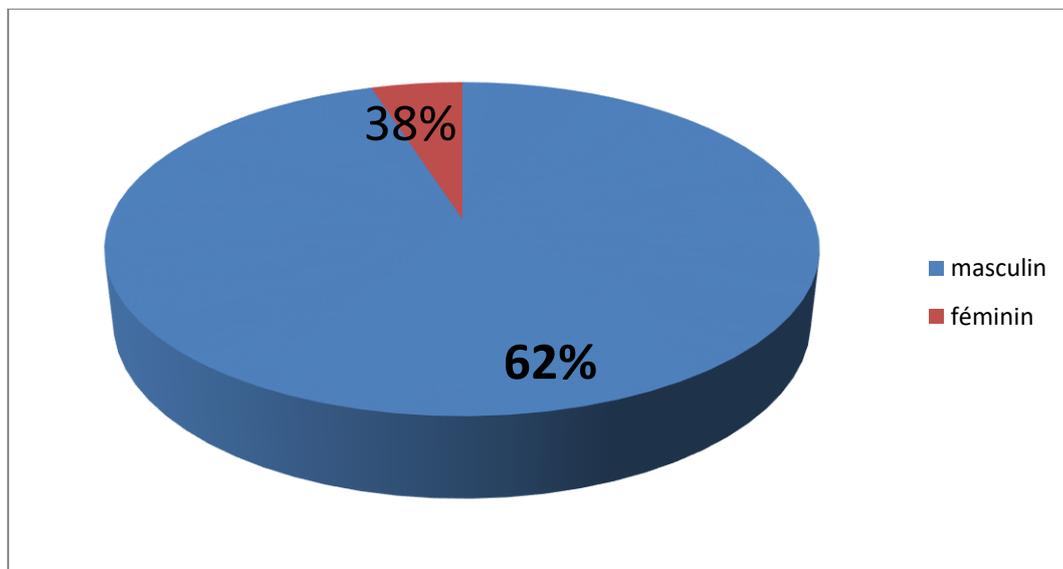
### 1. Age

Notre étude a porté sur un échantillon de 100 patients.

L'âge moyen des patientes était de 38 ans avec des extrêmes de 6 mois et 84 ans.

### 2. Sexe

Sur l'ensemble des patients on avait noté une prédominance masculine, avec 62 % de sexe masculin contre 38 % de sexe féminin, soit un sex-ratio de 1,63 (figure 10)

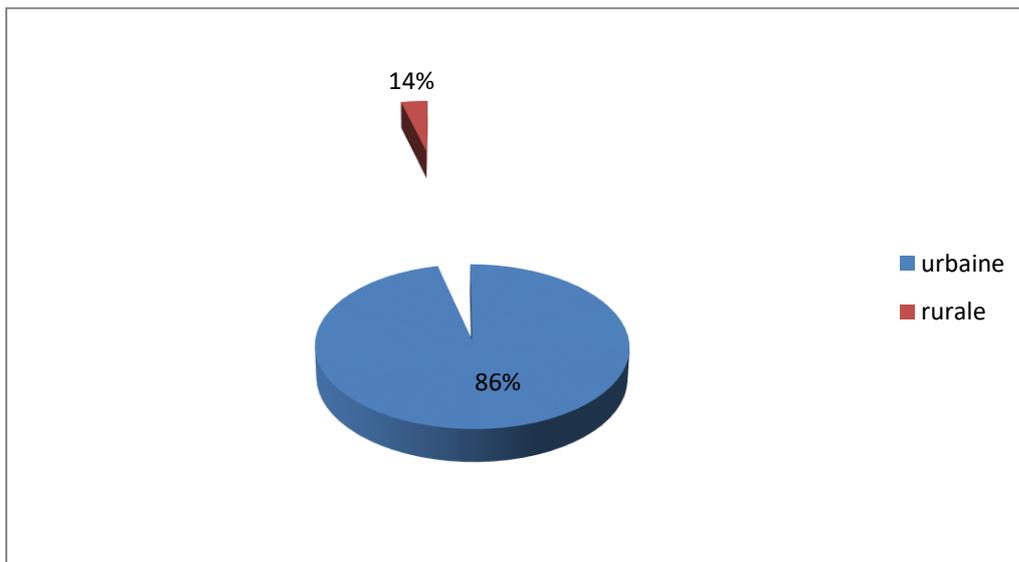


Graphique 1 : répartition selon le sexe.

### 3. L'origine

Une nette prédominance des patientes d'origine urbaine a été objectivée par rapport à l'origine rurale (figure 11).

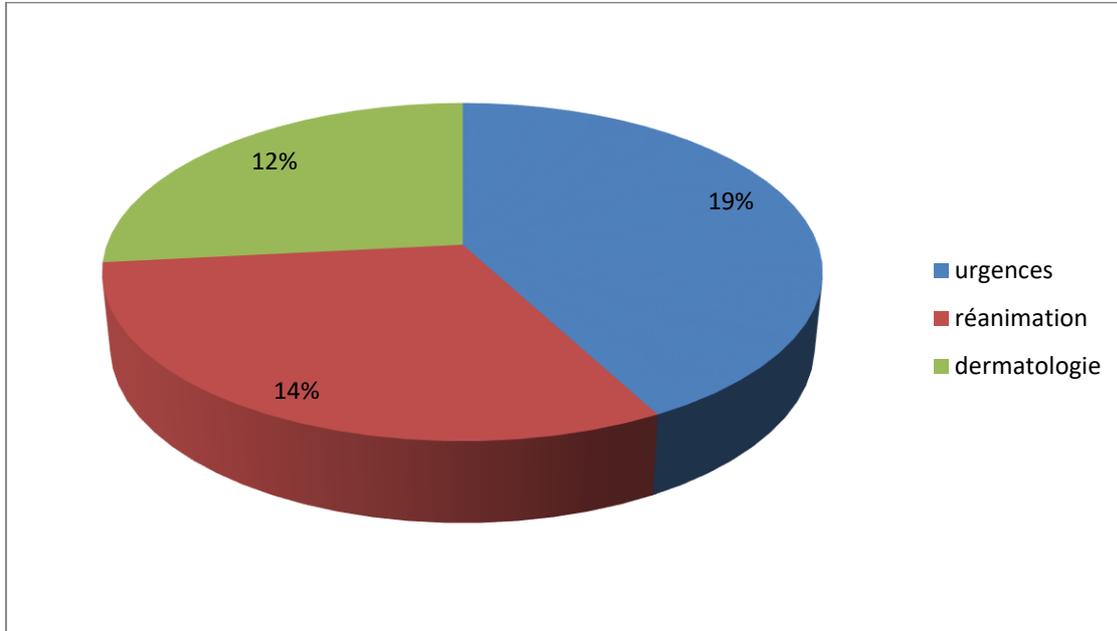
86 % des patientes de notre série étaient d'origine urbaine, opposées à 14 % d'origine rurale.



Graphique 2 : répartition selon l'origine.

