

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année : 2020

N° 2020-08

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES D'ANESTHESIE-REANIMATION

par

Damien MULLER

né le 12/11/1988 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 7 février 2020

Impact de l'hétérogénéité des souches de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline sur le devenir des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique.

Président du jury : Monsieur le Professeur Karim ASEHNOUNE

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Antoine ROQUILLY

A Monsieur le Professeur Karim Asehnoune, merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Merci pour votre encadrement et votre enseignement tout au long de mon internat.

A Monsieur le Professeur Antoine Roquilly, merci à toi de m'avoir fait confiance pour ce travail. Merci de m'avoir ouvert l'esprit sur un horizon plus vaste que celui de la seule pratique clinique et de m'y avoir donné gout. Si on m'avait dit que je travaillerai sur un tel sujet il y a cinq j'aurais souris ! Merci encore pour ta disponibilité et ta capacité à m'avoir fait progresser en m'accompagnant tout au long de ce travail.

A Madame le Maître de conférence Jocelyne Caillon, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir participé activement à ce projet. Je crois savoir que c'est l'un des derniers travaux que vous jugerez avant votre retraite et j'en suis honoré.

A Monsieur le Professeur David Boutoille, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'apporter votre expertise à ce sujet multidisciplinaire.

A Madame le Professeur Nathalie Caroff, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci également pour l'année de recherche passée l'année dernière sous ta direction dont je garde un excellent souvenir et un goût pour la recherche, qui m'a poussé à réaliser ce travail.

A Virginie, merci pour l'ensemble du travail que tu as fourni et qui m'a permis d'effectuer cette thèse sur ce sujet. Je n'oublierais pas les blagues et les chansons pendant les longues séances d'extraction ! Merci pour la confiance que tu m'as accordée. Merci également à toute l'équipe du laboratoire IRS2 pour votre accueil et vos conseils.

A tous les anesthésistes réanimateurs côtoyés au cours de ces cinq années d'internat, aux côtés desquels j'ai tant appris.

A tous mes co-internes au premier rang desquels Paul, Manon, Côme, Pierre-Antoine, Xavier et tous les autres... partenaires de joie et parfois de galère, la solidarité qui nous unit (souvent autour d'un verre...) m'est très chère.

A ma mère, Renée, merci d'avoir été toujours présente pour moi et m'avoir inculqué les valeurs qui m'ont permis d'arriver là où je souhaitais, merci d'avoir tenu bon pendant ces années, maintenant lointaines, ou le malheur nous a frappé.

A ma famille, Joël et Pascale et aux visites chez vous à Nice qui sont toujours un immense plaisir. A ma sœur et mon beau-frère Claire et Vikas pour votre soutien au cours de ces années. A mes cousin(e)s Margot et Benjamin et mes neveux Maïna et Yann, tous adultes maintenant (c'est passé si vite !!). Aux Bento (Sonia, Sandy, Julia, Rui) pour votre présence depuis mon plus jeune âge (on ne ressort pas les photos svp).

Aux parisiens, le cercle restreint des amis les plus chers : Camcam, Pierre, Vinz, Julia, Fabian, Yoyo, Vissac, Yvain et Jessica ! J'ai beaucoup de chance de vous avoir avec moi, j'espère que l'avenir nous réserve autant de merveilleux moments que ceux déjà passés.

Au nantais qui sont devenus comme des frères pour moi : Fouzia coach de vie / conseillère d'orientation et modèle de motivation à toute épreuve, Hakim le pêcheur, Christophe.

A mes actuels et futurs collègues : Karim, Marion, Vincent, Laurent, Pierre, Xavier et tous les autres anesthésistes réanimateurs de l'hôpital Nord, je suis très heureux d'arriver dans votre équipe.

A Axelle, si peu de temps que l'on se connaît mais déjà beaucoup d'excellents moments partagés avec toi. J'espère que notre histoire a encore de beaux jours devant elle.

A mon père Patrice, parti beaucoup trop tôt en cette année 2008. Pas un jour ne passe sans que ton souvenir m'accompagne. Ce travail t'est dédié.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	3
I) PNEUMONIE ACQUISE A L'HOPITAL ET SOUS VENTILATION MECANIQUE.....	3
II) <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	7
III) REGULATION DE <i>S. AUREUS</i> : LE SYSTEME <i>AGR</i> (<i>ACCESSORY GENE REGULATOR</i>).....	8
A) Organisation générale et auto-induction du système <i>agr</i>	8
B) La régulation génique ARN-III dépendante.....	11
C) La régulation génique ARN-III indépendante.....	11
D) L'impact du système <i>agr</i> sur l'infection aigüe et la toxicité.....	11
E) Principaux facteurs de virulence contrôlés par <i>agr</i> étudiés dans ce travail.....	12
IV) MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING ET COMPLEXES CLONAUX.....	14
V) HYPOTHESE DE TRAVAIL.....	15
VI) OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	15
MATERIEL ET METHODES	16
I) POPULATION ETUDIEE.....	16
II) DEFINITION DES ATTEINTES CLINIQUES.....	16
A) Pneumonie acquise sous ventilation mécanique.....	16
B) Syndrome de détresse respiratoire aigüe.....	16
C) Récidive de PAVM et échec du traitement.....	17
III) CARACTERISATION DES SOUCHES ETUDIEES.....	17
A) Vitesse de croissance.....	17
B) Définition du groupe <i>agr</i>	18
C) Typage MLST et complexes clonaux.....	18
D) Caractérisation de l'hémolyse α	19
IV) PROTOCOLE D'ETUDE DES ARN D'INTERET.....	20
A) Extraction et purification des ARN.....	20
B) Suppression de la contamination ADN.....	20
C) PCR en temps réel (qPCR).....	20
D) Analyse de l'expression des ARN.....	21
E) Concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques.....	23
V) DETECTION DE LA DELTA-TOXINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	23
VI) ANALYSE STATISTIQUE.....	23
RESULTATS	24
I) CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION DE PATIENTS.....	24
II) CARACTERISTIQUES DES SOUCHES DE <i>SASM</i> ISOLEES.....	26
A) Vitesse de croissance.....	26
B) Hémolyse alpha.....	26
C) Variants <i>agr</i> et complexes clonaux.....	27
IV) EXPRESSION DE FACTEURS DE VIRULENCE SELON LE TYPE <i>AGR</i> AU COURS DU TEMPS <i>IN VITRO</i>	29
A) Souches étudiées.....	29
B) ARN III.....	30
C) Hémolysine delta.....	30
D) PSM operon.....	30

F) Hémolysine α	31
III) PATHOGENICITE ET GROUPE <i>AGR</i>	33
A) Sévérité clinique	33
B) Atteinte respiratoire	34
V) DETECTION DE LA DELTA TOXINE PAR MALDI-TOF.....	38
A) Détection de l'hémolysine delta et expression d' <i>hld in vitro</i>	38
B) Détection de l'hémolysine delta comme outil pronostic de la PAVM à <i>S. aureus</i> sensible à la meticilline	40
VI) REGULATION DES ARN D'INTERET VIS-A-VIS DE CONCENTRATIONS SUB-INHIBITRICES D'ANTIBIOTIQUES POUR UNE SOUCHE D'INTERET	42
DISCUSSION.....	44
I) HETEROGENEITE DES SASM DANS NOTRE TRAVAIL.....	45
II) ASSOCIATION ENTRE GROUPE <i>AGR</i> ET DEVENIR CLINIQUE	46
III) ASSOCIATION ENTRE GROUPE <i>AGR</i> ET EXPRESSION <i>IN VITRO</i> DE LA VIRULENCE	47
IV) DETECTION DE LA PRODUCTION DE DELTA-TOXINE COMME OUTIL PRONOSTIC DES PNEUMONIES DE REANIMATION A <i>S. AUREUS</i>	49
V) EFFET HETEROGENE DES ANTIBIOTIQUES SUR LA VIRULENCE <i>IN VITRO</i>	50
VI) LIMITES.....	51
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	52
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	55
INDEX DES FIGURES	56
INDEX DES TABLEAUX	57
ANNEXE : SCORE SOFA.....	58
BIBLIOGRAPHIE	60

INTRODUCTION

I) Pneumonie acquise à l'hôpital et sous ventilation mécanique

La pneumonie acquise à l'hôpital (Hospital-Acquired Pneumonia ou HAP) est une infection du parenchyme pulmonaire causée par des pathogènes présents dans l'environnement hospitalier (1-3). Elle se caractérise par une pneumonie qui se développe chez des patients admis à l'hôpital depuis plus de 48 heures. Parmi les pneumonies acquises à l'hôpital, la pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) se développe dans les services de réanimation chez des patients qui ont été ventilés artificiellement pendant au moins 48 heures. La PAVM reste l'une des causes majeures de morbi-mortalité parmi les infections nosocomiales (1,4). Son incidence varie de 5% à 67% selon le type de patients étudiés et les critères de diagnostic utilisés (5). D'après les données du réseau REA-Raisin de surveillance des infections nosocomiales françaises, son taux d'incidence était de 15,46 pour 1000 jours d'intubation en 2017, à la première position des infections nosocomiales de réanimation. Elle est retrouvée le plus fréquemment chez les patients immunodéprimés, opérés d'une chirurgie majeure et chez les patients les plus âgés. Les PAVM représentent un problème clinique et économique majeur du fait de l'augmentation induite de la durée de ventilation mécanique, des durées de séjours en réanimation et à l'hôpital et de la mortalité qui leur est associée (6). Leur cout par épisode a été estimé pouvant aller jusqu'à 40.000 dollars aux USA (Warren et al., 2003). *S. aureus* est, avec *Pseudomonas aeruginosa*, un des germes les plus fréquemment en cause dans les PAVM. Il serait impliqué dans au moins 20% des PAVM (9).

Il n'y a pas à l'heure actuelle de méthode diagnostique à forte spécificité et sensibilité pour le diagnostic de PAVM. Le diagnostic est généralement établi par l'association de symptômes cliniques, examens biologiques et radiologiques, résumés dans le tableau I (1,3,4,10).

Signes cliniques	Biologie	Radiographie pulmonaire
Température < 36° ou > 38°C	Compte cellulaire de globules blanc : < 4 x 10 ³ ou > 12 x 10 ³ cellules/mm ³	Nouvel infiltrat ou infiltrat progressif
Apparition ou augmentation des aspirations purulentes		Consolidation
Râles bronchiques, sifflements ou ronchis		Cavitation
Apnée, tachypnée, tirage nasal		
Diminution des échanges gazeux (désaturation ou augmentation des besoins en oxygène ou de ventilation)		

Tableau I : Critères cliniques, biologiques et radiologiques pour le diagnostic de pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM).

De plus, l'identification microbiologique d'un pathogène par un prélèvement respiratoire (aspiration trachéo-bronchique, lavage broncho-alvéolaire, prélèvement de liquide pleural) est un élément important du diagnostic permettant d'adapter l'antibiothérapie et d'évaluer l'éradication microbiologique du germe en l'absence d'amélioration clinique.

Les PAVM débutant dans les 4 premiers jours d'hospitalisation sont définies comme PAVM précoces, souvent causées par des germes sensibles. Celles débutant après 4 jours sont définies comme tardives, parfois associées à des germes multi-résistants et à une mortalité plus importante (3,11,12). Le traitement de ces infections est devenu de plus en plus complexe du fait de l'émergence de souches multi-résistantes à l'échelle planétaire. Les CMI (concentration minimale inhibitrice) aux antibiotiques sont en augmentation à la fois pour les SASM et SARM à travers le monde (13).

D'autre part, même dans le cas d'un traitement antibiotique bien conduit, le succès du traitement est loin d'être idéal. Dans différentes études de non-infériorité récentes comparant des traitements antibiotiques pour la prise en charge de pneumonies acquises à l'hôpital ou sous ventilation mécanique à divers germes dont *Staphylococcus aureus*, le taux de succès dans le traitement des PAVM reste modeste malgré un traitement bien conduit.

Dans une étude de non-infériorité comparant la télavancine à la vancomycine pour le traitement de pneumonies acquises à l'hôpital dues à des bactéries à gram positif dont *S. aureus*, le taux de cure clinique atteignait au maximum 82,4% pour le groupe télavancine. Dans cette étude, 178 prélèvements était positifs à *S. aureus* dont 60 à SASM et 118 à SARM. Le succès de cure clinique n'était pas différent entre SASM et SARM (14). Dans une étude comparant le linezolid à la vancomycine pour le traitement de pneumonies à SARM acquises à l'hôpital (dont PAVM), Wunderlink et al. retrouvaient un taux de succès clinique maximal de 57,6% en faveur du groupe

traité par linézolide. Le taux d'éradication microbiologique pour les PAVM n'était que de 50% dans le meilleur des cas (15). Dans une étude de phase 2, Ramirez et al., ont comparé une forte dose de tigecycline à l'association imipenème/cilastatine pour le traitement de pneumonies acquises à l'hôpital incluant des PAVM. Le meilleur taux de cure clinique était de 85% avec la tigecycline. Parmi les *S. aureus* (25 patients, dont 9 SARM), le taux de succès n'était pas plus important pour les SARM (16). Dans une étude de phase 3 de non-infériorité comparant le ceftobiprole, céphalosporine de dernière génération à très large spectre, à un traitement de référence par ceftazidime et linezolide chez des patients atteints de pneumonie acquise à l'hôpital dont des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (dont 41 pneumonies à SARM et 55 pneumonies à SASM), Awad et al. retrouvaient un taux de cure clinique atteignant au mieux 77,8 % pour les pneumonies acquises à l'hôpital et 55,9 % pour les pneumonies acquises sous ventilation mécanique pour le groupe ceftazidime/linezolide. Le pourcentage de patients traités avec succès était discrètement inférieur pour les SARM (17).

Si l'on se réfère à ces études, il existe un taux non négligeable d'échec du traitement antibiotique même lorsqu'il est bien conduit allant de 15 à plus de 40% dans le traitement des pneumonies acquises à l'hôpital et des PAVM. De plus, le succès du traitement antibiotique n'est pas meilleur pour les pneumonies à SASM que celles à SARM. Si la pneumonie à SARM est une préoccupation importante pour certains pays notamment en Amérique du nord, son incidence en Europe et en France est relativement faible. Dans une cohorte prospective comportant 1348 patients menée au Royaume-Uni, Chalmers et al. retrouvaient une incidence de 2,2% de pneumonies associées aux soins à SARM contre 10,1% à SASM (18). Une étude prospective espagnole incluant 34 services de réanimation en 2011 et 2012 retrouvait une incidence de SARM 2,3% pour les pneumonie à associée aux soins parmi les 133 patients inclus (19).

Alors que le nombre d'infections invasives à *S. aureus* est à la hausse en France, la proportion de SARM parmi ces infections est en forte baisse entre 2002 et 2017 en France (Données du réseau de surveillance EARS-Net). Les données du réseau REA-Raisin sont similaires et rapportent un taux d'infections nosocomiales (dont pneumonies) à SARM en baisse régulière ces dernières années et ne représentant que 15,8% de l'ensemble des infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus* en 2017 contre 52% en 2006 (Données Réseau REA-Raisin France 2017).

La prévalence des PAVM à SARM en France est actuellement inférieure à 3% et le traitement probabiliste du SARM n'est pas recommandé en dehors de certains contextes particuliers tels qu'une

prévalence locale élevée ou une colonisation récente du patient à SARM notamment (2). Ces données sont concordantes avec celles observées au CHU de Nantes.

Bien qu'il ait longtemps été supposé que le SASM soit moins pathogène que le SARM du fait de la présence de certains facteurs de virulence retrouvés uniquement dans les souches résistantes, il est maintenant admis que la pathogénicité du *S. aureus* repose sur des variations génétiques à l'origine d'une modulation de l'expression des facteurs de virulence (20–23) et que le SASM est capable d'induire des pneumonies grevées d'une morbi-mortalité importante. Les pneumonies à SARM prenant une part peu importante des pneumonies à *S. aureus* en France et au CHU de Nantes, notre travail s'est attaché à évaluer et affiner la compréhension des mécanismes de la virulence du SASM dans les PAVM. A ce jour, le traitement d'une PAVM dans un service de réanimation repose sur une antibiothérapie probabiliste initiée au plus tôt après le diagnostic, puis à l'adaptation de l'antibiothérapie une fois le résultat de l'antibiogramme obtenu. Le SARM est défini par l'existence d'une résistance à la méticilline qui s'accompagne généralement d'une résistance à toutes les β -lactamines ainsi qu'à d'autres antibiotiques dont les aminoglycosides, macrolides, synergistines et fluoroquinolones. Un *S. aureus* est dit sensible à la méticilline en l'absence de cette résistance à la méticilline. Actuellement, le traitement anti-infectieux spécifique d'une PAVM repose sur l'antibiogramme du prélèvement respiratoire réalisé au moment du diagnostic, qui identifie dans 70% des cas une seule espèce bactérienne dominante, considérée comme responsable de l'infection. L'infection respiratoire de réanimation à SASM est habituellement traitée par β -lactamine par voie intraveineuse (oxacilline, cloxacilline, amoxicilline, céfazoline). Cette approche uniquement fondée sur la caractérisation du germe et sa sensibilité aux antibiotiques ne rend pas compte de la diversité bactérienne au sein d'une même espèce. Ainsi, au sein de l'espèce *Staphylococcus aureus*, il existe une grande variabilité génétique entre différents isolats, y compris lorsqu'ils sont sensibles aux antibiotiques, chaque isolat pouvant avoir une pathogénicité propre via une régulation différente de facteurs de virulence tels que la production d'exotoxines ou sa capacité à produire du biofilm par exemple (24,25). De plus, il a été régulièrement rapporté qu'un même individu, sain ou infecté à *S. aureus*, peut être colonisé par des isolats différents de *S. aureus* (26). Il paraît ainsi important d'approfondir notre connaissance de la diversité des comportements dont est capable *S. aureus* afin de pouvoir lutter plus spécifiquement et efficacement contre les infections respiratoires dont il est responsable.

II) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie à coloration de Gram positive, appartenant à la famille des micrococcaceae. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. Les fosses nasales antérieures constituent, avec les zones humides de la peau (aisselles, poignets, périnée), le site réservoir essentiel de *S. aureus*. Dans la population générale, la prévalence du portage nasal permanent est comprise entre 25 % et 30 % tandis que la colonisation transitoire par cette bactérie affecte au moins 60 % de la population restante (27). Ubiquiste et saprophyte, *S. aureus* constitue l'une des espèces les plus couramment isolées en milieu hospitalier avec *Escherichia coli* (*E. Coli*) et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Cette bactérie est impliquée dans la survenue d'infections acquises à l'hôpital et représente le deuxième agent pathogène responsable de ce type d'infections après *E. coli*, mais son isolement en milieu communautaire est également de plus en plus fréquent. La symptomatologie des infections causées par *S. aureus* est très polymorphe. Les infections suppuratives superficielles cutanéomuqueuses telles que les folliculites, les furoncles, les impétigos, les sinusites et les otites sont les plus fréquentes. Ces infections peuvent se compliquer par une diffusion hématogène de la bactérie ou par une extension locorégionale de l'infection. La bactérie est alors responsable de septicémies à l'origine de localisations viscérales pleuropulmonaires (abcès bulleux), cardiaques (endocardites aiguës), ostéoarticulaires (ostéomyélites) ou urinaires (phlegmon péri néphrétique) (20). Des infections non suppuratives d'origine toxinique appelées toxémies staphylococciques sont, elles, dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes cutanés staphylococciques, le choc toxique staphylococcique et les intoxications alimentaires.

La variété et la gravité des infections dont *S. aureus* est responsable sont dues pour partie à sa capacité à produire de nombreux facteurs de virulence tels que des exfoliatines, entérotoxines, hémolysines, protéines d'adhésion aux tissus ou d'échappement au système immunitaire. La régulation de ces facteurs de virulence est médiée par un réseau complexe dont l'un des acteurs majeurs est le système *agr* (Accessory Gene Regulator).

III) Régulation de *S. aureus* : le système *agr* (*Accessory Gene Regulator*)

Le système *agr* est un élément central dans le contrôle et la régulation de l'expression de gènes de virulence chez *S. aureus* (24,28–30). C'est un regroupement de gènes opérant sous le signal de deux promoteurs, capable d'auto-induction, et dont le contrôle est corrélé à la densité bactérienne dans un environnement donné (par exemple un site infectieux comme le parenchyme pulmonaire) via la production et l'activité de peptides auto-inducteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire (*auto-inducing peptides* ou AIP).

A) Organisation générale et auto-induction du système *agr*

Le locus *agr* consiste en 2 unités transcriptionnelles divergentes que sont l'ARN II et l'ARN III (transcription assurée par les promoteurs P2 et P3). Le locus ARN II contient 4 gènes *agrB*, *agrD* et *agrA*. Le gène *agrD* code un pro-peptide immature de 46 acides aminés. La protéine transmembranaire AgrB est ancrée dans la membrane cytoplasmique. Elle exerce un double rôle, à la fois d'enzyme protéolytique et de transporteur transmembranaire. AgrB va ainsi permettre la maturation de AgrD en une molécule appelée « Peptide Auto-inducteur » ou AIP grâce à 2 digestions protéolytiques successives (31). AgrB assure ensuite le transport du peptide mature dans le milieu extracellulaire (32). Au cours de la croissance bactérienne et plus particulièrement durant la phase exponentielle de croissance, le peptide auto-inducteur s'accumule dans le milieu extracellulaire. A partir d'un certain seuil de concentration, l'accumulation d'AIP active le système à 2 composants AgrA/AgrC (33). La protéine cytoplasmique AgrA, une fois activée, régule plusieurs gènes du métabolisme (34) et va se fixer au niveau des promoteurs P2 et P3, permettant l'expression de l'ARN II et de l'ARN III, eux-mêmes à l'origine de l'expression de nombreux facteurs de virulence. Ce système de communication inter-bactérien basé sur la sécrétion de petits peptides dans l'espace extracellulaire et capable d'induire une expression coordonnée de gènes bactériens au sein d'une même population est appelé *quorum sensing*. La figure 1 résume l'organisation générale du système *agr* de *quorum sensing* chez *S. aureus*.

Au sein de l'espèce *S. aureus*, il existe 4 variants de ce système de *quorum sensing*, nommés *agr*-I à IV (35) selon les mutations retrouvées dans le domaine senseur de l'histidine kinase AgrC et dans le polymorphisme de séquence d'AIP (36). En règle générale, chaque colonie de *S. aureus* appartient au même variant *agr*, du fait d'une inhibition croisée entre les AIP de chaque variant. Les interactions entre les AIP de chaque variant sont résumées dans la figure 2.

Plusieurs études ont démontré une relation forte entre groupe *agr* et certaines atteintes cliniques. Jarraud et al. ont montré que les souches du groupe *agr*-IV étaient associées à des atteintes de type syndrome exfoliative et impétigo bulleux. Dans les infections suppuratives, les endocardites sont principalement associées aux groupes *agr* I et II. Les groupes III et IV étaient associées avec TSST-1 (Gomes et al., 2005). Sakoulas et al. ont déterminé que plus de la moitié des isolats de SARM de bactériémies appartenaient au groupe II (37).

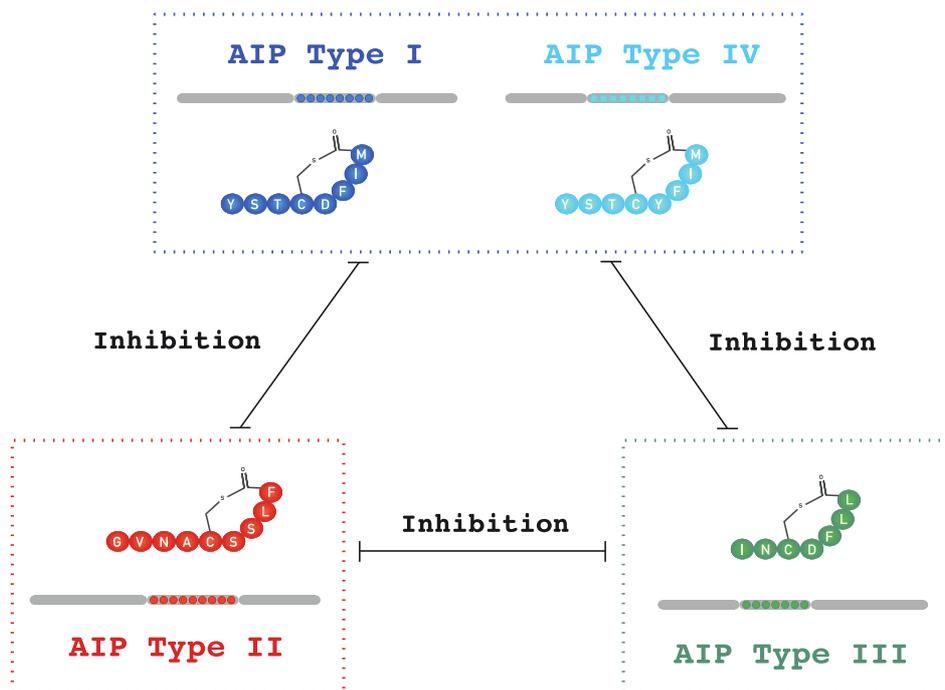


Figure 2 : Intéraction et cross-inhibition entre peptides auto-inductibles des quatre groupes *agr*

B) La régulation génique ARN-III dépendante

L'ARNIII est le principal effecteur du système *agr* responsable du contrôle des cibles du système *agr* (38). Il s'agit d'un ARN régulateur qui englobe également le gène de l'hémolysine delta (Hld) (39). Le premier mécanisme par lequel l'ARN III contrôle l'expression génique est l'appariement de base anti-sens avec des régions 5' non traduites, formant des duplex ARN. Excepté dans le cas de l'alpha-toxine, pour laquelle l'ARN III peut aussi agir comme activateur post-transcriptionnel, l'ARN III bloque habituellement la transcription (40). Par ce mécanisme direct, l'ARN III inhibe la production d'une série de protéines de surface comme la protéine A. De plus, l'ARN III bloque la translation du répresseur de la toxine protéin (Rot), qui appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels de staphylocoque (40–42). La protéine Rot se lie à la région promotrice de nombreuses exo protéines et toxines, bloquant leur transcription. Ces mécanismes permettent une up-régulation densité dépendante pour les enterotoxines, alpha-toxine, leukocidines, exo-enzymes de dégradation et une down-régulation des protéines de surface. Un des mécanisme d'up-regulation par l'ARN III parmi les mieux connus est la régulation de l'alpha-toxine (*hla*). L'ARNm d'*hla* prend habituellement la forme d'une boucle en épingle à cheveux qui empêche le ribosome d'accéder à son site de fixation. L'ARN III est capable de se lier à l'ARNm d'*hla*, modifiant la structure en épingle à cheveux et rendant possible la fixation du ribosome à son site de fixation et permettant l'initiation de la transcription de la protéine Hla (43).

C) La régulation génique ARN-III indépendante

Alors que l'on pensait historiquement que l'ARN III représentait le seul mécanisme par lequel le système *agr* contrôlait les gènes cibles, il a été trouvé plus récemment que le régulateur AgrA ne se liait pas seulement aux promoteurs P2 et P3 mais up-régulait également directement la transcription des opérons modulines phenol-solubles PSM α et PSM β en se liant à leur séquences promotrices respectives (34).

D) L'impact du système *agr* sur l'infection aiguë et la toxicité

Chez *Staphylococcus aureus*, l'up-régulation de facteurs de virulence par *agr* est nécessaire pour la progression de l'infection dans de nombreux modèles animaux d'infection aiguë, notamment l'endocardite (44), la peau et les tissus mous (45,46), la pneumonie (47–49), l'arthrite septique et l'ostéomyélite (50,51). Inversement, la down-régulation par *agr* des PSMs et d'autres composants de

surface est impliquée dans la production accrue de biofilm et la colonisation de matériel médical (52–54).

En général, la densité cellulaire et l'up-regulation de toxines et d'enzymes de dégradation par *agr* d'un côté et la down-régulation de composants de surface de l'autre est supposée refléter les caractéristiques requises des facteurs de virulence d'une bactérie au cours d'une infection : au début de l'infection une faible densité cellulaire et donc faible expression d'*agr* résulte en une production accrue de composants de surface requis pour la colonisation des tissus. Une fois la bactérie établie, la densité cellulaire bactérienne s'accroît, requérant des ressources énergétiques et une protection contre les défenses de l'hôte accrue, ce qui est rendu possible par l'up-régulation *agr* dépendante d'exo-enzymes et de toxines.

E) Principaux facteurs de virulence contrôlés par *agr* étudiés dans ce travail

1- L'hémolysine A

L'une des toxines *agr*-dépendante majeure est l'alpha-toxine (aussi dénommée hémolysine α ou Hla), encodée par le locus *hla*. Il s'agit d'une toxine formant des pores de 319 acides aminés en forme de tonneau Béta, qui se lie au récepteur de la désintégrine et metalloprotease 10 (ADAM10) sur la membrane des cellules de l'hôte (55). L'activité hémolytique de l'alpha-toxine a été mise en évidence chez de nombreux mammifères et notamment chez le lapin. En effet, les globules rouges de lapin sont beaucoup plus sensibles à l'action lytique de cette toxine que les globules rouges humains. Cette caractéristique est régulièrement utilisée *in vitro* pour déterminer le taux d'hémolyse d'une souche de *S. aureus*. De nombreuses autres cellules peuvent être lysées, notamment les lymphocytes T, les plaquettes, les kératinocytes et les fibroblastes. L'hémolysine A a été impliquée dans de multiples infections à staphylocoque chez l'humain. Les mutants isogéniques d'*hla* ont systématiquement démontrés une diminution de la sévérité de l'atteinte infectieuse comparé aux souches sauvages dans des modèles animaux de pneumonie (47), d'infections des tissus ou mous (21,56) ou endovasculaire (57). Dans une étude sur 231 prélèvements respiratoires, Stulik et al. observaient un quart de prélèvements positifs à staphylococcus aureus dont un tiers correspondaient à une pneumonie acquise sous ventilation mécanique, principalement à SARM. Les patients porteurs de SARM étaient peu nombreux à développer une pneumonie. Les souches de SARM isolées de patients sans pneumonie ou avec trachéo-bronchite avaient une activité alpha hémolytique moins importante que ceux développant une pneumonie sous ventilation mécanique. De plus, l'activité alpha-hémolytique des isolats étaient prédictives de la virulence dans un modèle murin de pneumonie (58).

La majorité des souches de *S. aureus* sont capables de produire l'hémolysine A. Il n'est pas décrit, à l'heure actuelle, de variation d'expression d'*hla* ou de la production d'hémolysine α selon le groupe *agr* auquel appartient une souche de *S. aureus*.

2- Les Phenol Soluble Modulins (PSMs)

Les Phenol Soluble Modulins (PSMs) sont une famille de toxines peptidiques composés d'hélices alpha. Chez *S. aureus*, il existe deux familles de PSM : les PSM β qui possèdent 44 acides aminés et les PSM α qui n'en possèdent que 21. Au sein de chaque famille, des séquences peptidiques différentes permettent de différencier 4 PSM α (de 1 à 4) et 2 PSM β (1 et 2). A forte concentration, les PSM α possèdent une activité lytique *in vitro* sur les PNN (34) et les érythrocytes (59). Ce pouvoir lytique est lié à leur propriété amphipatique. Les PSM α s'agrègent à la surface des membranes pour former des pores transmembranaires. En outre, il a été montré que PSM α 1 et PSM α 2 présentaient une activité bactéricide contre les bactéries de genre autre que *Staphylococcus*, notamment envers *Streptococcus pyogenes*, suggérant le rôle de ces PSMs dans l'interférence bactérienne de *S. aureus* avec les autres genres bactériens, rentrant en compétition pour la colonisation de la peau (60). Enfin, il a été décrit que les PSMs contribuaient à la formation du biofilm au contact de matériel (cathéter, prothèse, valve cardiaque), puis à son détachement, permettant ainsi à *S. aureus* de gagner de nouvelles surfaces à coloniser (61).

Parmi les PSMs, ceux encodés par le locus *psm- α* , notamment les PSM- α 3, sont les plus inflammatoires et lytiques sur une grande variété de cellules : neutrophiles, macrophages, ostéoblastes, érythrocytes (62,63). En conséquence, les peptides PSM α ont un impact important dans les infections aiguës à *S.aureus*, notamment de la peau et tissus mous, bactériémies ou ostéomyélite (62,64). Les PSMs sont sous contrôle direct de l'AgrA (34), mettant l'accent sur un rôle central dans la physiologie de *S. aureus*. L'ensemble des propriétés biologiques des PSMs est résumé dans la figure 3.

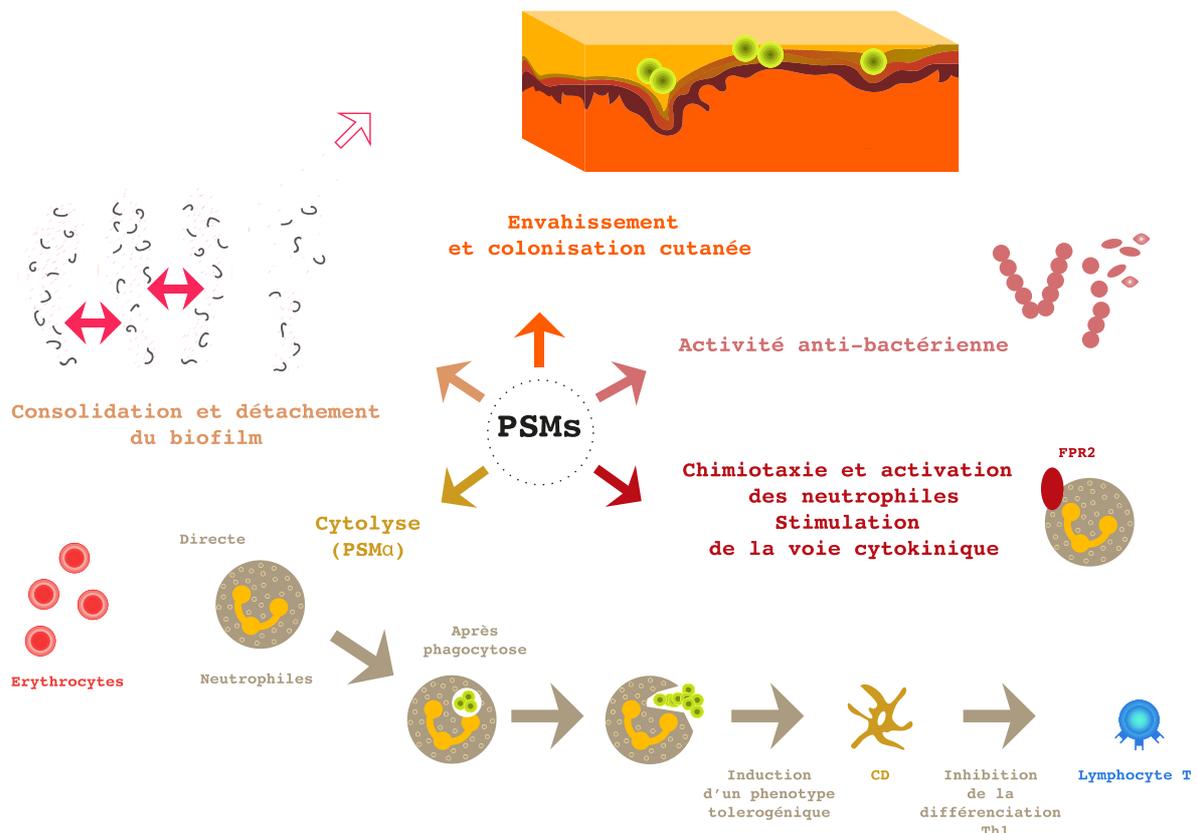


Figure 3 : Propriétés biologiques des Phenol Soluble Modulins (PSMs), facteur de virulence majeur de *S. aureus*

IV) Multi-Locus Séquence Typing et complexes clonaux

La technique de Multi-Locus Sequence typing (MLST) est une méthode de séquençage nucléotidique pour caractériser, sous-typer et classer les membres d'une population bactérienne de staphylocoque (65). Cette technique est basée sur une amplification génique par PCR (Polymérase Chain Reaction) et le séquençage de fragments internes d'environ 450 paires de base de sept gènes de ménages essentiels à la fonction cellulaire et présents dans tous les organismes avec des variations de séquences minimales au cours du temps. Ces gènes ont été sélectionnés car ils pourvoient le plus grand nombre d'allèles parmi les gènes présélectionnés permettant une bonne résolution pour caractériser la diversité génétique de la population de *Staphylococcus aureus*. Tous les ST ayant au moins 5 des 7 gènes en commun sont regroupés dans un même complexe clonal (CC).

La structure génétique de la population de *S. aureus* est hautement clonale. Au niveau mondial, chez *S. aureus* sensible à la métilcilline, 11 clones prédominent : CC1, CC5, CC8, CC9, CC12, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45, et CC51, alors que chez *S. aureus* résistant à la métilcilline (SARM)

seulement 5 clones prédominent : CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 (101). En Europe, les mêmes clones sont globalement retrouvés (66). Les souches CC8 et CC30 sont particulièrement épidémiogènes. Les souches de SARM USA300, épidémiques en Amérique du Nord et productrices d'une toxine de Panton et Valentine (PVL), appartiennent au CC8 (67,68). Ces dernières années il a été observé un clone émergent, CC398, (à la fois SARM et SASM) associé à une mortalité élevée des patients fragilisés (69,70).

Chacune de ces lignées clonales présente une combinaison unique de leur génome variable, constitué notamment d'éléments génétiques mobiles (Mobile Genetic Elements ou MGEs) contenant des gènes de régulation ou codant pour des protéines d'adhésion aux tissus. Chaque lignée clonale possède ainsi un pattern de gènes de virulence propre. Le locus *agr* appartient également au génome variable de *S. aureus* et est strictement associés avec certaines lignées clonales. Ainsi, les clones CC8, CC25, CC22, CC45 et CC395 sont associés au groupe *agr*-I. Le groupe *agr*-II est associé à CC5, CC12 et CC15. Le CC30 est associé au groupe III et le CC121 au groupe IV (71).

V) Hypothèse de travail

Notre hypothèse de travail était que l'hétérogénéité de la population des SASM, actuellement non prise en compte en pratique clinique courante est associée à l'évolution des PAVM à *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM).

VI) Objectifs du travail

L'objectif principal de ce travail était d'étudier l'association entre le devenir des patients développant une PAVM à SASM et l'hétérogénéité des souches de SASM dans une cohorte de patients de réanimation neuro-lésés du CHU de Nantes ayant développé une pneumonie acquise sous ventilation mécanique. Les objectifs secondaires étaient :

- Rechercher une possible association entre hétérogénéité et virulence
- Étudier l'expression de certains facteurs de virulence vis-à-vis de différents antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices
- Développer une méthode de typage du SASM rapide en pratique clinique courante permettant un meilleur pronostic, à partir d'outils existants.

MATERIEL ET METHODES

I) Population étudiée

Les données cliniques ont été recueillies rétrospectivement à partir des données d'une cohorte mise en place par le réseau régional de réanimations du grand ouest ATLANTREA ainsi qu'à partir des dossiers médicaux des patients. La cohorte ATLANTREA est une cohorte prospective de patients pris en charge dans les services de réanimation chirurgicale de onze hôpitaux de l'ouest de la France, recueillant de nombreux paramètres épidémiologiques et cliniques pour servir de base de données à des travaux scientifiques sur ces patients.

Les critères d'inclusions étaient : patient majeur ; hospitalisation de plus de 72 heures dans un des deux services de réanimation du CHU de Nantes prenant en charge les lésions cérébrales sévères (traumatisme crânien grave, hémorragie intracrânienne, hémorragie sous-arachnoïdienne) ; diagnostic de pneumonie acquise sous ventilation mécanique selon les critères de l'American Thoracic Society (ATS) avec identification microbiologique par prélèvement respiratoire (aspiration trachéo-bronchique ou lavage broncho-alvéolaire) de *S. aureus* sensible à la méticilline. Les critères d'exclusion étaient : données cliniques insuffisantes ; diagnostic de PAVM non conforme à celui de l'ATS.

II) Définition des atteintes cliniques

A) Pneumonie acquise sous ventilation mécanique

Les critères diagnostiques utilisés étaient ceux des recommandations d'experts de l'American Thoracic society parues en 2016 (mise à jour des recommandations de 2005), décrits dans le chapitre d'introduction.

B) Syndrome de détresse respiratoire aigüe

Le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) est un processus inflammatoire atteignant les poumons induisant un œdème pulmonaire non-hydrostatique, riche en protéines. Le SDRA n'est pas une complication spécifique de la pneumonie infectieuse mais représente sa forme la plus sévère. Les conséquences immédiates sont l'apparition d'une hypoxémie profonde, une diminution de la

compliance pulmonaire ainsi qu'une augmentation du shunt intra-pulmonaire et de l'espace-mort. Au plan ultra structural, on retrouve une inflammation aigüe de la barrière alvéolo-capillaire, une déplétion en surfactant et une baisse de l'aération pulmonaire. La définition historique du SDRA dite définition de Berlin, a été proposée par un groupe de travail sous l'égide de l'European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) (72). Le SDRA y est défini par la présence dans les 7 jours suivant une pathologie pulmonaire ou extra-pulmonaire aigüe de l'association d'une hypoxémie aigüe ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$) chez un patient ventilé avec une pression expiratoire positive (PEP) de 5 cmH₂O au moins, ainsi que d'infiltrats radiologiques bilatéraux non entièrement expliqués par une insuffisance cardiaque ou une surcharge volémique. La définition de Berlin distingue les SDRA selon le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ en SDRA légers ($200 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$), SDRA modérés ($100 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) et SDRA sévères ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$).