#### 4. Service

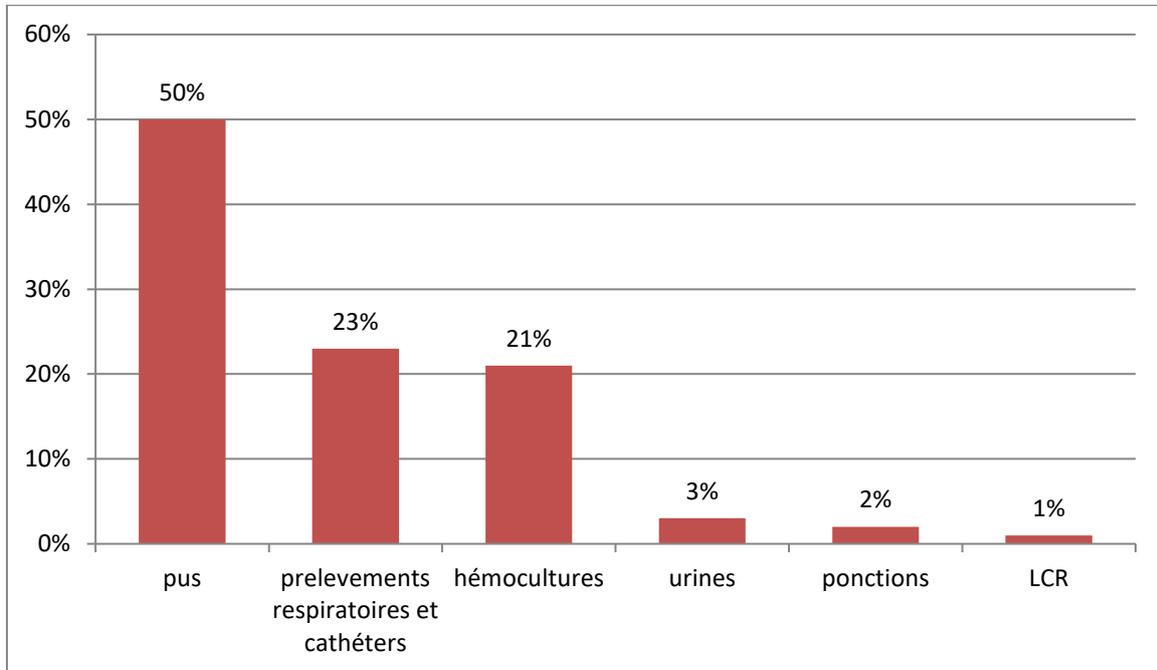
Les prélèvements provenaient essentiellement des urgences (19 %), suivie de la réanimation (14 %) et de la dermatologie (12%) (figure12).



Graphique 3 : répartition selon les services.

## 5. Nature du prélèvement

La répartition selon le site infectieux était comme suit: pus (50%), prélèvements respiratoire et cathéters (23%), hémocultures (21%), urines (3 %), ponctions (2%), LCR (1%) (figure13).



**Graphique 4 : répartition selon le site infectieux.**

## II. Clinique

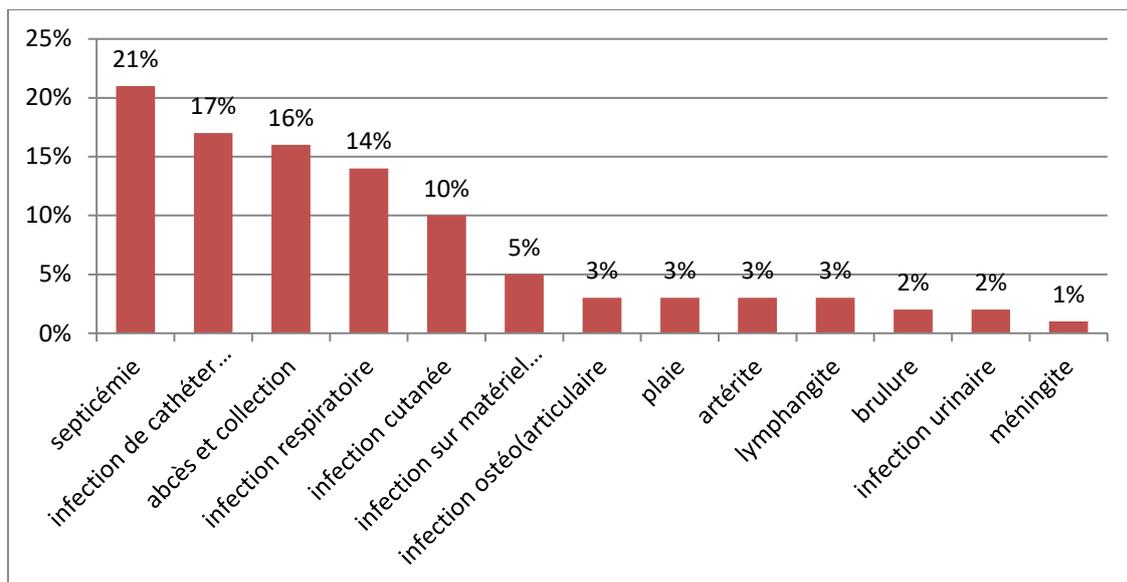
Les motifs de consultation (figure 14) étaient représentés essentiellement par :

Septicémie : 21%

Infection de cathéter d'hémodialyse : 17%

Abcès et collection : 16%

Infection respiratoire : 14%



Graphique 5 : répartition selon le motif de consultation/hospitalisation.

### III. Données biologiques

#### 1. Leucopénie

1. La numération formule sanguine était disponible dans 89% des cas, et elle a objectivée :
  - Une hyperleucocytose avec un taux de GB supérieurs à 12000/mm<sup>3</sup> est notée dans 41% cas (à prédominance PNN dans 93% des cas Vs 7% à prédominance lymphocytaire).
  - La lymphopénie était trouvée chez 14% des malades.

#### 2. La protéine C réactive

La CRP était disponible dans 82% des cas.

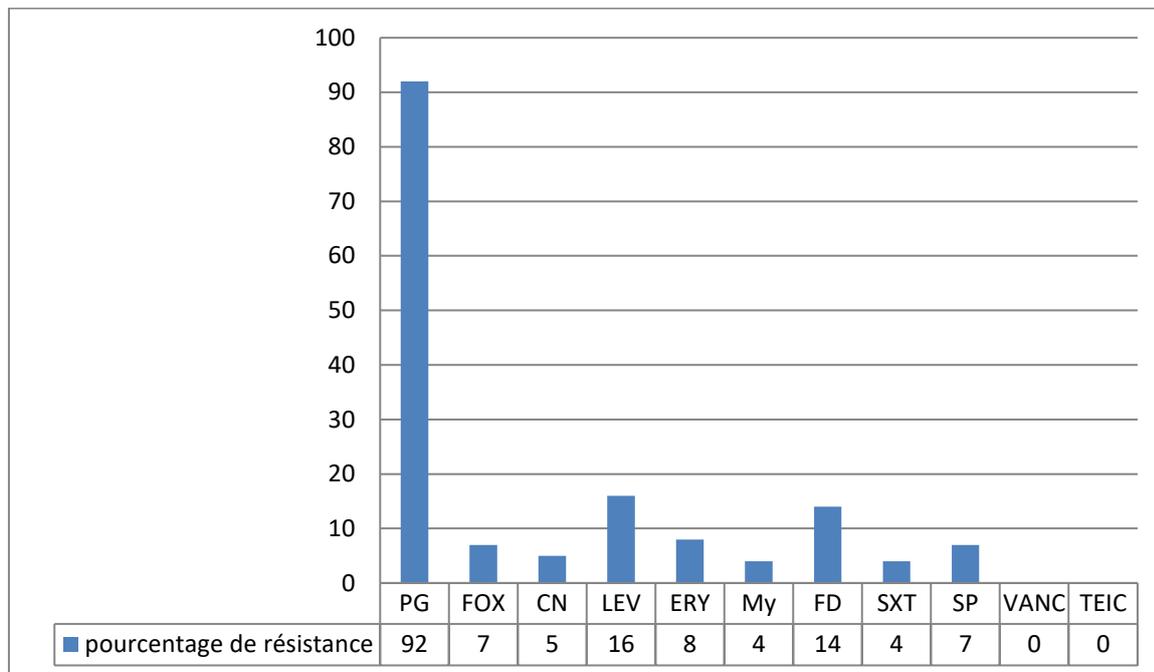
Elle était positive chez 47 cas, soit 83,92% des patients chez qui le bilan a été réalisé.