Dans les dernières recommandations françaises de la société de réanimation en langue française parues en 2019, le SDRA sévère était défini par un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ inférieur à 150 mmHg (73).

C) Récidive de PAVM et échec du traitement

La récidive de PAVM était définie par un nouvel épisode de PAVM survenant plus de 7 jours après un premier épisode résolu, avec identification de SASM sur au moins un prélèvement par aspiration endo-trachéale ou lavage broncho-alvéolaire. L'échec du traitement était défini par une récidive de PAVM et/ou le décès du patient.

III) Caractérisation des souches étudiées

A) Vitesse de croissance

La veille de la manipulation, chaque souche étudiée était mise en culture en bouillon BCC et placée au bain marie avec agitation pour la nuit. Le jour de la manipulation, un inoculum compris entre 0,5 et 0,6 MacFarland était réalisé en bouillon BCC pour chaque souche. 200 uL de chaque inoculum étaient insérés en triplicate dans une plaque de 96 puits à fond plat. 3 puits étaient remplis avec 200 uL de bouillon BCC chacun (témoin négatif). Les densités optiques de chaque puits étaient ensuite lues toutes les 10 minutes pendant une durée de 16 heures à l'aide du lecteur optique et du logiciel d'analyse MultiskanFC de Thermo Fisher Scientific®.

B) Définition du groupe *agr*

A partir de cultures fraîches de 18h en gélose TS, pour chaque souche, plusieurs colonies ont été mises en suspension dans 50 uL de lysostaphine à 200 ug/mL puis mises au bain marie pendant 1 heure à 37°C. 100 uL de solution Tris/PK ont été ajoutés et l'ensemble remis au bain marie à 55°C pendant 1 heure puis 10 minutes à 100°C. Les solutions ont ensuite été centrifugées et les surnageants récupérés. 200 uL d'eau ont été ajoutés par échantillon et les extraits conservés à -20°C. Une PCR multiplex était ensuite réalisée sur les échantillons avec l'Accuprime™ *Taq* DNA polymérase, avec migration des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. La révélation était réalisée par révélation dans un gel de BET (Bromure d'éthidium). Le nombre de paires de bases des produits amplifiés permettait le classement dans l'un des groupes *agr*.

C) Typage MLST et complexes clonaux

A partir de souches fraîches de 18 heures en gélose TF, 5 à 6 colonies identiques d'une même souche ont été mises en suspension dans 50 uL de Lysostaphine à 50 ug/mL et la suspension placée 1 heure au bain marie à 37°C. Une solution de Tris Hcl 0,05 M et protéinase K (PK) était préparée et 100 uL de cette solution ajoutée à la suspension précédente. L'ensemble a été mis 1 heure à 55°C puis 10 minutes à 100°C. La suspension a été centrifugée et 100 uL de surnageant récupéré pour chaque souche. 200 uL d'eau ont été ajoutées et les extraits conservés à -20°C.

Une PCR (*Polymérase Chain Reaction*) a été réalisée pour amplifier les 7 gènes de ménages. La séquence des amorces utilisées pour l'amplification est décrite dans le tableau II. Une migration par électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose avec les produits de la PCR. Le séquençage a été réalisé par la plateforme de séquençage du laboratoire IRS-UN. L'analyse des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel Séquence Scanner® et le type MLST défini en analysant les séquences via le site mlst.net.

Gènes	Primers	Séquence 5' - 3'
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTAATAACGATATC
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAAC TACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTGTGAAAAGCTTAA

Tableau II : Amorces correspondant aux 7 gènes de ménage permettant le classement épidémiologique des *S. aureus* par MLST (Multi-Locus Sequence Typing). Les *S. aureus* ayant 5 des 7 gènes en commun sont regroupés au sein d'un même complexe clonal.

D) Caractérisation de l'hémolyse α

La veille, chaque souche était mise en culture dans 5 mL de bouillon BCC et mise en agitation pendant 18 heures. Le jour même, une solution d'érythrocytes de lapin était préparée en prélevant 3 mL de sang de lapin dans un tube contenant une solution de PBS-EDTA et d'héparine. Cette solution était centrifugée puis diluée dans une solution de PBS-BSA pour obtenir une solution d'érythrocytes de lapin à 4%. Après agitation, les souches étaient centrifugées. Le surnageant était récupéré et une dilution au 1/20^e réalisée. Dans une plaque 96 puits à fond plat, 100 uL de chaque souche étaient déposés par puits. 100 uL de solution d'érythrocytes étaient ajoutés dans chacun des puits. Un contrôle positif était réalisé avec un puits recevant 100 uL Triton X100 à 1%. Un contrôle négatif était réalisé avec un puits recevant 100 uL de PBS. La plaque était incubée 1h à 37°C dans le spectromètre Multiskan FC avec une mesure de la DO toutes les min à 560 nm.

Le pourcentage d'hémolyse d'une souche était calculé au bout d'une heure selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse d'une souche} : \left(\frac{\text{DO contrôle négatif} - \text{DO souche}}{\text{DO contrôle négatif} - \text{DO contrôle positif}} \right) \times 100$$

IV) Protocole d'étude des ARN d'intérêt

A) Extraction et purification des ARN

Le protocole d'extraction des ARN de *S. aureus* a été mis en place au cours de ce travail au sein de l'unité 3826 du laboratoire IRS2 de l'université de Nantes. L'extraction et la purification des ARN ont été réalisés à l'aide du kit NucléoSpin RNA plus de Macherey-Nagel avec une modification du protocole du fabricant selon les étapes décrites ci-après. La veille de la manipulation, à partir des souches congelées, une culture était relancée en bouillon BCC et mise au bain marie à 37°C pendant une nuit. Le jour même, la suspension était centrifugée et le culot resuspendu dans 3 mL de bouillon BCC et des inocula de 0,5 à 0,6 MacFarland réalisés. Les inoculas étaient placés dans des tubes Falcon et placés au bain marie à 37°C jusqu'au temps étudiés (2, 5, et 16 heures).

A chaque temps étudié, un échantillon de la suspension était prélevé et un inoculum réalisé à 2 MacFarland dans 500 uL. L'échantillon était centrifugé, le surnageant retiré et 100uL de lysostaphine à 100 ug/mL ajoutée. L'ensemble était placé 10 minutes à 37°C. 350 uL de LBP (tampon de lyse du kit Macherey Nagel « NucléoSpin RNA Plus » étape 1) étaient ensuite ajoutés puis l'ensemble placé dans des tubes contenant 200 mg de billes d'oxyde de zirconium. Le mélange était broyé à 30 Hz pendant 1 minute puis placé dans la glace 2 minutes et ce, à quatre reprises. Les tubes étaient ensuite centrifugés et le surnageant récupéré. Le protocole d'extraction était ensuite repris selon les recommandations du fabricant à la deuxième étape.

B) Suppression de la contamination ADN

La digestion de l'ADN contaminant a été réalisée à l'aide du Kit TurboDNASE de Fisher Scientific® selon les recommandations du fabricant.

C) PCR en temps réel (qPCR)

La PCR était précédée d'une étape de transcription inverse permettant d'obtenir l'ADN complémentaire des ARN totaux de chacun de nos échantillons standardisés à 55 ng d'ARN total par microlitre.

Les gènes d'intérêt de chaque souche étudiée étaient ensuite amplifiés par PCR en temps réel (qPCR) à l'aide des amorces présentées dans le tableau III. L'amplification était réalisée à l'aide d'oligo-éléments et du fluorophore SYBR Green. Le cycle d'amplification était le suivant : 1 cycle de prétraitement 2 minutes à 50°C, 1 cycle de dénaturation initiale 10 minutes à 95°C puis 40 cycles comportant une dénaturation de 15 secondes à 95°C et une extension de 60 secondes à 60°C.

Gènes	Séquence 5'3'
<i>ARN III</i>	F-GAAGGAGTGATTTCAATGGCACAAG R-GAAAGTAATTAATTATTCATCTTATTTTTTAGTGAATTTG
<i>Hld</i>	F-GAGTTGTTTAATTTTAAG R-TTTTAGTGAATTTGT
<i>Hla</i>	F- CAACAACACTATTGCTAGGTTCCA R-TTTTGTGCATGCCATTTTC
<i>AgrA</i>	F-CGAAGACGATCCAAAACAAAG R-ATGTTACCAACTGGGTCATGC
<i>PSMoperon</i>	F-TATCAAAAGCTTAATCGAACAATTC R-CCCCTTCAAATAAGATGTTTCATATC

Tableau III : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes des facteurs de virulences et de l'histidine kinase AgrA du système de *quorum sensing* de *S. aureus* étudiés dans ce travail.

D) Analyse de l'expression des ARN

La PCR quantitative (ou qPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicons (portion d'ADN définie par un couple d'amorces). À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN complémentaire total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible.

1- Le Cycle de seuil (Ct)

La valeur de cycle de seuil Ct (ou Cp) correspond au point seuil pour lequel le signal de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond, c'est-à-dire au nombre de cycles minimal pour lequel l'ADN amplifié est détectable. Ce point est atteint en début de phase exponentielle. Plus la quantité d'ADN initiale est faible, plus le Ct sera élevé. La figure 4 schématise une réaction de PCR.

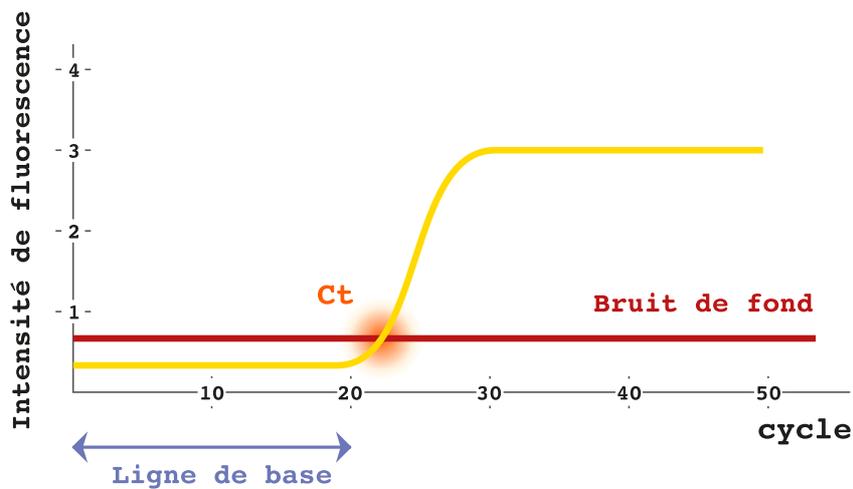


Figure 4 : Représentation schématique d'une réaction de PCR. L'axe des ordonnées correspond à la fluorescence émise par l'échantillon. L'axe des abscisses aux cycles de PCR. La courbe jaune correspond au signal fluorescent émis par l'échantillon d'intérêt. Le point de Ct est le seuil à partir duquel la fluorescence de l'échantillon dépasse le bruit de fond et peut être détectée.

2- Delta-CT (ΔCt)

Le ΔCt correspond à la normalisation par rapport à un contrôle endogène lors d'une même qPCR. On compare le Ct du gène d'intérêt avec celui d'un gène cible de référence, dans notre cas le gène de l'ARN 16s, gène de ménage bactérien classiquement utilisé.

Le calcul du ΔCt correspond à la formule : $\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{ARN 16s}}$

3- Delta Delta CT ($\Delta\Delta Ct$)

Le $\Delta\Delta Ct$ est une normalisation par rapport à un standard choisi. Dans notre travail, le standard était le ΔCt du temps le plus précoce auquel nous avons réalisé l'extraction pour chaque souche et était calculé selon la formule :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon au temps d'intérêt}} - \Delta Ct_{\text{échantillon au temps initial}}$$

La formule Rq (Relative quantification) = $2^{\Delta\Delta Ct}$ permet d'exprimer le résultat du $\Delta\Delta Ct$ en expression relative de quantité d'ARN par rapport au standard choisi. Par exemple, une Rq égale à 4 signifie que l'échantillon d'intérêt contient quatre fois plus d'ARN que l'échantillon standard (ou que l'échantillon du temps initial dans notre cas).

E) Concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques

La souche d'intérêt était mise en contact avec des solutions de différents antibiotiques (cloxacilline, cefazoline, vancomycine, linézolide) à une CMI de 1 pour la souche d'intérêt. La CMI était évaluée par méthode de dilution pour l'ensemble des antibiotiques et confirmée par bandelette E-test® pour la vancomycine et le linezolid. L'absence d'effet bactéricide a été vérifiée par la réalisation d'une vitesse de bactéricidie pour la souche mise en contact avec chacun des antibiotiques. L'extraction des ARN et l'analyse des résultats étaient réalisées selon le même protocole que pour les autres échantillons.

V) Détection de la delta-toxine par spectrométrie de masse

La détection de la présence de la delta-toxine a été réalisée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Nantes sur le spectromètre du laboratoire de bactériologie du CHU de Nantes (VITEK® MS de Biomerieux), à partir d'une incubation de 24 heures des souches d'intérêt sur géloses TS (tryptone soja) à 37°C. Une souche était considérée comme positive quand un pic était détecté à 3005 ± 5 Thomson (TH) ou 3035 ± 5 Th (74). 43 souches ont été analysées au total.

VI) Analyse statistique

L'analyse de l'hémolyse α selon le ratio P/F a été réalisée par régression logistique. Pour les comparaisons de groupes à variable qualitative, le test réalisé était un chi 2. Pour les comparaisons de deux groupes à variables quantitative le test réalisé était un t-test non paramétrique (Mann-Whitney). Pour les comparaisons de plus de deux groupes de variables, le test réalisé était un test ANOVA à un facteur de variance. Pour l'ensemble des tests, la p-value était de 0,05. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Prism version 7.0a de Graphpad.

RESULTATS

I) Caractéristiques de la population de patients

53 patients adultes hospitalisés dans deux services de réanimation chirurgicale du CHU de Nantes (réanimation polyvalente hôpital Nord Laennec et réanimation chirurgicale et brûlés hôtel Dieu) présentant une ou plusieurs PAVM à *S. aureus* sensible à la meticilline entre juin 2012 et aout 2016 ont été inclus. Cela correspondait à 60 prélèvements respiratoires par aspiration endo-trachéale ou lavage broncho-alvéolaire. En effet, deux patients ont présenté chacun deux récides (3 prélèvements par patient) et trois autres patients ont présentés chacun une récide de PAVM (2 prélèvements par patient). L'âge moyen des patients inclus était de 41 ans, à majorité des hommes (71%). 70% des patients étaient hospitalisés dans les suites d'un traumatisme crânien grave, le reste des patients étaient atteints de lésions neurologiques non traumatique (hémorragie sous arachnoïdienne en majorité). La durée d'hospitalisation moyenne en réanimation était de 26,3 [16 ; 37] jours, la durée de ventilation mécanique de 18,9 [11 ; 25] jours. Les données cliniques et démographiques de la population sont présentées dans le tableau IV. Les données n'étaient pas significativement différentes entre la population totale et le sous-groupe de patients ayant présenté une PAVM à SASM seul.

Caractéristiques des patients	Population totale n = 53	PAVM à SASM seul n = 39
Age (ans)	41 [23 ; 65]	41,6 [23 ; 65]
Hommes, N(%)	37 (71%)	27 (69%)
Femmes, N(%)	15 (29%)	12 (31%)
Cérébrolésés d'origine non traumatique, N(%)	16 (30%)	10 (26%)
Traumatisés crâniens graves, N(%)	37 (70%)	29 (74%)
Score SOFA le jour du diagnostic de PAVM	7,3 [5 ; 10]	7,5 [5 ; 10]
Durée ventilation mécanique (jours)	18,9 [11 ; 25]	18,6 [13 ; 23]
Durée d'hospitalisation réanimation (jours)	26,3 [16 ; 37]	27,6 [19 ; 35]
Jours vivants sans antibiotiques	11,5 [5 ; 19]	12,4 [6 ; 19]
Délai entre admission et diagnostic (jours)	8,6 [3 ; 8]	7,3 [4 ; 7,8]

Tableau IV : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population de patients étudiée. Les caractéristiques n'étaient pas statistiquement différentes selon que le patient ait développé une PAVM plurimicrobienne ou à SASM seul.

Les prélèvements respiratoires ont été réalisés pour moitié par aspiration endo-trachéale (53%) et pour moitié par lavage broncho-alvéolaire (47%). Trente-neuf prélèvements (65%) retrouvaient un SASM seul. Dans 20 prélèvements, le SASM était associé à un second germe et sur deux de ces prélèvements un troisième germe était présent. Le germe le plus fréquemment retrouvé en association était *Haemophilus influenzae* (45%), suivi d'*Escherichia coli* (18%) et de *Streptococcus pneumoniae* (18%). L'antibiothérapie curative la plus utilisée était l'association amoxicilline et acide clavulanique (55% des épisodes), suivie par la cloxacilline (25%). Le tableau V résume les caractéristiques des épisodes de PAVM.

Évolution des épisodes de PAVM	n = 60
SDRA sévères (<150) à J1	14 (23%)
SDRA modérés et sévères (< 200) de J3 à J7	17 (28%)
Décès	7 (13%)
Récidive de PAVM à SASM	9 (15%)
Antibiothérapie curative après adaptation	
Amoxicilline + acide clavulanique	36 (55%)
Cloxacilline	15 (25%)
Oxacilline	5 (8,3%)
Cefepime	2 (3,3%)
Rocéphine	1 (1,7%)
Aucune	1 (1,7%)
Germe associé au SASM	n = 22
<i>Haemophilus influenzae</i>	10 (45%)
<i>Escherichia coli</i>	4 (18%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4 (18%)
<i>Citrobacter koseri</i>	1 (4,5%)
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1 (4,5%)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (4,5%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (4,5%)

Tableau V : Caractéristiques des épisodes de PAVM : évolution clinique, type d'antibiothérapie curative après adaptation, germes retrouvés en association au SASM.

II) Caractéristiques des souches de SASM isolées

A) Vitesse de croissance

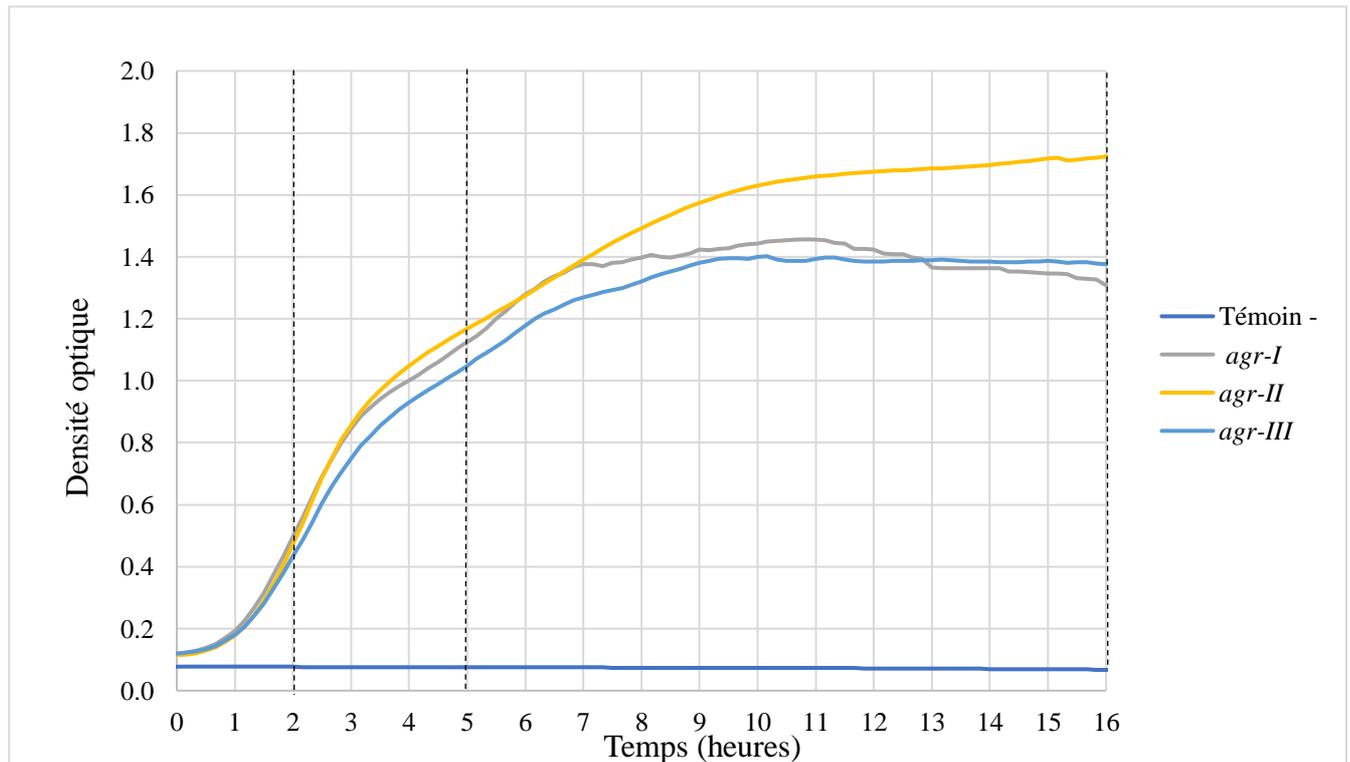


Figure 5 : Vitesse de croissance moyenne des souches appartenant à chaque groupe *agr*. Chaque courbe représente la moyenne des vitesses de croissance de 10 souches appartenant à un même groupe *agr*. Le témoin négatif correspond à du milieu BCC. Le groupe *agr-IV* n'est pas représenté car ne compte qu'une seule souche dans notre travail.