#### IV. Sensibilité aux antibiotiques

Parmi les souches de *S. aureus*, 7% sont des SARM, versus 93 % SASM.

Une pénicillinase a été retrouvée dans 92% des cas

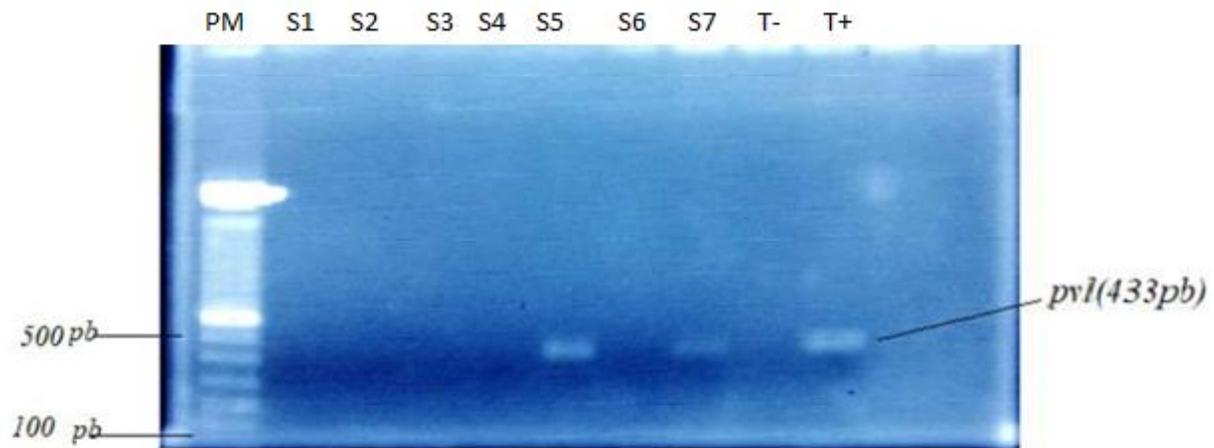
Nous n'avons pas noté de résistance aux glycopéptides.



Graphique 6 : profil de résistance aux antibiotiques des isolats de *S.aureus*.

## V. Recherche du gène codant la PVL

Deux isolats de *S. aureus* ont été porteurs du gène luk-PV, soit 2 % des isolats.



**Figure 10 :** Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du produit d'amplification  
PM : Marqueur de poids moléculaire, T+ : Témoin positif, T- : Témoin négatif, pvl :  
Gène codant pour la Leucidine de Panton Valentine, 1, 2, 3.....7 : Souches  
étudiées.

Le résultat obtenu (figure 16) montre l'apparition d'une bande de 433 pb pour les souches 5 et 7, cette bande étant identique à celle observée pour le Témoin positif. Ce qui montre que ces deux souches possèdent le gène pvl alors que les autres souches étudiées en sont dépourvus.

Nous avons recueilli les caractéristiques épidémiologiques et cliniques ainsi que le Traitement des patients. Ces données sont résumées dans le tableau 2.

**Tableau 2 : les caractéristiques épidémiologiques et cliniques des souches PVL+.**

Cas	Age	Sexe	Origine	Type d'infection	Traitement médicale	Traitement chirurgical	Evolution
N°1	38	féminin	Rurale	Sepsis sur matériel d'ostéosynthèse	quinolone	Drainage chirurgicale	bonne
N°2	12	masculin	Rurale	Arthrite de la hanche	Amoxicilline+ acide clavulanique	Drainage chirurgicale	bonne

La sensibilité aux antibiotiques des différents *S.aureus* PVL+ mise en évidence est résumée dans le tableau 3.

**Tableau 3 : La sensibilité aux antibiotiques des différents *S.aureus* PVL+.**

Cas	PG	FOX	CN	LEV	ERY	My	FD	SXT	Sp	Vanco	Teic
N°1	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
N°2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