La figure 5 représente la vitesse de croissance moyenne de 10 souches pour chaque groupe *agr*. On observait une phase exponentielle de croissance s'étendant de deux à huit heures de croissance. A douze heures, la phase de plateau était atteinte pour les groupes I et III alors qu'il persistait une discrète croissance pour les souches du groupe *agr-II*. Ainsi, pour les mesures d'expression de gènes réalisées *in vitro* nos souches d'intérêt se situaient en fin de phase exponentielle de croissance à 5 heures et en phase de plateau à 16 heures, là où l'expression de l'ARN-III notamment est maximale (28). Ainsi, dans notre travail, on n'observait pas de différence significative de prolifération entre les souches de SASM appartenant aux différents groupes *agr*.

B) Hémolyse alpha

Le pourcentage d'hémolyse- α absolue en une heure *in vitro* a pu être obtenu pour 45 souches. Il existait une relation linéaire entre le niveau d'hémolyse α *in vitro* et la gravité de l'atteinte respiratoire clinique reflétée par le ratio PaO₂/FiO₂ pour les souches ayant une hémolyse élevée, supérieure à 50% (R square = 0,32, p=0,03). Ainsi, plus l'hémolyse de la souche *in vitro* était forte, plus le ratio PaO₂/FiO₂ du patient était bas, témoignant d'une altération majeure des échanges gazeux pulmonaires. Cette relation n'était pas retrouvée quand l'ensemble des souches était prise en compte (Figure 6). Il n'existait pas de différence sur le niveau d'hémolyse entre les souches appartenant à des groupes *agr* différents.

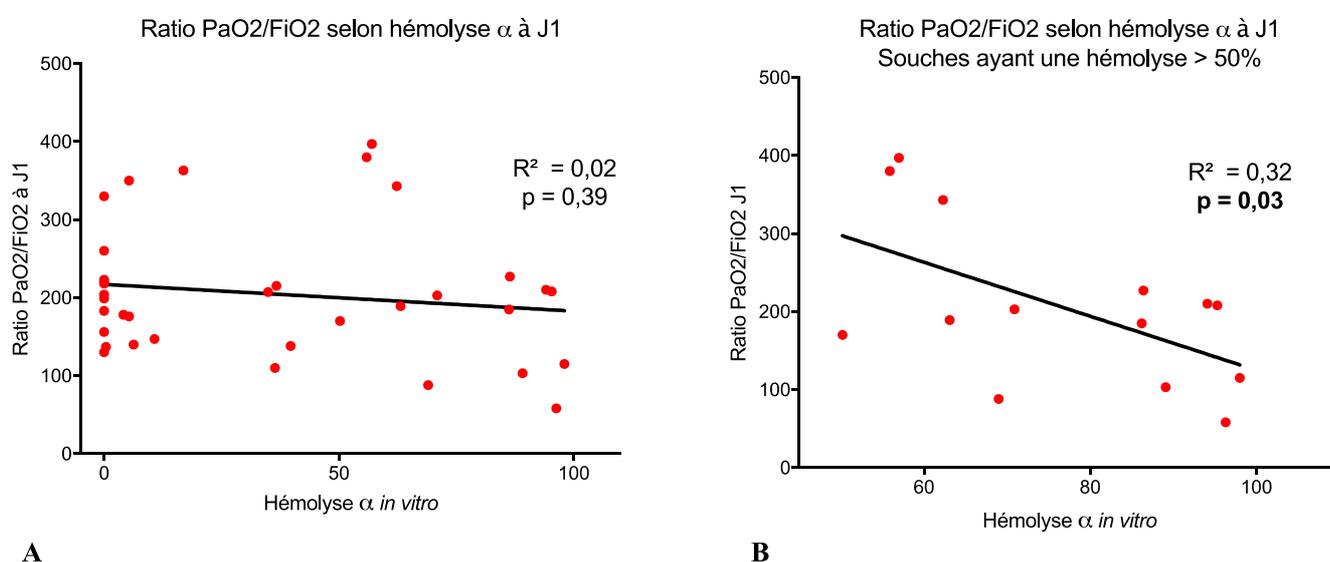


Figure 6 : Atteinte respiratoire évaluée par le ratio PaO₂/FiO₂ selon hémolyse α *in vitro* pour chaque souche à J1, jour du diagnostic de la PAVM. **A.** Ensemble des souches dont l'hémolyse a été caractérisée *in vitro* et le ratio P/F disponible (n=37). **B.** Souches dont l'hémolyse était supérieure à 50% *in vitro* et le ratio P/F disponible (n=14).

Notre travail confirme les données de la littérature faisant de l'hémolysine α l'un des facteurs de virulence majeur chez *S. aureus* (55).

C) Variants *agr* et complexes clonaux

Parmi les 60 souches étudiées, le groupe *agr*-I était majoritaire avec 25 souches (41,6%), suivi des groupes *agr*-II avec 18 souches (30%), *agr*-III avec 15 souches (25%) et *agr*-IV avec une souche (2%). Pour une souche, le groupe *agr* n'a pas pu être déterminé.

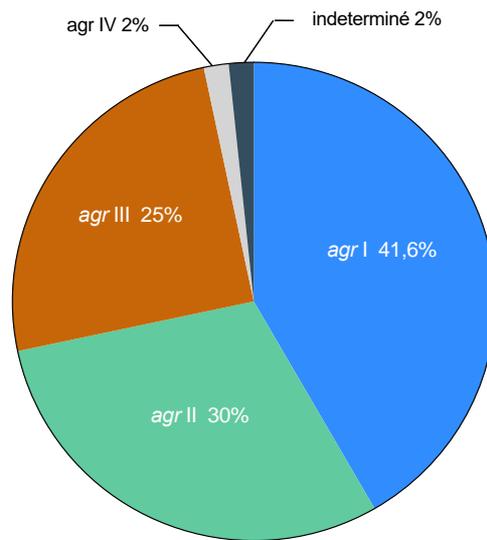


Figure 7 : Répartition des variants *agr* au sein de la population étudiée

La figure 7 montre la diversité des variants du système *agr* isolés dans notre population. A notre connaissance, il n'est pas décrit dans la littérature un tropisme pulmonaire préférentiel pour les souches du groupe *agr*-I, parfois associé aux endocardites (75), bien qu'il soit ici retrouvé en majorité. L'observation de quatre variants *agr* différents dans notre population renforce l'hypothèse que la population de *S. aureus* sensible à la méticilline chez les patients développant une PAVM est hétérogène.

Concernant les complexes clonaux (CC), les plus fréquemment retrouvés étaient le CC30 (22%), suivi des CC5 et CC8 (15% chacun) et du CC398 (12%). Pour les souches de SASM appartenant au groupe *agr*-I, les complexes clonaux prédominants étaient le CC 8 (32%), le CC 398 (28%) et le CC 45 (20%). Pour les souches du groupe *agr*-II, les complexes CC 5 (50%), CC 15 (22%) et CC 9 (11%) prédominaient. Pour celles du groupe *agr*-III, le complexe CC 30 (87%) était principalement retrouvé. Ces résultats étaient conformes avec les données de la littérature (71). La répartition des complexes clonaux au sein des groupes *agr* est représentée dans la figure 8.

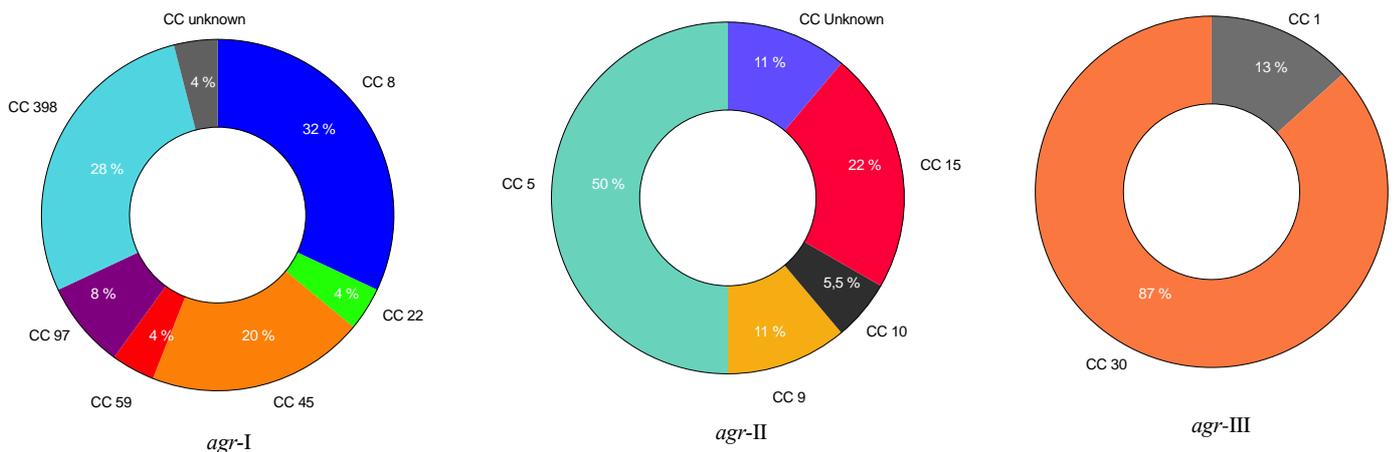


Figure 8 : Répartition des complexes clonaux au sein des groupes *agr*.

Ces résultats démontrent l'hétérogénéité des souches de SASM observées au cours d'une PAVM en réanimation. Au vu de la diversité des clusters de gènes de virulence dans les différentes lignées clonales de *S. aureus* sensible à la méticilline, nous avons cherché à étudier l'impact de l'expression de certains facteurs de virulence du *S. aureus* selon le groupe *agr* auquel appartient la souche *in vitro*.

IV) Expression de facteurs de virulence selon le type *agr* au cours du temps *in vitro*

A) Souches étudiées

L'expression des quatre gènes d'intérêt ARN a été étudiée au cours du temps pour 12 souches (quatre pour chaque groupe *agr*-I, II et III). Dans l'hypothèse où la gravité clinique serait liée à des différences d'expression de facteurs de virulence *in vitro*, nous avons choisi pour chaque groupe des PAVM cliniquement graves (présence d'un SDRA, d'un décès ou d'une récurrence) et non graves. Les caractéristiques de ces souches et de la PAVM qui leur est associée sont résumées dans le tableau VI.

Souche	<i>agr</i>	P/F < 150 à J1	P/F < 200 de J3 à J7	Décès	Récidive	CMI Oxacilline	CMI Vancomycine	CMI Linezolide
Sa 4	I	O	O	O	N	0,5	<= 0,5	2
Sa 7		O	N	N	N	0,5	1	2
Sa 19		O	O	N	O	0,5	1	2
Sa 24		N	N	N	O	0,5	1	2
Sa 10	II	O	N	N	N	0,5	1	2
Sa 18		N	N	N	N	0,5	<= 0,5	2
Sa 38		N	N	N	N	<= 0,25	1	2
Sa 44		N	N	N	O	0,5	1	2
Sa 8	III	O	N	N	N	<= 0,25	<= 0,5	2
Sa 14		N	N	N	N	<= 0,25	1	2
Sa 37		N	O	N	N	0,5	1	2
Sa 42		O	O	N	O	<= 0,25	1	2

Tableau VI : Caractéristiques cliniques des infections et CMI aux antibiotiques des souches dont l'expression de gènes d'intérêt a été étudiée in vitro.

B) ARN III

L'expression relative du gène de l'ARN III pour les souches *agr*-I augmentait significativement plus que les autres groupes *agr*. Son expression était 2800 fois supérieure à 16 heures par rapport au temps deux heures. Pour les souches *agr*-II et III, l'expression était peu augmentée, environ 10 fois supérieure à 16 heures. La différence entre le groupe *agr*-I et les deux autres groupes était significative à 5 et 16 heures (test ANOVA à un facteur ; $p=0,008$).

C) Hémolysine delta

Pour *hld* de manière similaire à l'ARN III, l'expression relative des souches *agr*-I augmentait significativement plus que les autres groupes *agr*. Son expression était 1400 fois supérieure à 16 heures par rapport au temps deux heures. Pour les souches *agr*-II et III, l'expression d'*hld* était peu augmentée (expression environ 10 fois supérieure) à 16 heures. La différence entre le groupe *agr*-I et les deux autres groupes était significative à 5 et 16 heures (test ANOVA à un facteur ; $p=0,02$).

D) PSM operon

L'expression relative du gène *PSMoperon* pour les souches *agr*-I augmentait significativement plus que les autres groupes *agr*. Son expression était en moyenne 380 fois supérieure à 16 heures par rapport au temps deux heures. Pour les souches *agr*-II et III, l'expression était peu augmentée

(expression environ 5 fois supérieure) à 16 heures. La différence entre le groupe *agr-I* et les deux autres groupes était significative à 16 heures (test ANOVA à un facteur ; $p=0,01$).

E) AgrA

L'expression relative du gène *AgrA* pour les souches *agr-I* augmentait significativement plus que les autres groupes *agr*. Son expression était en moyenne 28 fois supérieure à 16 heures par rapport au temps deux heures. Pour les souches *agr-II* et III, l'expression était peu augmentée (expression environ 4 fois supérieure) à 16 heures. La différence entre le groupe *agr-I* et les deux autres groupes était significative à 16 heures (test ANOVA à un facteur ; $p=0,01$).

F) Hémolysine α

L'expression d'*hla* était peu augmentée au cours du temps (environ 10 fois supérieure à 16 heures), sans différence significative au cours du temps entre les souches de différents groupes *agr*.

L'ensemble des résultats de l'expression des facteurs de virulence au cours du temps *in vitro* est résumé dans la figure 9.

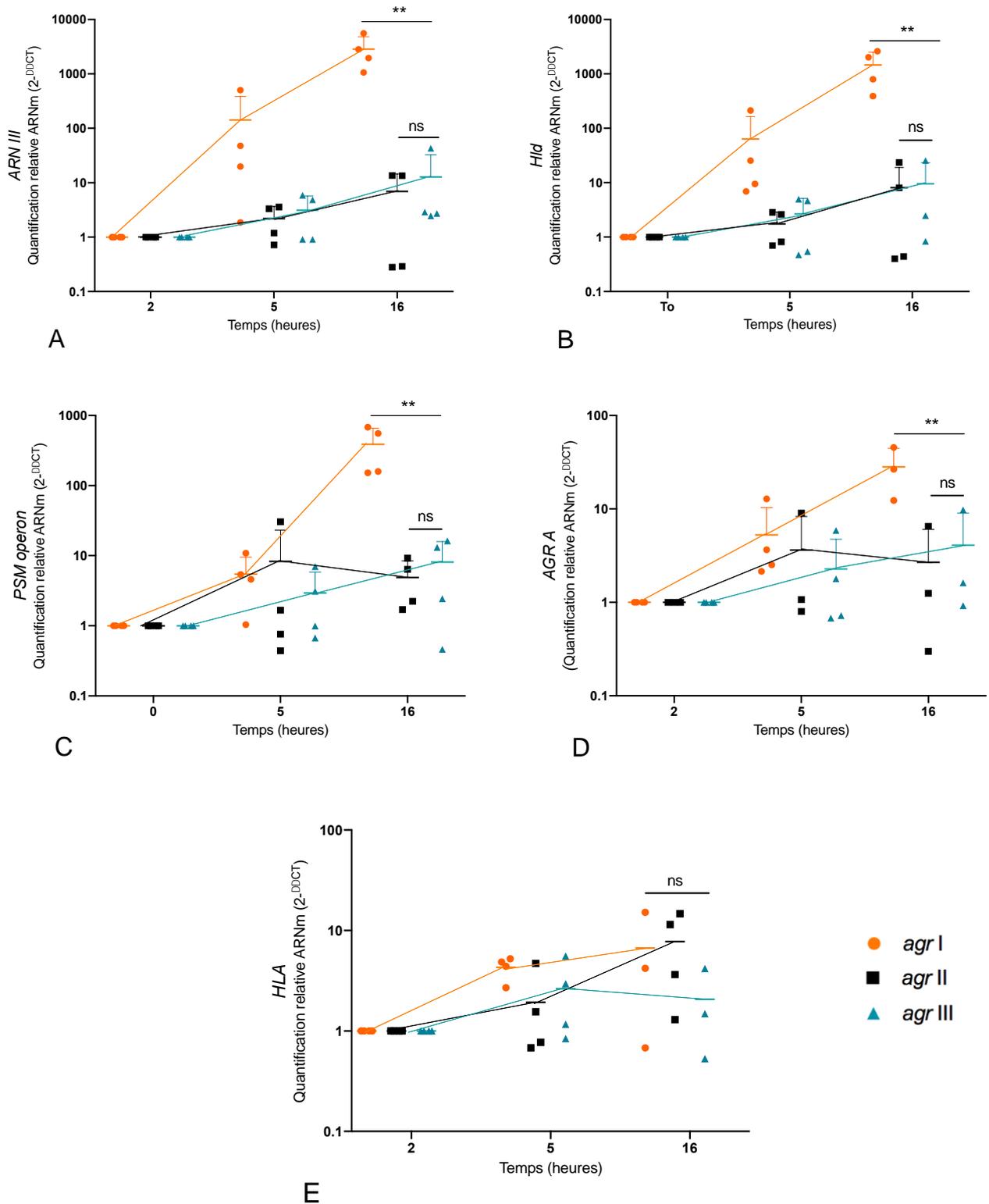


Figure 9 : Expression relative des quatre gènes *ARN III*, *hld*, *PSMoperon*, *AgrA*, *Hla* selon le groupe *agr* au cours du temps *in vitro* pour quatre souches par groupe *agr*. L'expression des gènes est significativement augmentée à 16 heures pour les souches du groupe *agr*-I sauf pour le gène *hla*. ** = différence significative (Test ANOVA à un facteur). La barre horizontale représente la moyenne du 2^{-ΔΔCT} pour les quatre souches étudiées dans chaque groupe.

Le profil d'expression des gènes *ARN III* et *hld* étaient très proches, en corrélation avec la relation génétique étroite qui lie ces deux gènes (gène *hld* porté par l'ARN III). De même, le profil d'expression de l'ARNm des gènes *PSMoperon* et *AgrA* était similaire, ce qui est cohérent avec la description de l'up-regulation des Phenol-Soluble Modulins par la protéine régulatrice *AgrA* capable de se fixer aux régions promotrices des gènes des PSMs (34). Dans nos résultats, l'expression de *PSMoperon* pour le groupe *agr-I* est environ 100 fois supérieure à celle-observée pour *AgrA* et deux fois supérieure pour les groupes *agr-II* et *III*, indiquant un probable mécanisme amplificateur intervenant entre l'expression d'*AgrA* et celle du *PSMoperon*.

En résumé, nous avons observé une expression fortement accrue et plus précoce des gènes de trois facteurs de virulence majeurs du *S. aureus* (*ARN III*, Hémolysine delta et Phenol-Soluble Modulins) et d'une protéine régulatrice pilier de la boucle de *quorum sensing* (*AgrA*) pour les souches de SASM du groupe *agr-I*. L'observation d'une régulation différente de l'expression des facteurs de virulence et de l'histidine kinase *AgrA* selon le groupe *agr* nous a fait questionner l'impact clinique de ces résultats obtenus *in vitro*.

III) Pathogénicité et groupe *agr*

A) Sévérité clinique

Les patients atteints de PAVM à *S. aureus* du groupe *agr-I* étaient placés sous ventilation mécanique en moyenne plus de trois jours supplémentaires par rapport à ceux infectés par des souches du groupe *agr-II* ou *agr-III* (*agr-I* 20,7 +/- 11,3 jours ; *agr-II* 17,3 +/- 9 jours ; *agr-III* 17,7 +/- 7,6 jours) (Figure 10A). Concernant la durée du séjour en réanimation, les patients du groupe *agr-I* restaient hospitalisés trois jours et demi de plus que ceux du groupe *agr-II* et cinq jours de plus que ceux du groupe *agr-III* (*agr-I* 30 +/- 17,9 jours ; *agr-II* 26,6 +/- 19,1 jours ; *agr-III* 24,7 +/- 8,8 jours) (Figure 10B). Le score de sévérité clinique SOFA le jour du diagnostic de la PAVM était lui aussi plus élevé chez les patients du groupe *agr-I* comparé aux autres groupes (*agr-I* 7,7 +/- 3,2 jours ; *agr-II* 6,5 +/- 2,6 jours ; *agr-III* 7,4 +/- 2,1 jours) (Figure 10C). Les différences n'étaient pas significatives sur le plan statistique (Test ANOVA multivarié à un facteur).

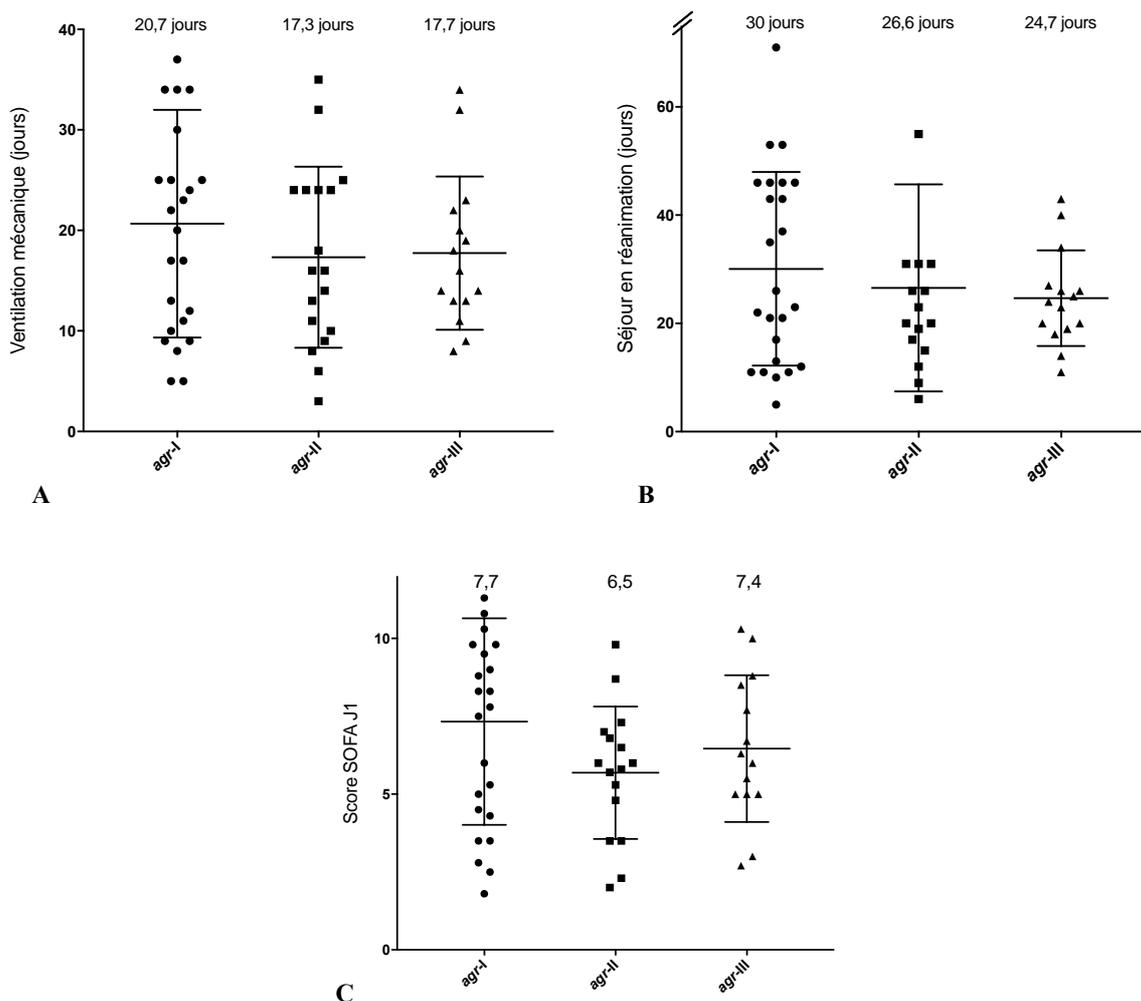


Figure 10 : Sévérité clinique selon le groupe *agr*. Les barres horizontales représentent moyenne et écart type. **A.** Durée de ventilation mécanique en jours (groupe *agr-I* 24 patients ; *agr-II* 18 patients ; *agr-III* 15 patients). **B.** Durée de séjour en réanimation en jours (groupe *agr-I* 24 patients ; *agr-II* 16 patients ; *agr-III* 15 patients). **C.** Score de sévérité clinique SOFA à J1 (jour du diagnostic) (groupe *agr-I* 23 patients ; *agr-II* 15 patients ; *agr-III* 13 patients).

B) Atteinte respiratoire

1- Sévérité initiale

Dans notre population, 14 patients (23% des épisodes de pneumonie) présentaient un SDRA sévère ($P/F < 150$ mm Hg) dès le jour du diagnostic de PAVM. Le type de groupe *agr* d'une souche de *S. aureus* n'était pas prédictif d'une telle sévérité initiale (Figure 11). Chez six de ces patients, le SDRA sévère persistait après le troisième jour d'infection.

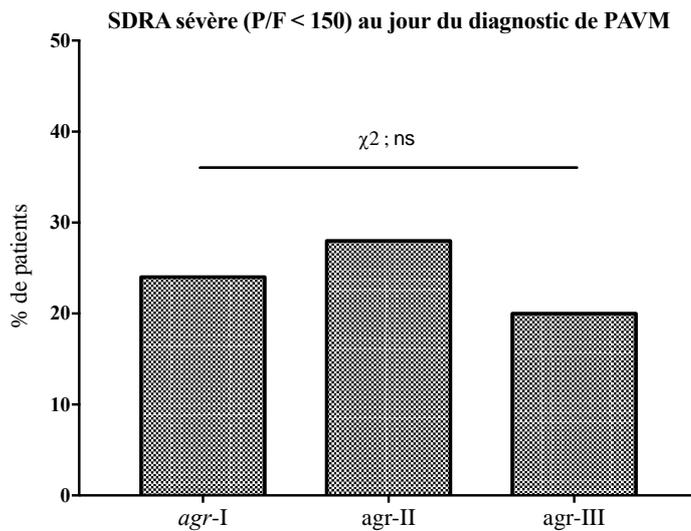


Figure 11 : Pourcentage de patients présentant un SDRA sévère selon le groupe *agr* le jour du diagnostic de PAVM. 14 patients présentaient un ratio P/F < 150 dont 6 du groupe *agr-I*, 5 du groupe *agr-II* et 3 du groupe *agr-III*. Il n'existait pas de différence significative entre les groupes.

2- Progression vers une forme grave au cours de la pneumonie

17 patients (28% des épisodes de pneumonie) développaient un SDRA sévère (P/F < 150 mm Hg) entre le troisième et le septième jour après le diagnostic. Le groupe *agr* n'était pas prédictif d'une telle évolution. En revanche, lorsque l'on incluait les patients atteints de SDRA modéré selon la définition de Berlin (P/F < 200 mm Hg), le groupe *agr-I* était surreprésenté bien que la différence ne soit pas statistiquement significative (χ^2 ; $p = 0,09$). En effet, chez les 25 patients ayant une PAVM à *S. aureus* du groupe *agr-I*, 14 (53,8%) d'entre eux évoluaient vers un SDRA modéré ou sévère contre seulement 11 (32,3%) parmi les 35 patients infectés par des *S. aureus* des autres groupes *agr*. Du fait d'un effectif restreint, la différence était non significative statistiquement (Figure 12). Cette évolution péjorative est confirmée par la comparaison du ratio PaO₂/FiO₂ moyen entre J1 et J3. En effet, celui-ci augmente à J3 pour les groupes *agr-II* et *agr-III* alors qu'il stagne pour le groupe *agr-I* (différence non significative statistiquement), confirmant l'absence d'amélioration des échanges gazeux pulmonaires (Figure 13).

SDRA modérés et sévères (P/F < 200) entre J3 et J7

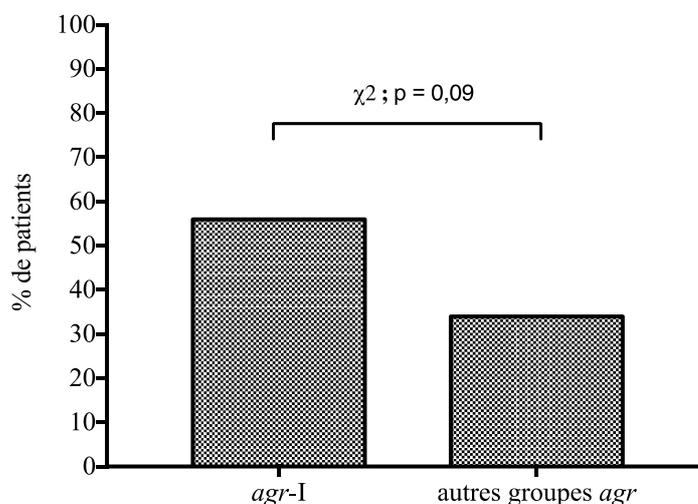


Figure 12 : SDRA modérés et sévères selon le groupe *agr* après trois jours d'évolution de la pneumonie. 14 patients sur 25 (53,8%) développent un SDRA modéré à sévère dans le groupe *agr-I* contre 11 sur 35 (32,3%) dans les autres groupes.

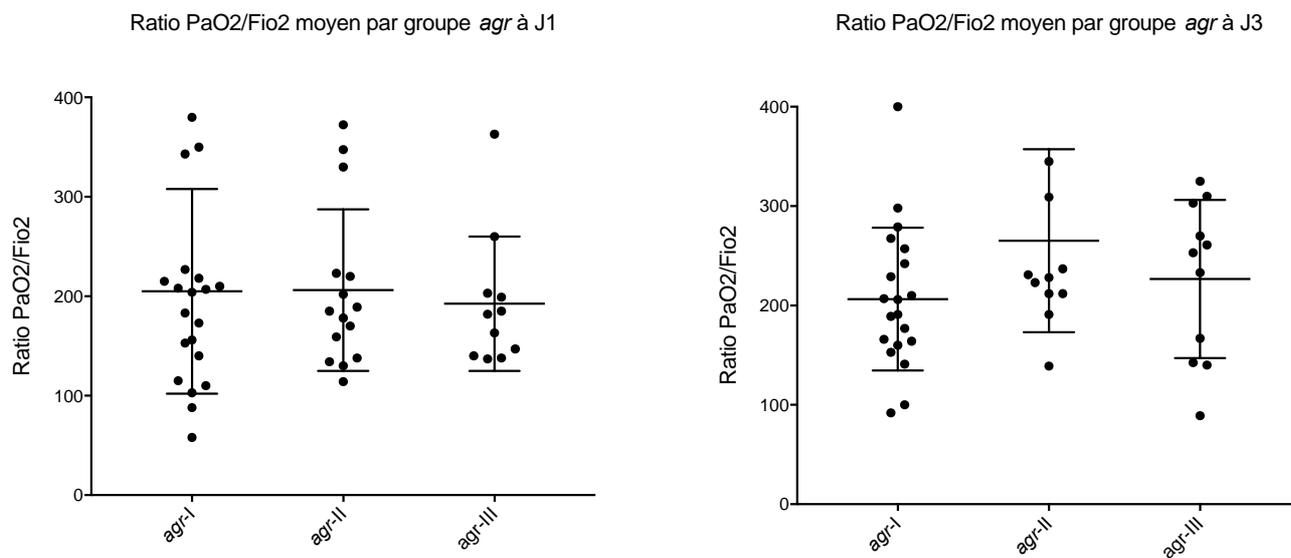


Figure 13 : Comparaison des ratios P_{aO_2}/F_{iO_2} moyen selon le groupe *agr* à J1 (jour du diagnostic de la PAVM, à gauche) et J3 (à droite). Pour le groupe *agr-I* le ratio P/F n'évolue pas alors qu'il progresse pour les deux autres groupes, signe d'une amélioration de la fonction pulmonaire. La différence n'était pas significative statistiquement.

3- Échec du traitement

Les patients atteints de PAVM à SASM du groupe *agr-I* étaient significativement plus à risque de présenter un échec de traitement (défini par l'existence d'une récurrence et/ou le décès du patient). 10 patients (40%) parmi les 25 patients du groupe *agr-I* présentaient un échec de traitement contre 6 (17%) parmi les 29 patients atteints de PAVM d'autres groupes *agr* (χ^2 ; $p=0,003$) (Figure 14). Pour ce critère « échec du traitement », critère composite associant l'existence d'une récurrence et/ou le décès du patient, les résultats détaillés montraient que 5 patients décédés sur 7 au total avaient développé une pneumonie à SASM du groupe *agr-I*, les deux autres patients avaient développé une pneumonie à SASM du groupe *agr-II*. Parmi les 9 souches de *S. aureus* à l'origine d'une pneumonie ayant récidivé, cinq appartenait au groupe *agr-I*, deux au groupe *agr-II* et deux au groupe *agr-III*.

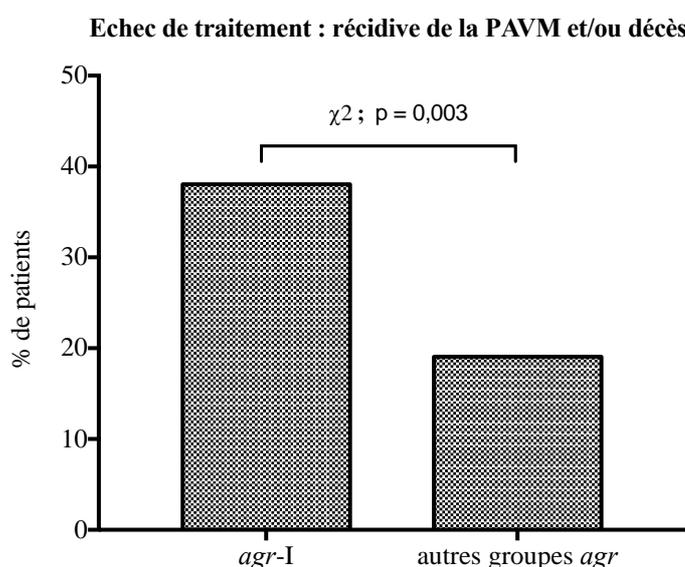


Figure 14 : Échec de traitement défini par la récurrence d'une PAVM à SASM au cours du séjour et/ou le décès du patient au sein des différents groupes *agr*. Le groupe *agr-I* semblait être à l'origine de plus d'échecs de traitement.

Dans notre population, le groupe *agr-I* était prédictif à la fois d'une évolution vers une forme sévère de pneumonie et de l'échec de traitement de cette pneumonie.

V) Détection de la delta toxine par MALDI-TOF

Nos résultats suggèrent que l'expression précoce et intense de certains facteurs de virulence, dont l'ARN III et l'hémolysine delta, est corrélée à une pathogénicité clinique accrue. Dans l'espoir de trouver un marqueur pronostic simple et utilisable en routine hospitalière, nous avons recherché le pic d'hémolysine delta à 3005 ± 5 Thomson (TH) ou 3035 ± 5 par spectrométrie de masse pour les 12 souches pour lesquelles l'expression de l'ARNm de *hld* a été évaluée par qPCR. Nous avons ensuite recherché la présence ou non d'un pic caractéristique par MALDI-TOF sur 31 souches supplémentaires (43 souches au total) et évalué la présence du pic comme marqueur pronostic dans la PAVM à SASM.

A) Détection de l'hémolysine delta et expression d'*hld* *in vitro*

Bien que le nombre d'échantillons soit relativement faible, nous avons observé une corrélation étroite entre la présence d'un pic et une forte expression d'*hld* (expression d'*hld* au moins dix fois supérieure à 16 heures par rapport à deux heures) et, à l'inverse, une absence de pic en l'absence d'expression de l'*hld* à 16 heures *in vitro*. Pour deux souches les résultats étaient discordants. Ainsi, on ne retrouvait pas de pic pour la souche 7 alors que l'expression d'*hld* était 389 fois plus importante à 16h en qPCR *in vitro*. Pour la souche 42, il existait un pic visible alors que l'expression d'*hld* était quasiment nulle *in vitro*.

Concernant l'évolution clinique, toutes les souches présentant un pic en MALDI-TOF présentaient au moins une complication (SDRA ou récurrence) et pour trois d'entre elles présentaient à la fois un SDRA précoce et tardif ainsi qu'une récurrence de PAVM. Pour les 7 souches ne présentant pas de pic, 3 d'entre elles n'étaient associées à aucune complication clinique, les souches restantes ne présentant qu'une seule complication. Bien qu'il semble que la présence du pic d'hémolysine delta puisse être en partie prédictif d'une mauvaise évolution clinique, le nombre restreint d'échantillons testés ne permet pas de tirer de conclusion à ce stade. Le tableau VII résume les résultats obtenus. La figure 15 montre l'analyse d'une souche de *S. aureus* par la technique de MALDI-TOF présentant un pic caractéristique à 3005 Thomson confirmant la présence de delta-toxine.

Groupe <i>agr</i>	Souche	Expression relative ARNm <i>hld</i> à 16h <i>in vitro</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Pic caractéristique MALDI-TOF	Gravité clinique
I	Sa 4	x2018	Oui	SDRA J1 et après J3 + Décès
	Sa 7	x389	Non	SDRA J1
	Sa 19	x2604	Oui	SDRA J1 et J3 + Récidive
	Sa 24	x795	Oui	Récidive
II	Sa 10	x23,5	Oui	SDRA J1
	Sa 18	x8	Non	/
	Sa 38	x0,4	Non	/
	Sa 44	x0,4	Non	Récidive
III	Sa 8	x2	Non	SDRA J1
	Sa 14	x8,8	Non	/
	Sa 37	x1,6	Non	SDRA après J3
	Sa 42	x0,9	Oui	SDRA J1 et après J3 + Récidive

Tableau VII : Résultats de l'analyse des 12 souches d'intérêt par la technique de MALDI-TOF. Comparaison de la présence ou non du pic caractéristique de l'hémolysine delta avec l'expression *in vitro* du gène *hld* à 16h et avec la gravité clinique de l'infection. On considèrerait qu'une souche exprimait le gène *hld* lors que son expression *in vitro* à 16h était supérieure à 10 fois sa valeur à 2h (76). Pour 10 souches sur 12 les résultats étaient concordants.

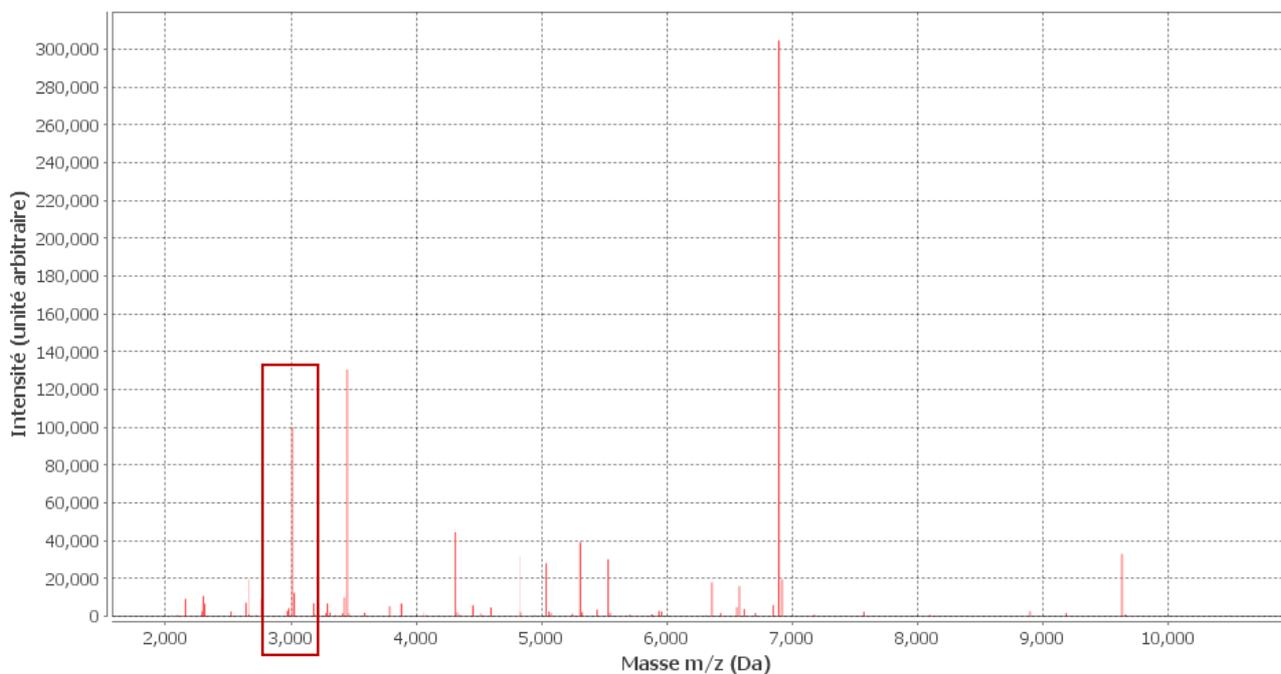


Figure 15 : Analyse d'une souche de SASM de notre cohorte (Sa 42) par la technique de MALDI-TOF. Présence d'un pic caractéristique à 3005 Thomson (encadré rouge) indiquant la présence de l'hémolysine delta dans l'échantillon.