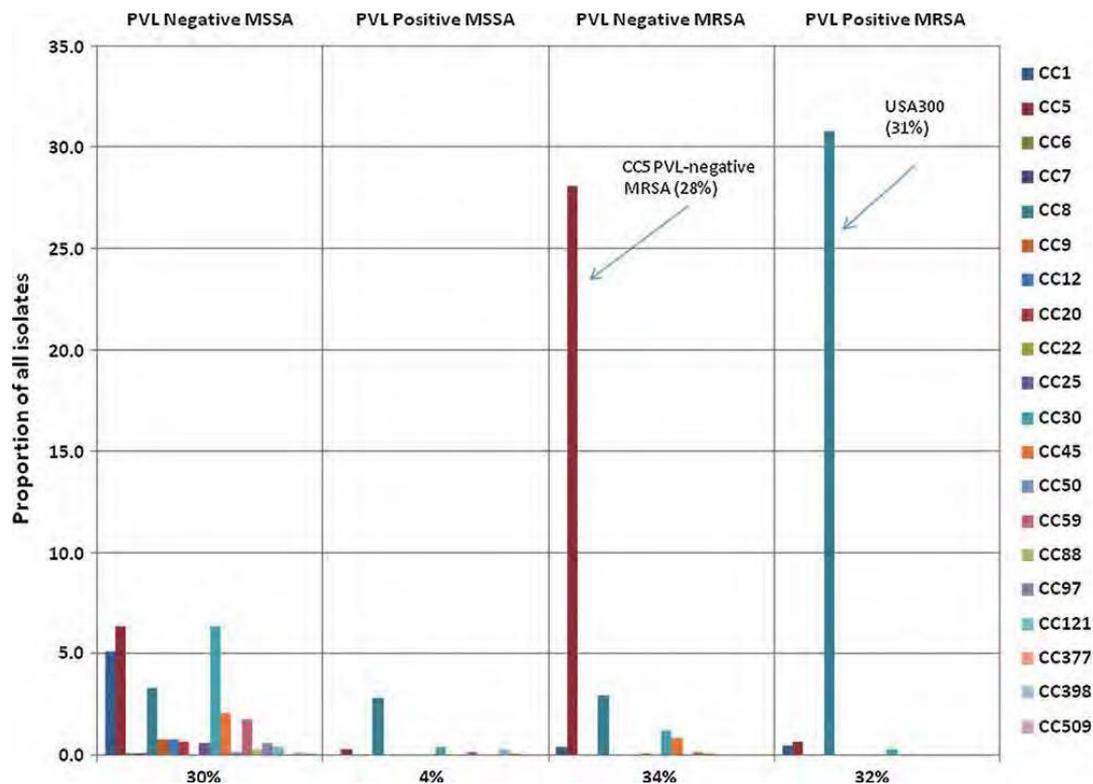
# DISCUSSION

## I. Epidémiologie des infections à *S. aureus* PVL+

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

### 1. Données épidémiologiques aux Etats–Unis

Dans la littérature, la leucocidine de Panton–Valentine est rarement recherchée en tant que facteur de virulence indépendant sur les souches américaines. Sa détection a été réalisée afin d'étudier le « background » génétique des isolats de *Staphylococcus aureus*. Les auteurs limitant souvent leur recherche aux seuls SARM d'origine communautaire ou hospitalière. F. Patrick O'Hara et son équipe sont à l'origine d'une étude rétrospective portant sur un échantillon statistiquement représentatif de 1066 souches isolées sur des patients de 2004 à 2008. Ces isolats proviennent de plus de 200 laboratoires différents répartis sur tout le territoire américain [41]( Graphique 7).



**Graphique 7 :** graphique montrant la répartition des différents complexes clonaux de *S. aureus* aux USA et la prévalence de la leucocidine de Panton–Valentine au sein de chacun de ces complexes (pourcentages calculés sur la période 2004 à 2008)

[41].

On constate dans le graphique ci-dessus que le pourcentage de souches PVL+ est très élevé (36%) et concerne surtout des SARM (89% des souches PVL+). Deux complexes clonaux semblent dominer le territoire américain d'un point de vue épidémiologique.

Le premier est généralement désigné par son profil en PFGE (Electrophorèse sur Gel en Champs Pulsés) baptisé USA300 ou par l'appartenance au complexe clonal 8 (ST8) déterminé par MLST (Multi Locus Sequence Typing). L'implication de ce clone dans les infections staphylococciques a considérablement augmenté au cours des années 2000 passant de 12% en 2004 à 38% en 2006.

Le deuxième appartient au complexe clonal 5, il correspond à un SARM PVL négatif nommé USA100 dont la prévalence est restée stable ces dernières années. Les SASM sont en minorité et présentent une grande diversité génétique [42].

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

## **2. Prévalence estimée de la PVL en France**

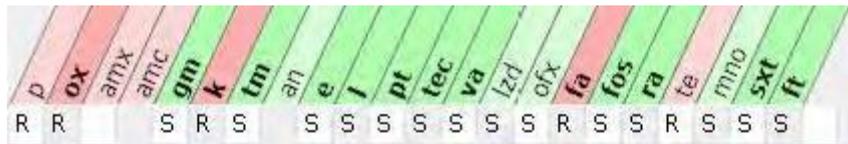
La leucocidine de Panton–Valentine n'est pas recherchée de manière systématique mais plusieurs études de caractérisation génotypique des staphylocoques dorés ont été menées en France. La recherche des gènes lukS–PV et lukF–PV est souvent réalisée à cette occasion et permet donc d'avoir une estimation de la prévalence de ces gènes sur les souches de *S. aureus* isolées au laboratoire. Les premiers chiffres français ont été apportés par l'étude menée par Gilles Prévost et son équipe en 1995. La phase préliminaire portait sur 309 souches de *S. aureus* isolées consécutivement au CHU de Strasbourg sans distinction sur l'origine de prélèvement. La PVL n'a été retrouvée que pour 5 de ces isolats soit 1,6% du total. La deuxième phase, prospective, a porté sur des souches isolées d'hémocultures, de prélèvement des fosses nasales et d'infections cutanées. Sur les 346 souches testées, 58 étaient positives dont 57 issues des prélèvements cutanés. Cette étude a montré que la toxine de Panton–Valentine était rare chez *S. aureus* et qu'elle se retrouvait surtout dans les infections cutanées. [4]

**Tableau 4 : résultats de l'étude de Gilles Prévost sur la prévalence des toxines synergohyménotropes au sein de l'espèce *Staphylococcus aureus*[4].**

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

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

De 2000 à 2008, des études de prévalence de SARM ayant un profil de résistance antibiotique particulier ont été réalisées en France par l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie et de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Un de leurs objectifs était de suivre l'évolution des caractères génétiques des souches de *S. aureus* en France notamment l'émergence de clones de SARM communautaires PVL+ pouvant infecter des sujets sains sans les facteurs de risque habituels. Trois grandes études ont été menées par cet observatoire, la première de 2000 à 2003 (rétrospective) [43], les deux autres en 2004 et en 2008 (prospectives). Ces études montrent qu'il est possible de repérer avec une bonne sensibilité les SARM correspondant au clone européen ST80 en se fiant au profil de résistance antibiotique. Ce profil, dénommé phénotype 1 dans les études, est caractérisé par une résistance à la kanamycine (gène *aph(3')-III*), à l'acide fucidique (gène *far1*) aux tétracyclines (gène *tetK*) et une sensibilité aux fluoroquinolones, à la tobramycine et à la gentamicine [38] ( Figure 11).



**Figure 11** : profil caractéristique de résistance du clone européen ST80. *Capture d'écran du SIL MOLIS au CHU de Toulouse*

L'étude de 2008, la plus vaste, a recueilli des informations de 104 laboratoires répartis sur tout le territoire français. Au total 34970 souches de patients infectés par *S. aureus* ont été incluses, 7253 étaient des SARM et 93 souches correspondaient au profil phénotype 1. Au sein de ce groupe, 90 isolats étaient porteurs des gènes *lukS*-PV et *lukF*-PV (97% du groupe). On considérait le clone ST80 comme l'équivalent européen de l'USA300 qui se propage depuis le début des années 2000 selon un mode épidémique sur l'ensemble du territoire américain. Cette étude montre que la situation en France est très différente, le clone ST80 ne connaît pas le même succès épidémiologique. Ces différences sont d'autant plus inattendues que dans d'autres pays européens et du Maghreb (Grèce, Algérie et Tunisie) le clone ST80 PVL+ représenterait plus de 50% du total des infections staphylococciques [42].

### **3. Facteurs de risque associés**

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

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

Aux Etats–Unis, plusieurs groupes de populations à risque ont été mis en évidence notamment : les équipes sportives, les prisonniers, les agriculteurs et les militaires. Les enfants constituent un groupe à risque, les souches de *S. aureus* communautaires PVL+ pouvant se propager au sein du milieu familial ou scolaire [45].

Les pneumopathies nécrosantes sont rencontrées chez des sujets jeunes et immunocompétents [44].

Elles sont précédées d'un syndrome grippal suggérant une association physiopathologique avec les influenza virus [46]. Les infections ostéo–articulaires à SA PVL+ surviennent après diffusion hématogène et ne semblent pas associées à des facteurs de risque particuliers.