B) Détection de l'hémolysine delta comme outil pronostic de la PAVM à *S. aureus* sensible à la méticilline

La recherche du pic caractéristique de l'hémolysine delta par la technique de MALDI-TOF a été réalisée pour 43 souches de notre population. On retrouvait le pic caractéristique pour 20 souches. Pour 23 souches, on ne retrouvait pas de pic caractéristique. Nous avons évalué si la présence du pic caractéristique dans un prélèvement était à même de prédire une évolution péjorative d'une PAVM à SAMS dans notre population. Pour ce faire, nous avons calculé sensibilité et spécificité de ce test pour la prédiction d'une sévérité initiale (SDRA sévère à J1), d'une évolution vers une forme sévère au cours de la pneumonie (SDRA modéré à sévère entre J3 et J7) et pour l'échec de traitement de la PAVM.

1- Sévérité initiale

Pour les 10 souches à l'origine d'un SDRA sévère au jour du diagnostic de PAVM (J1), 7 présentaient un pic caractéristique alors que 3 n'en présentaient pas, soit une sensibilité de 70%. Pour les 33 souches à l'origine d'une pneumonie peu sévère à J1, 13 présentaient un pic et 20 n'en présentaient pas, soit une spécificité de 67% (Tableau VIII).

	SDRA sévère J1	Pas de SDRA	
Pic +	7	13	20
Pic -	3	20	23
	10	33	

Tableau VIII : Nombre de souches de SAMS à l'origine d'un SDRA sévère ou d'une pneumonie non grave à J1 selon la présence ou non du pic caractéristique de l'hémolysine delta retrouvé en MALDI-TOF. Pour 70% des souches à l'origine d'un SDRA sévère un pic caractéristique était retrouvé. Pour 67% des souches à l'origine d'une pneumonie non grave on ne retrouvait pas de pic.

2- Évolution vers une forme sévère

Pour les 17 souches testées à l'origine d'un SDRA modéré à sévère entre J3 et J7 après le diagnostic, 9 présentaient un pic caractéristique alors que 8 n'en présentaient pas, soit une sensibilité de 53% seulement. Pour les 26 souches n'étant pas à l'origine d'un SDRA modéré à sévère, 11 présentaient un pic et 15 n'en présentaient pas, soit une spécificité de 57% (Tableau IX).

	SDRA sévère J3-J7	Pas de SDRA	
Pic +	9	11	20
Pic -	8	15	23
	17	26	

Tableau IX : Nombre de souches de SASM à l'origine ou non d'un SDRA modéré à sévère entre J3 et J7 après diagnostic initial selon la présence ou non du pic caractéristique de l'hémolysine delta retrouvé en MALDI-TOF. Pour 53% des souches à l'origine d'un SDRA modéré à sévère un pic caractéristique était retrouvé. Pour 57% des souches n'étant pas à l'origine de SDRA on ne retrouvait pas de pic.

3- Échec de traitement

Pour les 13 souches testées à l'origine d'un SDRA sévère au jour du diagnostic de PAVM (J1), 7 présentaient un pic caractéristique alors que 3 n'en présentaient pas, soit une sensibilité de 77%.

Pour les 33 souches à l'origine d'une pneumonie peu sévère à J1, 10 présentaient un pic et 20 n'en présentaient pas, soit une spécificité de 67% (Tableau X).

	Échec de traitement	Succès	
Pic +	10	10	20
Pic -	3	20	23
	13	30	

Tableau X : Nombre de souches de SASM à l'origine ou non d'un échec de traitement selon la présence ou non du pic caractéristique de l'hémolysine delta retrouvé en MALDI-TOF. Pour 77% des souches à l'origine d'un échec de traitement, un pic caractéristique était retrouvé. Pour 67% des souches traitées avec succès on ne retrouvait pas de pic.

Ainsi, dans notre travail, la recherche du pic caractéristique de l'hémolysine delta recherché par MALDI-TOF avait une sensibilité importante de 70% pour la sévérité initiale de la PAVM et de 77% pour prédire l'échec du traitement ce qui pourrait en faire un outil pronostic très intéressant vu la relative simplicité de sa mise en œuvre. Elle était en revanche peu intéressante pour prédire l'évolution secondaire vers une forme sévère.

VI) Régulation des ARN d'intérêt vis-à-vis de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques pour une souche d'intérêt

De nombreuses études ont rapporté l'effet modulateur de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sur l'expression de facteurs de virulence des bactéries chez *S. aureus* (60,77–79). Selon l'antibiotique étudié, il peut y avoir une inhibition ou une stimulation de l'expression du facteur de virulence étudié. Nous avons cherché à savoir, pour une souche appartenant au groupe le plus pathogène *agr-I*, quels antibiotiques avaient le plus fort pouvoir inhibiteur sur quatre facteurs de virulence : ARN III, hémolysine delta, PSMs, hémolysine alpha. La souche Sa19 avait été isolée chez un patient ayant développé une PAVM sévère (SDRA précoce et tardif et récurrence de la PAVM). Nous avons ainsi évalué l'expression relative de quatre gènes d'intérêt *ARN-III*, *hld*, *hla* et *PSM operon* dans des conditions de concentrations sub-inhibitrices pour quatre antibiotiques : céfazoline, cloxacilline, linézolide, vancomycine. L'expression des ARN était comparée à celle de la souche étudiée sans antibiotique (témoin négatif). Les résultats sont représentés dans la figure 16.

A) Cefazoline

L'expression des quatre ARN d'intérêt était systématiquement inhibée aux différents temps étudiés avec un nadir à 5 heures de mis en contact. A ce temps, l'expression de l'*hld* était 100 fois inférieure au témoin, celle de *ARN-III* 250 fois inférieure, celle de l'*hla* 4 fois inférieure et celle de *PSM operon* plus de 4 fois inférieure. Il persistait une inhibition importante à 16 heures de mise en contact (expression des gènes quatre fois inférieure au témoin).

B) Cloxacilline

L'action des antibiotiques était globalement inhibitrice, avec une inhibition maximale à 16 heures de mise en contact. A ce temps, l'expression de *hld* était 4 fois inférieure au témoin, celle de *ARN-III* près de 10 fois inférieure, celle de *hla* 2 fois inférieure et celle de *PSM operon* plus de 4 fois inférieure. Pour *hla*, à 5 heures on observait une réponse discrètement stimulatrice (1,3 fois le témoin). De même, pour le *PSM operon*, à 5 heures, on observait une réponse stimulatrice à 2 fois le témoin.

C) Vancomycine

En dehors de *PSM operon*, l'action des antibiotiques était inhibitrice avec une inhibition assez stable entre 2 et 16 heures, 1,5 fois inférieure pour *hld* et 2 fois inférieure pour *ARN-III* et *hla*. Pour

PSMoperon en revanche, l'action de la vancomycine était stimulatrice à 5 heures (près de 4 fois le témoin) et rejoignait l'expression du témoin à 16 heures.

D) Linezolid

Pour les quatre gènes, l'action du linezolid était assez fortement inhibitrice à 5 heures : expression 40 fois inférieure pour *ARN-III*, 16 fois inférieure pour *hld*, 4 fois inférieure pour *PSMoperon* et 2 fois inférieure pour *hla*. A 16 heures, l'action du linezolid restait faiblement inhibitrice pour les quatre gènes (expression quatre fois moindre).

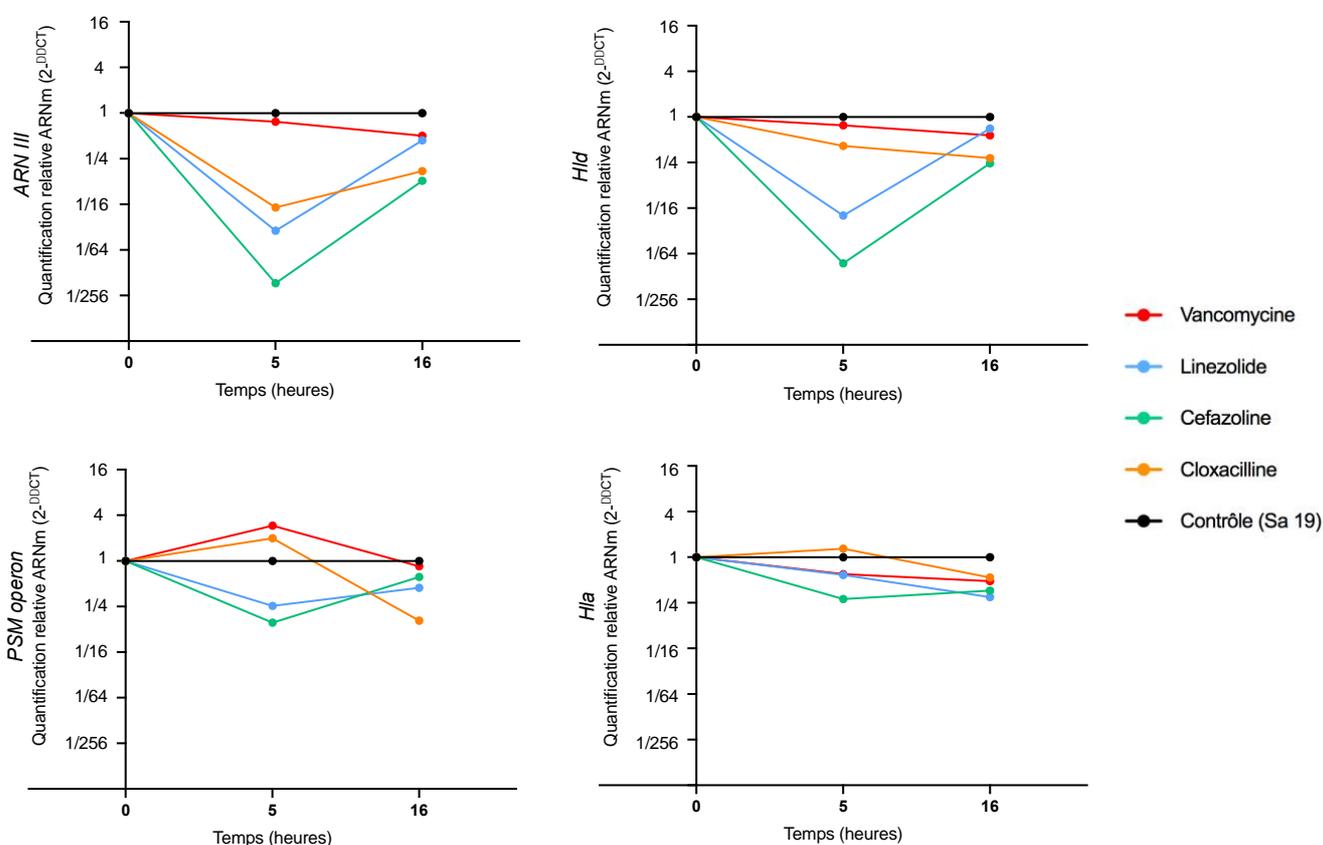


Figure 16 : Étude de l'expression des gènes *ARN III*, *hld*, *PSMoperon* et *hla* vis-à-vis de concentration sub-inhibitrices de quatre antibiotiques à 5 et 16 heures *in vitro* pour une souche d'intérêt (Sa 19). L'expression de la vancomycine est peu modifiée. Pour les β -lactamines, on observe en général une inhibition marquée à 5 heures et encore relativement importante à 16 heures de mise en contact avec la souche d'intérêt Sa19.

En résumé, à cinq heures de mise en contact avec la souche d'intérêt du groupe *agr-I*, les antibiotiques avec le plus fort pouvoir inhibiteur sur l'expression des facteurs de virulence était le linezolide et la céfazoline. A 16 heures, les β -lactamines (cefazoline et cloxacilline) avaient la plus forte activité inhibitrice. Bien que ces données nécessitent d'être confirmées *in vivo*, la céfazoline (céphalosporine de première génération) pourrait être l'antibiotique de choix pour le traitement des PAVM à *S. aureus* sensible à la méticilline du groupe *agr-I*.

DISCUSSION

L'hypothèse de ce travail était que les échecs de traitement observés dans les PAVM à *S. aureus* sensible à la méticilline étaient dus à l'hétérogénéité de la population des SASM, actuellement non prise en compte en pratique clinique courante. Nos résultats confirment que la population de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline considérée uniformément par le clinicien est en réalité une population très hétérogène. Cette diversité se traduit notamment par l'existence de plusieurs variants pour le système principal de régulation de *S. aureus* qu'est le système *agr*, dont l'un (*agr-I*) est associé à une évolution péjorative des PAVM. L'étude de l'expression *in vitro* de plusieurs facteurs de virulence majeurs de *S. aureus* montre que leur expression est plus importante et plus précoce pour les souches appartenant à ce sous-groupe *agr-I* ce qui pourrait expliquer en partie les résultats observés cliniquement. Cette expression majorée était corrélée, pour l'hémolysine delta, à la présence d'un pic caractéristique quand les souches d'intérêt étaient analysées par la technique de MALDI-TOF utilisable en routine, et qui pourrait devenir un outil pronostic utile et simple dans la prise en charge des PAVM pour le clinicien au lit du malade. Enfin, l'étude de la modulation de l'expression *in vitro* par différents antibiotiques retrouvait un effet hétérogène globalement inhibiteur même aux concentrations sub-inhibitrices testées, avec des variations importantes entre les différentes classes d'antibiotiques testées.

I) Hétérogénéité des SASM dans notre travail

La répartition des variants *agr* au sein de la population de *S. aureus* est variable selon le type d'infections et le lieu où elle est étudiée. Il est régulièrement rapporté une incidence plus importante de souches appartenant au groupe *agr*-I par rapport aux autres groupes *agr*. Toutefois, la proportion de chaque groupe *agr*, et notamment des groupes II et III, reste très variable, allant de 5% à plus de 40% (76,80,81).

La proportion de souches de SASM appartenant au groupe *agr*-I était prédominante dans notre population (40%) suivie des souches du groupe *agr*-II (30%), *agr*-III (25%) et *agr*-IV (2%).

Dans un travail récent, Gomes-Fernandes et al. ont récemment retrouvé une répartition des groupes *agr* assez proche de la nôtre dans des infections respiratoires basses principalement hospitalières dont PAVM à majorité de SASM (83,1% des souches) avec une majorité de souches à l'origine de pneumonie faisant partie du groupe *agr*-I (45,5%). Le groupe *agr*-II représentait 40,9% des souches, devant le groupe *agr*-III (9,1%) et *agr*-IV (4,5%) (76).

Dans notre travail, conformément aux données de la littérature (82), pour les souches de SASM appartenant au groupe *agr*-I, les complexes clonaux prédominants étaient le CC 8 (32%), le CC 398 (28%) et le CC 45 (20%). Pour les souches du groupe *agr*-II, les complexes CC 5 (50%), CC 15 (22%) et CC 9 (11%) prédominaient. Pour celles du groupe *agr*-III, le complexe CC 30 (87%) était principalement retrouvé. Pour l'unique souche du groupe IV, il s'agissait du complexe CC 121.

La population de *S. aureus* capable de colonisation et d'infection humaine a une structure hautement clonale dominée par une douzaine de complexes clonaux. Le génome de *S. aureus* consiste en un « core genome » ou génome invariable (75%), d'un génome variable (10%) et d'éléments génétiques mobiles (MGEs) (15%). Le *core genome* est fortement conservé entre souches de *S. aureus* et comprend des gènes de ménages ou associés à des fonctions métaboliques centrales. Le génome variable est lui strictement relié à des complexes clonaux particuliers et inclus des régulateurs de l'expression de facteurs de virulence tel que le système *agr* et des gènes codant pour des protéines de surface. Les MGEs (plasmides, phages, îlots de pathogénicité...) sont très variables selon les isolats de *S. aureus* mais restent malgré tout souvent associés avec des lignées clonales spécifiques. Les MGEs contiennent une variété de gènes codant par exemple pour des super-antigènes, des toxines exfoliative ou toxines capables de former des trous membranaires.

Tous les *S. aureus* capables de coloniser l'humain peuvent induire des infections létales. Toutefois, certains complexes clonaux tels que le clone communautaire USA300 (CC8) chez le SARM ou le

clone hospitalier CC398 (SARM ou SASM), fréquemment retrouvés ces dernières années sont caractérisés par une virulence plus importante (82).

La diversité de variants du système *agr* et de lignées clonales retrouvées dans notre travail met en lumière l'hétérogénéité des souches de SASM retrouvée dans les PAVM au CHU de Nantes qui sont, à l'heure actuelle, prises en charge de manière uniforme par le clinicien au lit du malade.

II) Association entre groupe *agr* et devenir clinique

Les patients infectés par les souches du groupe *agr*-I évoluaient plus fréquemment vers une forme grave de pneumonie et présentaient davantage d'échec de traitement en comparaison aux autres groupes *agr*. En effet, plus de la moitié des patients (53%) ayant une PAVM à *S. aureus* du groupe *agr*-I évoluaient vers une forme sévère de pneumonie (SDRA modéré à sévère) trois jours après le diagnostic contre 32,3% seulement des patients des autres groupes (χ^2 ; $p = 0,09$). De plus, 40% des patients du groupe *agr*-I présentaient un échec de traitement contre 17% pour les autres groupes (χ^2 ; $p=0,003$). Cette atteinte respiratoire plus sévère se traduisait par une durée de ventilation mécanique et de séjour en réanimation supérieure d'au moins trois jours pour le groupe *agr*-I en comparaison aux autres groupes *agr*. Bien que les différences ne soient pas significatives sur le plan statistique pour les durées de ventilation et d'hospitalisation du fait d'un effectif relativement modeste, il s'agit de données particulièrement importantes d'un point de vue clinique. En effet, l'augmentation des durées de ventilation mécanique et de séjours sont systématiquement associées à une augmentation de la morbi-mortalité et entraînent des surcoûts majeurs pour le système de santé (4,8).

Certains variant *agr* ont été associés à des infections particulières. Par exemple, les souches du groupe III sont surreprésentées dans les syndromes toxiques menstruels, alors que les souches à l'origine d'atteintes de type syndrome exfoliative et impétigo bulleux proviennent principalement du groupe IV. Dans les infections suppuratives, les endocardites sont principalement associées aux groupes *agr*-I et II (75). Les groupes III et IV sont associées avec les infections toxiques à TSST-1 (83). Sakoulas et al. ont déterminé que plus de la moitié des isolats de SARM de bactériémies appartenaient au groupe II (Sakoulas et al., 2003).

De nombreuses études chez l'animal et l'humain ont montré qu'il existait une relation entre groupe *agr* et production de clusters de facteurs de virulence, de super-antigènes ou encore capacité d'évasion immune . De même, certains complexes clonaux peuvent être associés à une pathogénicité spécifique (70,71). Dans notre travail, les souches appartenant au groupe *agr*-I était les plus représentées mais également associées à une évolution clinique plus sévère comparée aux autres

groupes *agr* ce qui, à notre connaissance, est la première description d'une pathogénicité accrue des *S. aureus* sensible à la méticilline du groupe *agr*-I dans le contexte de PAVM.

III) Association entre groupe *agr* et expression *in vitro* de la virulence

La pathogénicité des souches du groupe *agr*-I était corrélée, *in vitro*, à une expression accrue des gènes des facteurs de virulence de *S. aureus* étudiés dans notre travail dont celui de l'ARN-III, facteur de virulence et ARN régulateur clé du système de *quorum sensing* chez *S. aureus*. L'expression de l'ARN III et de l'ARN de l'hémolysine delta était significativement augmentée à 5 et à 16 heures d'incubation pour le groupe *agr*-I par rapport aux groupes II et III, suggérant une activation importante du système de *quorum sensing* et ce, de manière plus précoce qu'avec les autres groupes *agr*. Par ailleurs, l'expression de l'ARN du *PSMoperon* était également augmentée de manière significative dans le groupe *agr*-I ainsi que celle d'*AgrA*, régulateur direct de l'expression du *PSMoperon*, via un mécanisme ARN-III indépendant suggérant la encore une activation importante du système *agr*. Curieusement, alors que l'expression de *hla* est sous la dépendance du système *agr* nous n'avons pas retrouvé de variation significative de l'expression du gène *hla* selon le groupe *agr* des souches testées.

L'une des caractéristiques originales du locus *agr* est son polymorphisme au sein d'une même espèce de staphylocoque et notamment de *S. aureus*. Peu après la première description du locus par Ji et al. en 1997 (31), Jarraud et al. ont décrits les quatre allèles correspond aux quatre groupes *agr* (75). La région variable s'étend sur la moitié de la séquence de l'ARN II, couvrant une partie de la séquence du gène codant la protéine membranaire *AgrB*, l'ensemble de celle d'*AgrD* et le domaine senseur d'*AgrC* (Figure 17).

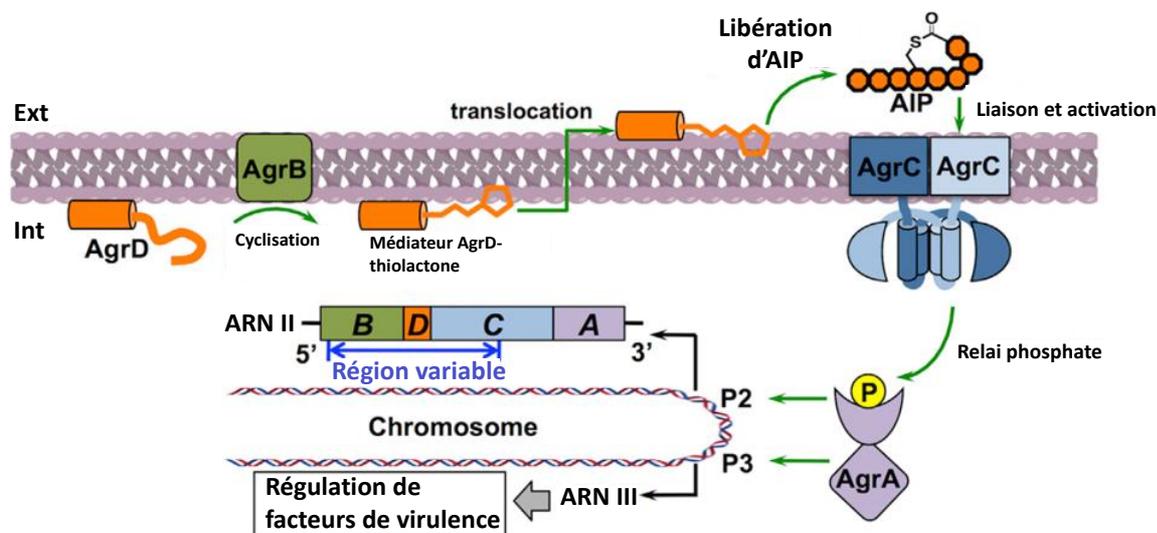


Figure 17 : Schéma simplifié du système *agr* de *S. aureus* représentant l'emplacement du domaine variable à l'origine des quatre groupes *agr*. La région variable s'étend sur la moitié de la séquence de l'ARN II, couvrant une partie de la séquence du gène codant la protéine membranaire AgrB, l'ensemble de celle d'AgrD et le domaine senseur d'AgrC.

Cette disposition permet à chaque variant *agr* de produire spécifiquement et de médier l'auto-induction de son propre AIP. Chez les souches de *S. aureus* ayant un groupe *agr* différent, la grande majorité des gènes de structures conservés (exceptés les éléments génétiques mobiles) sont quasiment identiques, suggérant une variation à l'échelle sous-spécifique. Cultivés séparément, les quatre groupes sont capables d'auto-induction de manière qualitativement similaire, mais l'auto-induction d'un système *agr* hétérologue est principalement fortement inhibitrice. De ce fait, les isolats cliniques de *S. aureus* prélevés d'un site infectieux sont en général issus d'un même groupe *agr* car une population hétérogène de *S. aureus* de groupes différents n'est pas capable de coopération (87). L'une des questions en suspens est celle de l'avantage évolutif conféré par la variation allélique du locus *agr*. Comme décrit précédemment, certains variants *agr* sont associés à des infections spécifiques mais il n'existe pas, à notre connaissance, de description de la relation entre groupe *agr* et virulence spécifique.

Dans une étude récente, Geisinger et al. ont introduits les quatre allèles *agr* séparément à un site chromosomique identique dans une souche de *S. aureus* *agr* deletée. La comparaison de ces allèles dans un environnement isogénique a révélé des différences significatives dans le contrôle temporel de l'auto-induction : l'auto-induction avait lieu plus tôt et avec une production accrue d'AIP dans les groupes I et IV en comparaison avec le groupe II et le groupe III pour lequel la réponse était la plus tardive (88). Dans notre travail, nous avons retrouvé une expression de facteurs de virulence accrue et plus précoce pour le groupe *agr*-I, qui était associée à une évolution clinique péjorative. Bien que

la littérature soit encore pauvre à ce sujet, l'activation précoce et plus intense du système *agr* pour les souches du groupe *agr*-I pourrait être la cause de leur pathogénicité spécifique.

IV) Détection de la production de delta-toxine comme outil pronostic des pneumonies de réanimation à *S. aureus*

La méthode historique pour l'évaluation de l'activité du système *agr* est le CAMP assay, qui utilise l'expression de la delta toxine comme substitut de l'ARN III et donc de la fonctionnalité du système *agr*. Cette méthode repose sur l'hémolyse synergique des globules rouges par la delta-toxine et la Béta-toxine (39,89). Malgré sa simplicité, le CAMP-assay reste un test peu sensible (76). Dans notre travail, nous avons évalué l'expression de la delta toxine et celle de l'ARN-III dans les souches de notre population par qRT-PCR (PCR quantitative en temps réel), méthode de référence mais impliquant des manipulations longues et coûteuses. Nous avons observé des profils d'expression très proches entre l'ARN-III et l'ARN de la delta-toxine, confirmant la possibilité d'utiliser l'expression de la delta-toxine comme substitut à celle de l'ARN-III pour évaluer la fonctionnalité du système *agr in vitro*.

Ces dernières années est apparue la possibilité de détecter directement la présence de la delta-toxine dans des échantillons biologiques via un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Whole-Cell Matrix Assisted Laser Désorption Ionization-Time-of-flight) (74,90). Cette méthode est disponible au laboratoire de bactériologie du CHU de Nantes, et peut être réalisée sur un prélèvement bactériologique clinique en même temps que l'identification bactériologique. Elle repose sur l'analyse spectrale d'un échantillon après ionisation par une source laser et permet à ce jour les meilleures performances pour l'identification d'un large panel de micro-organismes dont *S. aureus* (91). Gagnaire et al. ont montré que la présence d'un pic d'intensité à 3005 ± 5 Thomson (TH) ou 3035 ± 5 après 24 heures d'incubation était étroitement liée à la production de delta-toxine. Il existait une bonne corrélation entre la détection de la delta-toxine et l'expression de l'ARN-III (vérifiée par Northern-blot), permettant d'évaluer la fonctionnalité du système *agr* dont l'ARN-III est le principal effecteur, via la détection de ce pic (74).

Dans notre travail, l'expression de l'ARNm de *hld* a été évaluée pour 12 souches. 5 souches exprimaient l'ARN de l'hémolysine delta *in vitro*. Pour quatre d'entre elles on observait un pic caractéristique par la technique de MALDI-TOF. 7 souches n'exprimaient pas l'ARN de *hld in vitro*, six d'entre elles n'avaient pas de pic visible en MALDI-TOF. Ainsi, les résultats obtenus étaient concordants pour 10 souches sur 12.

Par ailleurs, sur l'ensemble des 43 souches pour lesquelles nous avons recherché la présence du pic de l'hémolysine delta, nous avons pu observer que le pic était présent chez 70% des souches à l'origine d'un SDRA sévère précoce et que 77% des souches ayant un pic positif étaient à l'origine d'un échec de traitement de la PAVM.

Bien que nos résultats nécessitent d'être confirmés sur un effectif plus large et de manière prospective, la détection du pic caractéristique de l'hémolysine delta en pratique clinique pourrait s'avérer être un élément pronostic intéressant simple et rapide à mettre en œuvre, en faveur d'une pathogénicité accrue dans les PAVM à SASM.

V) Effet hétérogène des antibiotiques sur la virulence *in vitro*

Chez *S. aureus*, l'exposition à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (β -lactames, macrolides, aminoglycosides, glycopeptides et fluoroquinolones) induit un degré d'expression d'*hla* variable (79). Plus spécifiquement, des concentrations sub-inhibitrices de β -lactames induisent une inhibition quasi-complète de la production d' α -toxine (92), alors que les macrolides et aminoglycosides induisent une inhibition partielle. Les glycopeptides ont généralement peu d'effet et les fluoroquinolones induisent une expression discrètement augmentée (79,92). Concernant le linezolide, plusieurs études ont montré sa capacité à inhiber l'expression de plusieurs facteurs de virulence dont l'hémolysine A, l'hémolysine delta ou les PSMs (93–95).

Par ailleurs, Jin et al. ont montré que des concentrations sub-inhibitrices de mupirocine, un antibiotique topique utilisé notamment dans la décolonisation de patients à risque de portage de SARM, réduisaient considérablement le niveau d'expression des ARNm de d'*hla*, gène codant pour l'hémolysine A, chez des souches de SARM pourtant résistantes à cet antibiotique. La production d'hémolysine était ainsi diminuée. Les niveaux d'expression des ARNm de l'ARN-III, *saerR* et *sarA* (deux molécules également impliquées dans la régulation de la pathogénicité de *S. aureus*) étaient également diminués, suggérant un rôle modulateur de la mupirocine indépendant de la résistance de la souche à l'antibiotique (78). Concernant la clindamycine, les résultats de travaux antérieurs sont contradictoires, une étude retrouvant un effet fortement stimulateur sur l'activité du système *agr* qui n'était pas retrouvé dans un travail antérieur (60,77).

Pour la souche d'intérêt de notre travail, appartenant au groupe *agr*-I le plus pathogène, nous avons retrouvé une inhibition très modeste par la vancomycine sur l'expression des facteurs de virulence étudiés. L'expression du PSM opéron était même augmentée à 5 heures de mise en contact avec cet antibiotique. Concernant le linezolide, son action était inhibitrice de manière précoce à 5 heures de mise en contact avec la souche d'intérêt mais quasiment similaire au contrôle à 16 heures.

Les β -lactamines semblaient avoir l'activité inhibitrice la plus importante parmi les antibiotiques étudiés, notamment la cloxacilline et la céfazoline qui inhibaient l'expression des facteurs de virulence de manière marquée à 16 heures de mis en contact (expression des facteurs de virulence environ quatre fois inférieure). La cefazoline avait l'action inhibitrice la plus constante au cours du temps (action également fortement inhibitrice à cinq heures de mise en contact).

Notre travail met en lumière l'effet hétérogène des antibiotiques sur l'expression de plusieurs facteurs de virulence, même à des concentrations sub-inhibitrices non bactéricide et met en lumière les capacités inhibitrices de la cefazoline sur l'expression de plusieurs de facteurs de virulence, ce qui pourrait en faire l'antibiotique de choix pour traiter les infections à SASM du groupe *agr*-I.

VI) Limites

Notre travail présente plusieurs limites. Tout d'abord, bien qu'une partie des données (notamment les durées de séjour, la mortalité, les germes retrouvés) aient été recueillis à l'aide d'une cohorte prospective (cohorte ATLANTREA), de nombreux paramètres cliniques ont été recueillis de manière rétrospective à partir des dossiers médicaux des patients. De plus, le nombre total de patients reste assez modeste et il s'agit uniquement de patients hospitalisés dans le cadre d'une atteinte neurologique sévère, à l'origine d'un biais de sélection pouvant fausser l'analyse de certains paramètres tel que la mortalité. Par ailleurs, l'ensemble des manipulations *in vitro* n'a pas pu être réalisée pour tous les patients. Chez 15 patients notamment, il n'a pas été possible de réaliser le test d'hémolyse- α du fait de difficultés d'approvisionnement pour certains réactifs nécessaires à la manipulation. De même, l'étude de l'expression des ARN d'intérêt de *S. aureus* a été mise au point et réalisée pour la première fois dans le laboratoire IRS 2 pour ce travail et a nécessité de nombreuses modifications avant de pouvoir être réalisée en routine. Chaque manipulation est longue et coûteuse ce qui a imposé de restreindre le nombre d'échantillons étudiés. Enfin, l'étude de l'expression des gènes a été réalisée *in vitro*, ce qui limite l'extrapolation possible de nos résultats et nécessite de les confirmer sur un modèle animal.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats confirment en premier lieu que la population de *S. aureus* sensible à la méticilline actuellement prise en compte de façon uniforme par le clinicien, est en réalité très hétérogène. En effet, au sein de prélèvements respiratoires d'une population de patients neuro-lésés issu du même centre hospitalier, nous avons observé une diversité génétique importante, notamment dans l'existence de variants pour le système principal de régulation de la coopération bactérienne et de la virulence qu'est le système *agr*. Dans notre population, la majorité des souches de SASM appartenaient au groupe *agr*-I. Ce groupe était associé à des épisodes de pneumonies acquises sous ventilation mécanique plus sévères et présentant un taux d'échec supérieur à ceux des autres groupes *agr*, impliquant des durées de séjour en réanimation et à l'hôpital augmentées. Par ailleurs, l'étude de l'expression de plusieurs facteurs de virulence majeurs de *S. aureus in vitro*, à l'aide d'un protocole d'extraction d'ARN spécialement adapté pour ce travail, a permis de mettre en évidence que l'expression de ces facteurs était plus intense et plus précoce pour les souches de SASM appartenant au groupe *agr*-I, pouvant expliquer en partie les résultats observés. Par ailleurs, nous avons montré qu'il semble possible d'utiliser la technologie de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF comme élément pronostic des PAVM de réanimation facilement utilisable en routine.

Notre travail ouvre plusieurs perspectives. Concernant la technologie de MALDI-TOF, actuellement utilisée en routine pour l'identification microbiologique des prélèvements cliniques, il est possible d'imaginer dans un futur proche pouvoir détecter rapidement la présence de delta toxine dans le prélèvement respiratoire dès l'identification d'un SASM réalisée. La présence de la delta toxine pourrait devenir un marqueur pronostic d'une pathogénicité accrue et permettrait d'apporter un élément supplémentaire dans la stratégie thérapeutique. Ainsi, il pourrait être choisi de traiter plus longtemps une pneumonie à SASM à delta toxine positive car plus à risque de récurrence. A l'inverse, une infection à une souche n'ayant pas de delta toxine retrouvée en MALDI-TOF pourrait être traitée de manière plus courte, voire non traitée s'il n'existe aucun critère de gravité clinique, et participer ainsi à une plus grande écologie en termes d'antibiothérapie.

De plus, il a été montré que la technique de MALDI-TOF permettait également d'identifier la lignée clonale d'une souche de SASM. Dans leur travail, Josten et al. ont montré qu'il était possible de différencier plusieurs complexes clonaux principaux de *S. aureus* (CC5, CC22, CC8, CC45, CC30 et CC1) (96) dont deux (CC8 et CC45) sont strictement associés au groupe *agr*-I le plus pathogène,

apportant là encore, un élément diagnostique et pronostic important au vu de la pathogénicité associée à certaines lignées clonales.

Concernant le système *agr*, du fait de son importance dans la régulation de la production de facteurs de virulence, celui-ci a fait l'objet de recherches importantes afin de trouver des thérapeutiques adjuvantes ou alternatives aux antibiotiques. Les thérapeutiques à l'étude qui tentent de bloquer ou d'inhiber partiellement le système *agr* sont regroupées sous le terme de « *quorum quenching* » et visent plusieurs sites stratégiques du système *agr*. La protéine histidine kinase AgrA, notamment, du fait de son rôle clé dans l'activation du système *agr* est une cible de choix. Plusieurs études ont montré que la virulence de souches de *S. aureus* pouvait être atténuée en utilisant des molécules capables d'empêcher la fixation d'AgrA aux promoteurs P2 et P3 (97,98). Des molécules bloquant l'action des protéines AgrB, AgrC et AgrD sont également à l'étude (99).

Par ailleurs, l'ARN III, principal effecteur du système *agr*, responsable de l'expression d'un grand nombre de gènes de virulence, est une autre cible de choix. Plusieurs travaux ont abouti à la mise au point de peptides inhibiteurs de l'ARN III, inhibant sa transcription et permettant de réduire l'adhérence du *S. aureus* aux cellules, de prévenir la formation de biofilm ou encore d'augmenter la survie lors d'un sepsis sur un modèle murin (100,101). Toutefois, du fait d'une clairance rénale rapide, la demi-vie de ces peptides *in vivo* est courte ce qui limite pour l'instant leur application clinique (102). Des peptides modifiés ayant une stabilité et une activité plus importante *in vivo* sont en cours de développement et représentent une piste sérieuse pour le traitement futur des infections à *S. aureus* (103).

Une voie supplémentaire majeure de recherche provient de la découverte de la capacité de certains métabolites secondaires à interférer avec les signaux bactériens, et notamment avec les peptides auto-inducteurs (Auto-Inducing Peptides ou AIPs) du système *agr*. Certains AIPs d'autres espèces staphylococciques sont capables de réprimer la fonction du système *agr* de *S. aureus*. Il semble ainsi possible d'utiliser un AIP d'une souche de staphylocoque non pathogène pour inhiber le système *agr* d'une souche pathogène lors d'une infection (104). Par exemple, le surnageant de culture d'isolats de *Staphylococcus schleiferi* présente une capacité inhibitrice contre le système *agr* de *S. aureus* et est efficace contre l'ensemble des quatre groupes *agr*. L'expression de nombreux gènes de facteurs de virulence est également inhibée lorsque *S. aureus* et *S. schleiferi* sont co-inoculés *in vivo*. Des gènes contribuant à la colonisation et la virulence régulés par *agr* sont également inhibés lors de co-cultures *in vitro* entre *S. aureus* et des souches de corynebactéries (105). Par ailleurs, le système *agr* de *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) sont mutuellement inhibiteurs. Les AIPs de *S.*

aureus appartenant au groupe I, II et III sont tous inhibés par l'AIP de *S. epidermidis* alors que le système *agr* de *S. epidermidis* est inhibé par l'AIP de *S. aureus* du groupe IV. De plus, comme évoqué dans le chapitre d'introduction, un AIP d'un groupe *agr* peut inhiber un AIP d'un autre groupe *agr*. Ainsi, il a été montré que l'AIP de *S. aureus* du groupe II prévenait la formation d'abcès causé par un *S. aureus* du groupe I dans un modèle murin (46). Les AIP-I, -II, -III et leurs analogues ont été utilisés avec succès comme agents bloqueurs de l'auto-induction du *quorum sensing* dans les quatre sous-groupes *agr* de *S. aureus* (106,107).

Enfin, des stratégies qui antagonisent directement les toxines produites par la bactérie pourraient aider à prévenir et traiter des infections à *S. aureus*. Les toxines codées par le *core genome* telles que les PSMs, dont la virulence est majeure et dont la séquence génétique est hautement conservée entre souches de *S. aureus*, sont une des cibles prioritaire dans le développement d'anticorps neutralisants (108). De même, des anticorps monoclonaux dirigés contre l'hémolysine- α ont montré leur efficacité dans la protection contre l'infection à *S. aureus* dans plusieurs modèles animaux de pneumonie et de sepsis (109,110).

Ainsi, il est possible d'imaginer à moyen terme, pouvoir identifier rapidement la lignée clonale et le groupe *agr* d'une souche de *S. aureus* ainsi que le type de toxines qu'il est capable de sécréter afin de mettre rapidement en œuvre un arsenal de thérapeutiques (peptides auto-inducteurs inhibiteurs, *quorum quenchers*, anticorps antitoxiniques) de manière adjonctive ou alternative à l'antibiothérapie. Dans le contexte d'augmentation mondiale actuelle et future attendue de la résistance aux antibiotiques, ces thérapeutiques spécifiques sont un espoir important d'améliorer la prise en charge des malades infectés par *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline.

En conclusion, notre travail montre que la population de SASM est une population hétérogène dont les variants appartenant au groupe *agr*-I sont pourvoyeurs de PAVM plus sévères avec plus d'échecs de traitement, en lien avec une expression accrue et intense du système de régulation *agr*. Notre travail souligne également l'intérêt de la détection de l'hémolysine delta par MALDI-TOF comme facteur pronostic des PAVM à SASM et la supériorité potentielle de la céfazoline pour le traitement des PAVM à *S. aureus* sensible à la méticilline du groupe *agr*-I.