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

Dans une méta-analyse qui combine les résultats des différentes études portant sur les infections à *S. aureus* PVL+, Laura Shallcross et son équipe ont constaté que ces souches étaient le plus souvent retrouvées dans des infections cutanées et plus rarement dans des infections invasives [47]. D'après cette étude, la majorité des infections à *Staphylococcus aureus* PVL+ se résoudrait en ambulatoire ou par automédication sans qu'il soit nécessaire d'hospitaliser le malade (Figure 12).

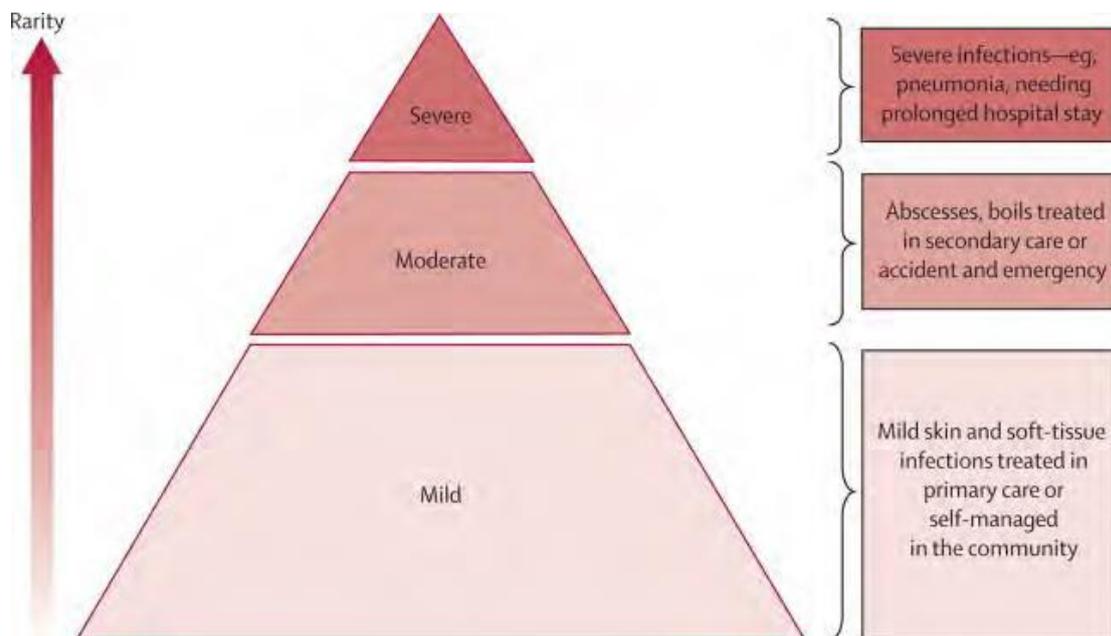


Figure 12 : pyramide clinique des infections associées à la toxine de Panton–Valentine [46].

L'association épidémiologique entre la présence des gènes codant la toxine de Panton–Valentine et les infections de la peau et des tissus mous (SSTIs) est forte, de nombreuses études viennent appuyer cette constatation. Un modèle physiopathologique de l'action de la PVL dans les SSTIs a récemment été proposé pour étayer ces résultats [31].

## 1. Infections cutanées

Au sein du groupe des SSTIs, la PVL est plus fréquemment retrouvées dans les abcès et les furonculoses à fort risque de récurrence[28]. Cette observation se retrouve dans l'étude de Prevost G. citée précédemment. L'étude la plus contributive sur les infections cutanées à *S. aureus* producteur de PVL a été menée par Pascal Del Giudice et son équipe. L'étude s'est déroulée du 1er juillet 2003 au 30 juin 2010 au CH de Fréjus–Saint–Raphaël, 229 patients porteurs d'une infection cutanée à *S. aureus* ont été inclus sur cette période indépendamment de la présence ou non des gènes encodant la PVL.

**Tableau 5 : résultats de l'étude de Pascal Del Giudice et son équipe sur des patients porteurs d'infections cutanées à *S. aureus*[47].**

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

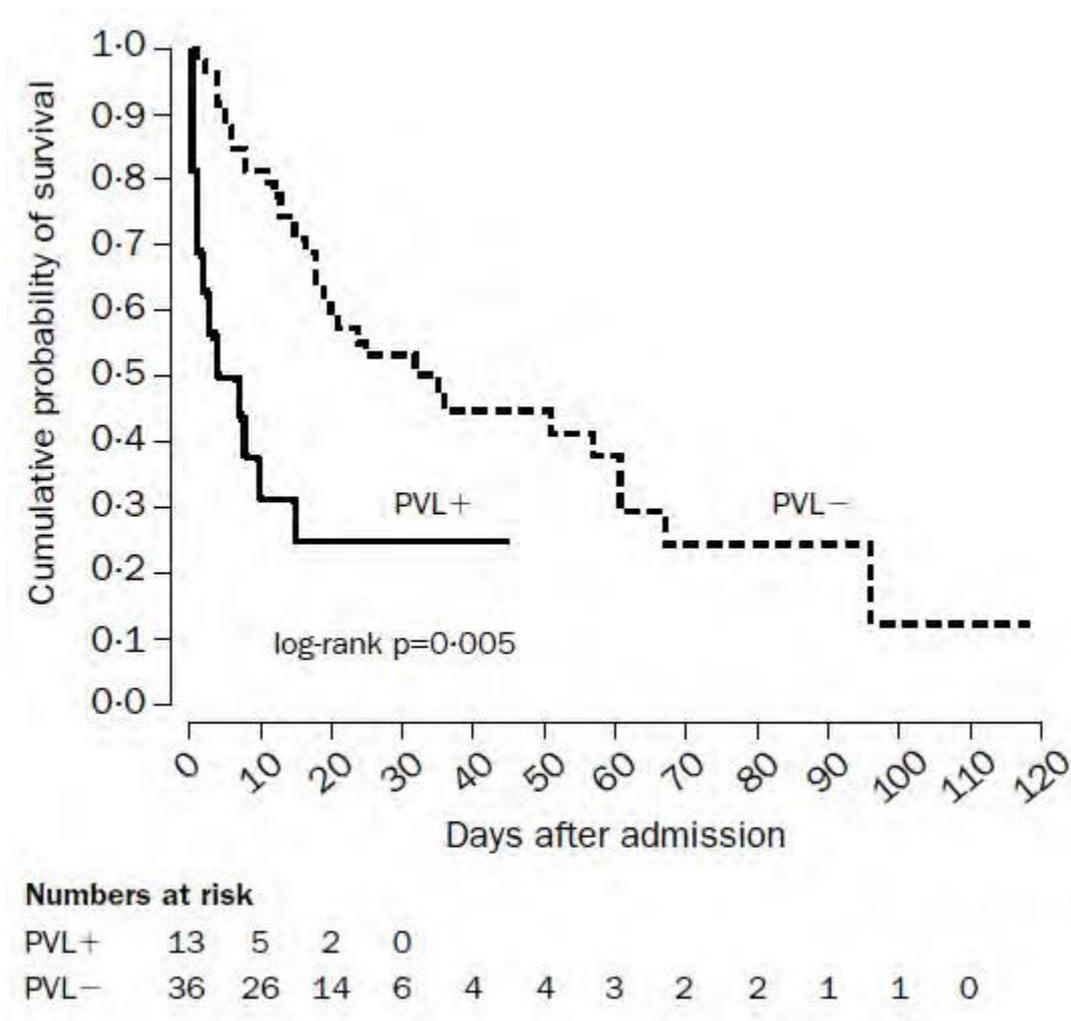
Source : Pascal Del Giudice et Al. Dermatology 2011;222:167–170

On retrouve les mêmes résultats observés lors des études précédentes à savoir une prédominance des infections folliculaires et abcès parmi les sites cutanés. En conclusion, les auteurs font l'hypothèse que ces staphylocoques pénétreraient d'abord la peau au niveau des follicules causant une folliculite puis l'infection évoluerait vers le furoncle. La formation d'un abcès serait l'évolution finale de la nécrose tissulaire autour du follicule [48]. Les pourcentages de *S. aureus* producteur de PVL dans ces localisations sont très élevés ce qui est à mettre en rapport avec la prévalence globale très faible de la PVL au sein de l'espèce *aureus*. Ces résultats vont dans le sens d'une physiopathologie particulière associée à la présence de la toxine. Une équipe japonaise a mené en 2004 une étude similaire en s'intéressant à l'aspect clinique des lésions. Il n'y avait pas de différence au niveau de la douleur et de l'œdème pour les souches PVL+ et PVL-, par contre la présence de la toxine était associée à un érythème plus important [49]. Enfin les infections avec les *S. aureus* d'origine communautaire sont plus sévères et nécessitent plus fréquemment le recours à un drainage chirurgical [50].

## **2. Pneumopathie nécrosante**

*S. aureus* est responsable d'environ 2% des pneumopathies d'origine communautaire [51]. Le rôle de la leucocidine de Panton–Valentine dans ce type d'infection a été mis formellement en évidence en 2002 par l'équipe d'Yves Gillet au CNR de Lyon. Leur étude comptait 16 cas de pneumopathie à *S. aureus* PVL+ (8 prospectifs, 8 rétrospectifs) et 36 à PVL-. Cette étude a montré que les souches de *S. aureus* productrices de PVL seraient responsables de pneumopathies chez les enfants et adultes jeunes sans comorbidités par ailleurs. Ces infections diffèreraient des pneumopathies à *S. aureus* PVL- par un pronostic moins bon, une hémoptysie fréquente, une leucopénie à l'admission et seraient précédées par une infection à

Influenza virus[24].



**Graphique 8** : courbes de survie des patients en fonction du génotype des souches isolées du tractus respiratoire[24].

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

l'implication de la leucocidine de Panton–Valentine dans la pneumopathie nécrosante[52].

Il y a peu de données sur la prévalence de cette entité clinique en France, elle semble cependant très rare.

### **3. Infections ostéo–articulaires**

L'accès au tissu osseux par *S. aureus* se fait généralement suite à une diffusion hématogène ou après un geste chirurgical invasif. Les études portant sur l'implication de la PVL dans cette localisation sont rares. En France, une seule a été construite dans ce but. Cette étude rétrospective a été menée de 2001 à 2005 sur une collection de souches du CNR de Lyon provenant de différents services de pédiatrie. Au final 14 souches PVL+ ont été incluses, 17 PVL– ont servi à former un groupe de contrôle. Cette étude a montré que les infections ostéo–articulaires à *S. aureus* PVL+ sont sévères avec une persistance de l'inflammation (CRP et VS) et des complications plus fréquentes. Le recours à la chirurgie était aussi plus fréquent[53]. Une méta-analyse de 2012 des différentes études effectuées dans le monde aboutit à des conclusions similaires ajoutant le fait que les SARM communautaires sont de plus en plus souvent isolés dans ces localisations[54].

### III. Stratégies thérapeutiques des infections à *S. aureus* PVL+

#### 1. Infections cutanées

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

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

L'antibiothérapie initiale est probabiliste, le choix des molécules est guidé par les données épidémiologiques françaises sur les infections de la peau et des tissus mous.

Les molécules choisies doivent être efficaces sur *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogènes* qui sont les germes les plus fréquemment rencontrés. Les SARM communautaires étant rares en France, il n'y a pas lieu de traiter initialement les infections staphylococciques avec des antibiotiques actifs sur les SARM.

Les molécules choisies initialement sont actives sur les staphylocoques et streptocoques. Classiquement ce sont des bêta–lactamines associées ou non à un inhibiteur de bêta–lactamase pendant 5 à 10 jours. En cas de résistance à la méticilline plusieurs molécules sont recommandées, aucune n’ayant prouvé sa supériorité sur les autres : pristinamycine, clindamycine, triméthoprime–sulfaméthoxazole ou doxycycline.

Les fluoroquinolones ne sont pas recommandées en raison de l’émergence rapide de résistance à ces antibiotiques chez *S. aureus*[55]. Sur les infections documentées à *S. aureus* PVL+ on peut ajouter en association un antibiotique à visée anti–toxinique. L’effet inhibiteur sur la production de la toxine a été démontré In Vitro avec la clindamycine, la rifampicine et le linézolide[56].

La décontamination des sites de portage est indiquée pour les patients infectés par des SARM d’origine communautaire ayant eu un premier échec de la chirurgie et/ou antibiothérapie, en cas de rechute ou de récurrence. Elle concerne le patient mais aussi son entourage. Pour les cas dans les collectivités il faut décontaminer l’ensemble des sujets contacts. Le dépistage des épidémies de ces SARM passe par la déclaration des cas groupés qui se définissent comme la survenue d’au moins 3 cas en 1 mois d’infection suppurative au sein d’une collectivité [55].

Extrait des recommandations HCSP :

*Le protocole de décontamination comprendra en première intention une association :*

- *Application nasale de pommade à la mupirocine (Bactroban®) 2 fois par jour pendant 5 à 7 jours,*
- *Utilisation, 1 fois par jour pendant 5 à 7 jours, d’une solution moussante de chlorhexidine comme savon et comme shampoing,*

- *Bains de bouche biquotidiens avec une solution de chlorhexidine (sauf chez l'enfant de moins de 6 ans)*

Aux Etats Unis nous avons vu que l'épidémiologie des infections cutanées et des tissus mous était différente et que plus de 50% de ces infections étaient dues à SAMR Co, il est donc recommandé en première intention, lors de la suspicion d'une infection à *S. aureus* d'utiliser un antibiotique actif sur les souches de SAMR Co (pristinamycine, clindamycine, trimetoprimé–sulfaméthoxazole, doxycycline, minocycline, linezolid). La clindamycine peut être utilisée en raison de ses propriétés anti toxiques notamment contre la PVL. Il est ensuite nécessaire de débiter une antibiothérapie adaptée à l'antibiogramme de la bactérie en cause.

## 2. Infections pulmonaires

L'AFSSAPS (aujourd'hui ANSM) a publié en juillet 2010 un rapport sur la prise en charge des infections respiratoires basses en concertation avec la SPLF (Société de Pneumologie de Langue Française). L'éventualité d'une pneumopathie nécrosante est documentée et une antibiothérapie probabiliste a été formulée dans ce contexte particulier.

**Tableau 6 : recommandations ANSM juillet 2010 [57].**

	<u>Premier choix</u>	<u>Second choix</u>
<b>Cas général</b>	C3G* (céfotaxime) ± macrolide IV ou FQAP (lévofloxacine) <sup>1</sup>	
<b>Pneumonie gravissime Pneumonie nécrosante, Forte présomption de SARM PVL+</b>	C3G* (céfotaxime) + glycopeptide et clindamycine ou rifampicine <u>ou</u> C3G* (céfotaxime) + linézolide	Désescalade selon documentation, lorsque disponible (cf Tableau 7b)
<small>C3G (céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération) : la ceftriaxone n'est pas recommandée en raison d'une activité intrinsèque insuffisante sur <i>Staphylococcus</i>                      SARM PVL+ : <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline sécrèteur de la toxine de Panton Valentine</small>		

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

# CONCLUSION

*Staphylococcus aureus* est une bactérie ubiquitaire responsable de nombreux types d'infections chez l'Homme, et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections hospitalières et communautaires. Son équipement biochimique complexe lui permet d'exercer ses effets pathogéniques et d'exprimer sa virulence, à travers de multiples localisations cutanées, osseuses, méningées et endocardiques.

La plasticité de son génome à s'adapter à différentes conditions environnementales lui permet d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques. Les infections staphylococciques relèvent d'un véritable problème de santé publique tant par la virulence de la bactérie que par l'émergence des souches multi résistantes aux antibiotiques.

La surveillance des infections à *Staphylococcus aureus* producteurs de la PVL devient une nécessité et ne devrait pas concerner uniquement les souches résistantes à la méticilline. Ces staphylocoques sont responsables d'infections cutanées caractérisées par leur caractère extensif et volontiers récidivant, mais aussi d'infections graves pouvant mettre en jeu le pronostic vital, comme les pneumopathies nécrosantes ou le pronostic fonctionnel comme les ostéomyélites. Ils peuvent être en outre responsables d'épidémies intra-familiales ou au sein de collectivités fermées.

Notre étude a été menée sur 100 souches de *S. aureus*, pour lesquelles nous avons réalisé la recherche du gène codant pour la PVL.

Les résultats obtenus montrent que la prévalence du gène PVL chez les souches étudiées est de 2%. Néanmoins, notre étude est soumise à certains biais de représentativité qui pourraient être liés au :

- ✓ Mode d'échantillonnage qui n'a pas inclus tous les *S. aureus* reçu au laboratoire,

- ✓ la demande de l'examen bactériologique n'est pas systématique,
- ✓ Le manque de diversité clinique des souches collectées.

La recherche de la PVL peut probablement devenir une activité de routine au laboratoire, et cette recherche peut être orientée par le caractère particulièrement aigu de l'infection, par l'existence d'une leucopénie associée à une valeur élevée de la CRP et éventuellement par le profil de résistance particulier des SARM.

Les conséquences des infections à *S. aureus* sont lourdes en termes de morbidité, de coûts et de récives. Du coup, la prévention reste le seul moyen pour limiter le risque de survenu de ce type d'infection et leur propagation en reposant sur :

- ✓ la sensibilisation des prestataires publics et privés sur le caractère clinique et épidémiologique de ces infections.
- ✓ La mise en œuvre d'un système de surveillance épidémiologique.
- ✓ L'établissement de recommandations écrites précisant les règles d'hygiène et d'asepsie.
- ✓ La formation du personnel médical et paramédical et sa motivation qui passe essentiellement par son implication dans les différentes mesures à prendre.
- ✓ La définition de bonnes règles de pratique clinique afin de rationaliser l'usage d'antibiotique.

# RESUME

### Introduction :

*Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. On le retrouve aussi bien dans les milieux communautaires qu'hospitaliers, Il intéresse un très grand nombre de sites infectieux et peut être isolé au laboratoire dans tous les types de prélèvements. Il peut être responsable d'infections suppuratives, mais aussi de syndromes cliniques dus à la sécrétion de plusieurs facteurs de virulence (antigènes, enzymes, toxines).

Récemment, de nouvelles pathologies ont été individualisées, telles que les infections cutanées primitives à caractère récidivant, la pneumonie nécrosante et l'infection ostéo–articulaire sévère de l'enfant. Elles sont associées à la sécrétion d'une toxine : la leucocidine de Panton–Valentine (PVL). Le gène codant pour cette toxine peut se retrouver chez les souches méthicilline–sensible *Staphylococcus aureus* (MSSA), mais principalement chez celles communautaires méthicilline–résistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

En dépit de l'importance de la PVL en tant que facteur de virulence, peu de données sont disponibles sur la prévalence de cette toxine au Maroc. Ce manque de données nous a amenés à enquêter sur la fréquence du *S. aureus* producteur de la PVL au centre hospitalier Hassan II de Fès..

### Matériel et méthodes :

Il s'agit d'une étude prospective sur une période de deux ans allant du janvier 2017 jusqu'au décembre 2018. Notre étude a été menée sur 100 souches de *S. aureus*, pour lesquelles nous avons réalisé une recherche moléculaire par PCR concernant le gène PVL.

**Résultats :**

Les résultats obtenus montrent que la prévalence du gène *pv* est de 2%.

Sur les 100 souches étudiées, la prévalence de SARM est de 7%.

**Conclusion :**

Le manque de données locales impose une surveillance du profil épidémiologique des infections à *S. aureus* producteur de PVL et leur sensibilité. Ce travail a rapporté la fréquence de ces infections.

Cette actualisation va permettre d'adapter l'antibiothérapie probabiliste et de déterminer une stratégie de contrôle du développement des BMR avec l'application rigoureuse des mesures d'hygiène.

# REFERENCES

- [1]. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5(12):751–62.
- [2]. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998; 339(8):520–32.
- [3]. Lina G, Piemont Y, Godail–Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999; 29(5):1128–32.
- [4]. Prevost G, Couppie P, Prevost P, et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 1995; 42: 237–45.
- [5]. P. N. Panton, M. B. Came, F. C. O. Valentine et M. R. C. P. Lond, « *Staphylococcal Toxin* », *The Lancet*, vol. 1, p. 506–, 1933–1932 ) 508 lire en ligne [archive] [PDF])
- [6]. S. Boyle–Vavra et R. S. Daum, « Community–acquired methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton–Valentine leukocidin », *Laboratory Investigation*, vol. 87, no 1, p. 3–, 2007 ) 9PMID 17146447, DOI 10.1038/labinvest.3700501
- [7]. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 1996; 272: 1910–4.
- [8]. Van der Vijver JCM, van Es–Boon M, Michel MF. Lysogenic Conversion in *Staphylococcus aureus* to Leucocidin Production. *J Virol* 1972; 10: 318–9.
- [9]. Ma XX, Ito T, Kondo Y, et al. Two different Panton–Valentine leukocidin phage lineages predominate in Japan. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3246–58.

- [10]. E. Boakes, A. M. Kearns, M. Ganner, C. Perry, R. L. Hill and M. J. Ellington. *Journal Of Clinical Microbiology*, Feb. 2011, p. 684–692
- [11]. XiaoXue Ma et al. *Journal Of Clinical Microbiology*, Oct. 2008, p. 3246–3258
- [12]. Dublanche A. Des virus pour combattre les infections la phagothérapie :renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Lausanne: Favre, 2009.
- [13]. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, et al. The staphylococcal toxin Panton–Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 584–94.
- [14]. M. Javad A. et al *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* Volume 28, Issue Number 1, 2010
- [15]. Miles G, Movileanu L, Bayley H. Subunit composition of a bicomponent toxin: Staphylococcal leukocidin forms an octamerictransmembrane pore. *Protein SciPubl Protein Soc* 2002; 11: 894–902.
- [16]. Jayasinghe L, Bayley H. The leukocidin pore: Evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis. *ProteinSciPublProtein Soc* 2005; 14: 2550–61.
- [17]. Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA. Flow cytometric determination of Panton–Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* 2001; 69: 2390–5.
- [18]. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 12.

- [19]. Genestier A–L, Michallet M–C, Prevost G, et al. *Staphylococcus aureus* Panton–Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax–independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 2005; 115: 3117–27.
- [20]. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton–Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2384–90.
- [21]. Shallcross LJ, Williams K, Hopkins S, Aldridge RW, Johnson AM, Hayward AC. Panton–Valentine leukocidin associated staphylococcal disease: a cross–sectional study at a London hospital, England. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 16: 1644–8.
- [22]. Mesrati I, Saïdani M, Ennigrou S, Zouari B, Ben Redjeb S. Clinical isolates of Pantone–Valentine leukocidin– and gamma–haemolysin–producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. *J Hosp Infect* 2010; 75: 265–8.
- [23]. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community–associated methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 227–39.
- [24]. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton–Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002; 359: 753–9.

- [25]. Tong A, Tong SYC, Zhang Y, et al. Panton–Valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome for *Staphylococcus aureus* skin infections: evaluation from the CANVAS studies. *PloS One* 2012; 7: e37212.
- [26]. Waldenburger S, Vogel U, Goebeler M, Kolb–Mäurer A. Community–acquired skin infections caused by *Staphylococcus aureus*: What is the role of the Panton–Valentine leukocidin toxin? *J DtschDermatolGes J Ger Soc Dermatol JDDG* 2014; 12: 59–66.
- [27]. Bae I–G, Tonthat GT, Stryjewski ME, et al. Presence of genes encoding the panton–valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3952–7.
- [28]. Couppie P, Cribier B, Prévost G, Grosshans E, Piémont Y. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: An epidemiologic study. *ArchDermatol* 1994; 130: 1208–9.
- [29]. Cribier B, Prévost G, Couppie P, Finck–Barbançon V, Grosshans E, Piémont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatol Basel Switz* 1992; 185: 175–80.
- [30]. Yu F, Liu Y, Xu Y, et al. Expression of Panton–Valentine Leukocidin mRNA among *Staphylococcus aureus* Isolates Associates with Specific Clinical Presentations. *PloS One* 2013; 8: e83368.
- [31]. Chi C–Y, Lin C–C, Liao I–C, et al. Panton–Valentine Leukocidin Facilitates the Escape of *Staphylococcus aureus* From Human Keratinocyte Endosomes and Induces Apoptosis. *J Infect Dis* 2013; 209: 224–35.

- [32]. Chia–Yu Chi et al Journal of Infectious Diseases. 15 jan 2014
- [33]. Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, et al. Panton–Valentine Leukocidin Does Play a Role in the Early Stage of *Staphylococcus aureus* Skin Infections: A Rabbit Model. PLoS ONE 2011; 6. DOI:10.1371/journal.pone.0022864.
- [34]. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. J Infect Dis 2011; 204: 937–41.
- [35]. König B, Prévost G, Piémont Y, König W. Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. J Infect Dis 1995; 171: 607–13.
- [36]. Diep BA, Chan L, Tattevin P, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton–Valentine leukocidin–induced lung inflammation and injury. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 5587–92.
- [37]. Binh An Diep et al. March 23, 2010 | vol. 107 | no. 12 | 5591
- [38]. Badiou C, Dumitrescu O, George N, et al. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Panton–Valentine Leukocidin in Clinical Specimens by Enzyme–Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Tests. J Clin Microbiol 2010; 48: 1384–90.
- [39]. Vandenesch F, Frédéric L, Anne T. Rapport d'activité du CNR des staphylocoques 2011. <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=2122196>

- [40]. Terry Alli OA, Ogbolu DO, Mustapha JO, Akinbami R, Ajayi AO (2012). The non–association of Panton– Valentine leukocidin and *mecA* genes in the genome of *Staphylococcus aureus* from hospitals in South Western Nigeria. *Indian J Med Microbiol*, 30(2):159–64.
- [41]. O’Hara FP, Amrine–Madsen H, Mera RM, et al. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* in the United States 2004–2008 Reveals the Rapid Expansion of USA300 Among Inpatients and Outpatients. *Microb Drug Resist* 2012; 18: 555–61.
- [42]. Robert J, Etienne J, Bertrand X, ONERBA (Observatoire National de l’Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton–Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000–2003. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 585–7.
- [43]. Robert J, Tristan A, Cavalié L, et al. Panton–Valentine Leukocidin–Positive and ToxicShock Syndrome Toxin 1–Positive Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus*: a French Multicenter Prospective Study in 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1734–9.
- [44]. Carré N. Épidémie d’infections cutanées à *Staphylococcus aureus* porteur des gènes codant la leucocidine de Panton–Valentine en milieu scolaire et familial, Val–d’Oise, 2006–2008. InVS, 2010.
- [45]. Julianelle LA. Studies of hemolytic staphylococci Hemolytic activity—biochemical reactions—serologic reactions. *J Infect Dis* 1922; 31: 256–84.

- [46]. Carré N. Épidémie d'infections cutanées à *Staphylococcus aureus* porteur des gènes codant la leucocidine de Panton–Valentine en milieu scolaire et familial, Val–d'Oise, 2006–2008. *InVS*, 2010.
- [47]. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton–Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta–analysis. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 43–54.
- [48]. Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, et al. Panton–Valentine Leukocidin–Positive *Staphylococcus aureus* Strains Are Associated with Follicular Skin Infections. *Dermatology* 2011; 222: 167–70.
- [49]. Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, et al. The Association between *Staphylococcus aureus* Strains Carrying Panton–Valentine Leukocidin Genes and the Development of Deep–Seated Follicular Infection. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 381–5.
- [50]. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical–surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2000; 21: 510–5.
- [51]. Labandeira–Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton–Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science* 2007; 315: 1130–3.
- [52]. Dohin B, Gillet Y, Kohler R, et al. Pediatric Bone and Joint Infections Caused by Panton–Valentine Leukocidin–Positive *Staphylococcus aureus*. *J Novemb* 2007 2007; 26: 1042–8.

- [53]. Martínez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, Hammerman W, Mason EO Jr, Kaplan SL. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 701-6.
- [54]. Groupe de travail HCSP. Recommandations sur la prise en charge et la prévention des infections cutanées liées aux souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline communautaires (SARM co). HCSP, 2009.
- [55]. Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, et al. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 14: 384-8.
- [56]. recommandations ANSM juillet 2010. Source : ANSM. <http://ansm.sante.fr>