Liste des abréviations utilisées

<i>agr</i>	Accessory Gene Regulator
CC	Complexe clonal
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CHU	Centre hospitalo-universitaire
HAP	Health-care associated pneumonia
Hla / <i>Hla</i>	Hémolysine α ou alpha toxine (protéine) / Hémolyse α (gène)
Hld / <i>Hld</i>	Hémolysine delta ou delta toxine (protéine) / Hémolysine delta (gène)
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption Ionization – Time Of Flight
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
AIPs / PAIs	Auto-inducing Peptides / Peptides auto-inducteurs
PAVM	Pneumonie acquise sous ventilation mécanique
PSMs	Phenol-Soluble modulins
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aigüe
SOFA (score)	Sequential Organ Failure Assessment
SARM	Staphylococcus aureus résistant à la meticilline
SASM	Staphylococcus aureus sensible à la meticiline

Index des figures

- Figure 1 :** Organisation générale du système *agr* de *quorum sensing* chez *S. aureus*
- Figure 2 :** Interaction et cross-inhibition entre peptides auto-inductibles des quatre groupes *agr*
- Figure 3 :** Propriétés biologiques des Phenol Soluble Modulins (PSMs)
- Figure 4 :** Représentation schématique d'une réaction de PCR
- Figure 5 :** Vitesse de croissance moyenne des souches appartenant à chaque groupe *agr*
- Figure 5 :** Répartition des variants *agr* au sein de la population étudiée
- Figure 6 :** Atteinte respiratoire évaluée par le ratio PaO₂/FiO₂ selon hémolyse α *in vitro* pour chaque souche à J1
- Figure 7 :** Répartition des complexes clonaux dans les 60 souches étudiées
- Figure 8 :** Répartition des complexes clonaux au sein des groupes *agr*
- Figure 9 :** Expression relative des quatre gènes *ARN III*, *hld*, *PSMoperon*, *AgrA*, *Hla* selon le groupe *agr* au cours du temps *in vitro*
- Figure 10 :** Sévérité clinique selon le groupe *agr*
- Figure 11 :** Pourcentage de patients présentant un SDRA sévère selon le groupe *agr* le jour du diagnostic de PAVM
- Figure 12 :** SDRA modérés et sévères selon le groupe *agr* après trois jours d'évolution de la pneumonie
- Figure 13 :** Comparaison des ratios Pao₂/Fio₂ moyen selon le groupe *agr* à J1 et J3
- Figure 14 :** Échec de traitement selon le groupe *agr*
- Figure 15 :** Analyse d'une souche de SASM de notre cohorte (Sa 42) au spectromètre de masse par la technique de MALDI-TOF
- Figure 16 :** Étude de l'expression des gènes *ARN III*, *hld*, *PSMoperon* et *hla* vis-à-vis de concentration sub-inhibitrices de quatre antibiotiques à 5 et 16 heures *in vitro* pour une souche d'intérêt (Sa 19)
- Figure 17 :** Schéma simplifié du système *agr* de *S. aureus* représentant l'emplacement du domaine variable à l'origine des quatre groupes *agr*

Index des tableaux

Tableau I : Critères cliniques, biologiques et radiologiques pour le diagnostic de Pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM)

Tableau II : Amorces correspondant aux 7 gènes de ménage permettant le classement épidémiologique des *S. aureus* par MLST (Multi-Locus Sequence Typing)

Tableau III : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes des facteurs de virulence et de de l'histidine kinase AgrA du système de *quorum sensing* de *S. aureus* étudiés dans ce travail

Tableau IV : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population de patients étudiée

Tableau V : Caractéristiques des épisodes de PAVM

Tableau VI : Caractéristiques cliniques des infections et CMI aux antibiotiques des souches dont l'expression de gènes d'intérêt a été étudiée *in vitro*

Tableau VII : Résultats de l'analyse des 12 souches d'intérêt par la technique de MALDI-TOF

Tableau VIII : Nombre de souches de SASM à l'origine d'un SDRA sévère ou d'une pneumonie non grave à J1 selon la présence ou non du pic caractéristique de l'hémolysine delta retrouvé en MALDI-TOF

Tableau IX : Nombre de souches de SASM à l'origine ou non d'un SDRA modéré à sévère entre J3 et J7 après diagnostic initial selon la présence ou non du pic caractéristique de l'hémolysine delta retrouvé en MALDI-TOF

Tableau X : Nombre de souches de SASM à l'origine ou non d'un échec de traitement selon la présence ou non du pic caractéristique de l'hémolysine delta retrouvé en MALDI-TOF

Annexe : Score SOFA

SOFA		0	1	2	3	4
Cardio-vasc	PAM (mmHg) Traitement (µg/kg/min)	≥ 70 ∅	< 70 ∅	Dopa ≤ 5 Dobu	Dopa > 5 Adré ≤ 0,1 NA ≤ 0,1	Dopa > 15 Adré > 0,1 NA > 0,1
Respi	PaO ₂ /FiO ₂ VM	> 400 ∅	301- 400 ∅	201- 300 ∅	101- 200 +	≤ 100 +
Neuro	GCS	15	13 -14	10 -12	6 - 9	< 6
Reins	Créatininémie (µmol/L) Diurèse (ml/j)	< 110 > 500	110 -170 > 500	171 – 299 > 500	300- 440 <i>ou</i> < 500	> 440 <i>ou</i> < 200
Foie	Bilirubine (mmol/L)	< 20	20-32	33-101	102 - 204	> 204
Coag	Plaquettes (10 ³ /mm ³)	> 150	101-150	51-100	21-50	≤ 20

Score de sévérité clinique SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score) (111)

Bibliographie

1. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Sep 1;63(5):e61–111.
2. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauter S, Gibot S, et al. Hospital-acquired pneumonia in ICU. *Anaesth Crit Care Pain Med*. 2018 Feb;37(1):83–98.
3. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *Eur Respir J*. 2017 Sep 1;50(3):1700582.
4. Timsit J-F, Esaied W, Neuville M, Bouadma L, Mourvillier B. Update on ventilator-associated pneumonia. *F1000Research* [Internet]. 2017 Nov 29 [cited 2019 Aug 26];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5710313/>
5. Barbier F, Andreumont A, Wolff M, Bouadma L. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2013 May;19(3):216–28.
6. Bouadma L, Sonnevile R, Garrouste-Orgeas M, Darmon M, Souweine B, Voiriot G, et al. Ventilator-Associated Events: Prevalence, Outcome, and Relationship With Ventilator-Associated Pneumonia. *Crit Care Med*. 2015 Sep;43(9):1798–806.
7. Branch-Elliman W, Wright SB, Howell MD. Determining the Ideal Strategy for Ventilator-associated Pneumonia Prevention. Cost-Benefit Analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Jul 1;192(1):57–63.
8. Warren DK, Shukla SJ, Olsen MA, Kollef MH, Hollenbeak CS, Cox MJ, et al. Outcome and attributable cost of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center. *Crit Care Med*. 2003 May;31(5):1312–7.
9. Park DR. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care*. 2005 Jun;50(6):742–63; discussion 763-765.
10. Vazquez Guillamet C, Kollef MH. Is Zero Ventilator-Associated Pneumonia Achievable?: Practical Approaches to Ventilator-Associated Pneumonia Prevention. *Clin Chest Med*. 2018;39(4):809–22.
11. Martin-Loeches I, Torres A, Rinaudo M, Terraneo S, de Rosa F, Ramirez P, et al. Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and

Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organisms. *J Infect.* 2015 Mar;70(3):213–22.

12. Nguile-Makao M, Zahar J-R, Français A, Tabah A, Garrouste-Orgeas M, Allaouchiche B, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: respective impact of main characteristics at ICU admission and VAP onset using conditional logistic regression and multi-state models. *Intensive Care Med.* 2010 May;36(5):781–9.

13. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Dowzicky M, Babinchak T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004–2009. *Int J Antimicrob Agents.* 2011 Mar 1;37(3):219–24.

14. Rubinstein E, Lalani T, Corey GR, Kanafani ZA, Nannini EC, Rocha MG, et al. Telavancin versus vancomycin for hospital-acquired pneumonia due to gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2011 Jan 1;52(1):31–40.

15. Wunderink RG, Niederman MS, Kollef MH, Shorr AF, Kunkel MJ, Baruch A, et al. Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012 Mar 1;54(5):621–9.

16. Ramirez J, Dartois N, Gandjini H, Yan JL, Korth-Bradley J, McGovern PC. Randomized phase 2 trial to evaluate the clinical efficacy of two high-dosage tigecycline regimens versus imipenem-cilastatin for treatment of hospital-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1756–62.

17. Awad SS, Rodriguez AH, Chuang Y-C, Marjanek Z, Pareigis AJ, Reis G, et al. A phase 3 randomized double-blind comparison of ceftobiprole medocaril versus ceftazidime plus linezolid for the treatment of hospital-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2014 Jul 1;59(1):51–61.

18. Chalmers JD, Taylor JK, Singanayagam A, Fleming GB, Akram AR, Mandal P, et al. Epidemiology, antibiotic therapy, and clinical outcomes in health care-associated pneumonia: a UK cohort study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2011 Jul 15;53(2):107–13.

19. Vallés J, Martin-Loeches I, Torres A, Diaz E, Seijas I, López MJ, et al. Epidemiology, antibiotic therapy and clinical outcomes of healthcare-associated pneumonia in critically ill patients: a Spanish cohort study. *Intensive Care Med.* 2014 Apr;40(4):572–81.

20. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med.* 1998 Aug 20;339(8):520–32.

21. Kennedy AD, Otto M, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Mathema B, et al. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 29;105(4):1327–32.

22. DeLeo FR, Kennedy AD, Chen L, Wardenburg JB, Kobayashi SD, Mathema B, et al. Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 1;108(44):18091–6.

23. Laabei M, Recker M, Rudkin JK, Aldeljawi M, Gulay Z, Sloan TJ, et al. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. *Genome Res.* 2014 May;24(5):839–49.

24. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr*. 2018;6(1).
25. Yang X, Yu S, Wu Q, Zhang J, Wu S, Rong D. Multilocus Sequence Typing and Virulence-Associated Gene Profile Analysis of *Staphylococcus aureus* Isolates From Retail Ready-to-Eat Food in China. *Front Microbiol*. 2018;9:197.
26. Muenks CE, Hogan PG, Wang JW, Eisenstein KA, Burnham C-AD, Fritz SA. Diversity of *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Various Niches of the Human Body. *J Infect*. 2016 Jun;72(6):698–705.
27. 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 Dec;5(12):751–62.
28. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*. 2003 Jun;48(6):1429–49.
29. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*. 2008;42:541–64.
30. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*. 2004 Mar;186(6):1838–50.
31. Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2027–30.
32. Zhang L, Gray L, Novick RP, Ji G. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):34736–42.
33. Ji G, Beavis RC, Novick RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12055–9.
34. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach T-HL, Khan BA, Sturdevant DE, et al. RNAlII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell*. 2008 Oct 10;32(1):150–8.
35. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1988 Sep;170(9):4365–72.
36. Srivastava SK, Rajasree K, Fasim A, Arakere G, Gopal B. Influence of the AgrC-AgrA complex on the response time of *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *J Bacteriol*. 2014 Aug;196(15):2876–88.
37. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Novick RP, Venkataraman L, Wennersten C, et al. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (agr) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? *J Infect Dis*. 2003 Mar 15;187(6):929–

38.

38. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 1993 Oct;12(10):3967–75.

39. Janzon L, Löfdahl S, Arvidson S. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet MGG.* 1989 Nov;219(3):480–5.

40. Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* 2007 Jun 1;21(11):1353–66.

41. McNamara PJ, Milligan-Monroe KC, Khalili S, Proctor RA. Identification, Cloning, and Initial Characterization of rot, a Locus Encoding a Regulator of Virulence Factor Expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(11):3197–203.

42. Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, et al. Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot. *J Bacteriol.* 2003 Jan;185(2):610–9.

43. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* 1995 Sep 15;14(18):4569–77.

44. Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, et al. Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest.* 1994 Nov;94(5):1815–22.

45. Cheung GYC, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun.* 2011 May;79(5):1927–35.

46. Wright JS, Jin R, Novick RP. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 1;102(5):1691–6.

47. Bubeck Wardenburg J, Patel RJ, Schneewind O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun.* 2007 Feb;75(2):1040–4.

48. Heyer G, Saba S, Adamo R, Rush W, Soong G, Cheung A, et al. *Staphylococcus aureus* agr and sarA Functions Are Required for Invasive Infection but Not Inflammatory Responses in the Lung. *Infect Immun.* 2002 Jan;70(1):127–33.

49. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. Importance of the Global Regulators Agr and SaeRS in the Pathogenesis of CA-MRSA USA300 Infection. *PLOS ONE.* 2010 Dec 2;5(12):e15177.

50. Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, Rydén C, Tarkowski A. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun.* 1993

Sep;61(9):3879–85.

51. Gillaspay AF, Hickmon SG, Skinner RA, Thomas JR, Nelson CL, Smeltzer MS. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun*. 1995 Sep;63(9):3373–80.
52. Periasamy S, Joo H-S, Duong AC, Bach T-HL, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 24;109(4):1281–6.
53. Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2000 Dec;182(6):1688–93.
54. Wang R, Khan BA, Cheung GYC, Bach T-HL, Jameson-Lee M, Kong K-F, et al. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest*. 2011 Jan;121(1):238–48.
55. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins*. 2013 Jun 13;5(6):1140–66.
56. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis*. 2011 Sep 15;204(6):937–41.
57. Powers ME, Kim HK, Wang Y, Bubeck Wardenburg J. ADAM10 Mediates Vascular Injury Induced by *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin. *J Infect Dis*. 2012 Aug 1;206(3):352–6.
58. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, et al. α -Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Nov 15;190(10):1139–48.
59. Cheung GYC, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus phenol-soluble modulins*: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect*. 2012 Apr;14(4):380–6.
60. Joo H-S, Cheung GYC, Otto M. Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulin derivatives. *J Biol Chem*. 2011 Mar 18;286(11):8933–40.
61. Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002744.
62. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach T-HL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*. 2007 Dec;13(12):1510–4.
63. Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, et al. PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. *PLoS*

One. 2013;8(5):e63176.

64. Cassat JE, Hammer ND, Campbell JP, Benson MA, Perrien DS, Mrak LN, et al. A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *Cell Host Microbe*. 2013 Jun 12;13(6):759–72.

65. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1008–15.

66. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med*. 2010 Jan 12;7(1):e1000215.

67. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Sep;7(9):629–41.

68. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Sep;64(3):441–6.

69. Bouiller K, Gbaguidi-Haore H, Hocquet D, Cholley P, Bertrand X, Chirouze C. Clonal complex 398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections are associated with high mortality. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 Dec 27]; Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01306032>

70. Sauget M, Bouiller K, Richard M, Chagrot J, Cholley P, Hocquet D, et al. Increasing incidence of bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 in a French hospital between 2010 and 2017. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2019 Aug 1;

71. Holtfreter S, Grumann D, Schmutte M, Nguyen HTT, Eichler P, Strommenger B, et al. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2669–80.

72. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526–33.

73. Papazian L, Aubron C, Brochard L, Chiche J-D, Combes A, Dreyfuss D, et al. Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care*. 2019 Jun 13;9(1):69.

74. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydière A-M, Ader F, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLOS ONE*. 2012 Jul 6;7(7):e40660.

75. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):631–41.

76. Gomes-Fernandes M, Laabei M, Pagan N, Hidalgo J, Molinos S, Villar Hernandez R, et al. Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 Apr 14 [cited 2018 Apr 25];12(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5391941/>
77. Herbert S, Barry P, Novick RP. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):2996–3003.
78. Jin Y, Li M, Shang Y, Liu L, Shen X, Lv Z, et al. Sub-Inhibitory Concentrations of Mupirocin Strongly Inhibit Alpha-Toxin Production in High-Level Mupirocin-Resistant MRSA by Down-Regulating *agr*, *saeRS*, and *sarA*. *Front Microbiol*. 2018;9:993.
79. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller K-P, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. Effects of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Alpha-Toxin (*hla*) Gene Expression of Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Nov;42(11):2817–23.
80. van Leeuwen W, van Nieuwenhuizen W, Gijzen C, Verbrugh H, van Belkum A. Population studies of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a staphylococcal autoinducer peptide. *J Bacteriol*. 2000 Oct;182(20):5721–9.
81. Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, et al. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. *J Clin Microbiol*. 2003 Jan;41(1):456–9.
82. Holtfreter S, Grumann D, Balau V, Barwich A, Kolata J, Goehler A, et al. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the General Population in Northeast Germany: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0). *J Clin Microbiol*. 2016;54(11):2774–85.
83. Gomes AR, Vinga S, Zavolan M, de Lencastre H. Analysis of the Genetic Variability of Virulence-Related Loci in Epidemic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jan;49(1):366–79.
84. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Association between the accessory gene regulator (*agr*) locus and the presence of superantigen genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes*. 2019 Mar 12;12(1):130.
85. Thompson TA, Brown PD. Association between the *agr* locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2017 Jan;54:72–6.
86. Zhang Y, Xu D, Shi L, Cai R, Li C, Yan H. Association Between *agr* Type, Virulence Factors, Biofilm Formation and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates From Pork Production. *Front Microbiol*. 2018;9:1876.
87. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiol Read Engl*. 2008 Aug;154(Pt 8):2265–74.

88. Geisinger E, Chen J, Novick RP. Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2012 Jun;194(11):2854–64.
89. Elek SD, Levy E. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J Pathol Bacteriol.* 1950 Oct;62(4):541–54.
90. Otto M, Götz F. Analysis of quorum sensing activity in staphylococci by RP-HPLC of staphylococcal delta-toxin. *BioTechniques.* 2000 Jun;28(6):1088, 1090, 1092, 1096.
91. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2009 Aug 15;49(4):543–51.
92. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jul;68(7):1524–32.
93. Bernardo K, Pakulat N, Fler S, Schnaith A, Utermöhlen O, Krut O, et al. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Feb;48(2):546–55.
94. Gemmell CG, Ford CW. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Nov;50(5):665–72.
95. Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2007 Jan 15;195(2):202–11.
96. Josten M, Reif M, Szekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K, et al. Analysis of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum of *Staphylococcus aureus* Identifies Mutations That Allow Differentiation of the Main Clonal Lineages. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1809–17.
97. Kong C, Neoh H, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins.* 2016 Mar 15;8(3).
98. Sully EK, Malachowa N, Elmore BO, Alexander SM, Femling JK, Gray BM, et al. Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PLoS Pathog.* 2014 Jun;10(6):e1004174.
99. Wang B, Muir TW. Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and remaining puzzles. *Cell Chem Biol.* 2016 Feb 18;23(2):214–24.
100. Gov Y, Bitler A, Dell’Acqua G, Torres JV, Balaban N. RNAlII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. *Peptides.* 2001 Oct;22(10):1609–20.

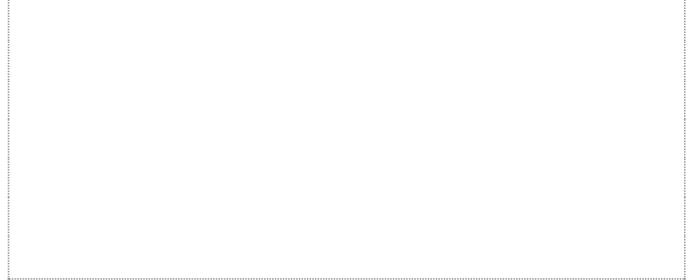
101. Ma B, Zhou Y, Li M, Yu Q, Xue X, Li Z, et al. RIP-V improves murine survival in a sepsis model by down-regulating RNAlII expression and α -hemolysin release of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm*. 2015 Feb;70(2):81–7.
102. Werle M, Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*. 2006 Jun;30(4):351–67.
103. Zhou Y, Zhao R, Ma B, Gao H, Xue X, Qu D, et al. Oligomerization of RNAlII-Inhibiting Peptide Inhibits Adherence and Biofilm Formation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo. *Microb Drug Resist Larchmt N*. 2016 Apr;22(3):193–201.
104. Jabbari S, King JR, Williams P. Cross-strain quorum sensing inhibition by *Staphylococcus aureus*. Part 1: A spatially homogeneous model. *Bull Math Biol*. 2012 Jun;74(6):1292–325.
105. Ramsey MM, Freire MO, Gabriliska RA, Rumbaugh KP, Lemon KP. *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to *Corynebacterium* Species. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2020 Jan 3];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01230/full>
106. Otto M, Echner H, Voelter W, Götz F. Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1957–60.
107. Tal-Gan Y, Ivancic M, Cornilescu G, Yang T, Blackwell HE. Highly Stable, Amide-Bridged Autoinducing Peptide Analogues that Strongly Inhibit the AgrC Quorum Sensing Receptor in *Staphylococcus aureus*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 25;55(31):8913–7.
108. Cheung GYC, Otto M. The potential use of toxin antibodies as a strategy for controlling acute *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Jun;16(6):601–12.
109. Hua L, Hilliard JJ, Shi Y, Tkaczyk C, Cheng LI, Yu X, et al. Assessment of an anti-alpha-toxin monoclonal antibody for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):1108–17.
110. Rouha H, Weber S, Janesch P, Maierhofer B, Gross K, Dolezilkoval I, et al. Disarming *Staphylococcus aureus* from destroying human cells by simultaneously neutralizing six cytotoxins with two human monoclonal antibodies. *Virulence*. 2018 01;9(1):231–47.
111. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996 Jul;22(7):707–10.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis 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. Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu 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.

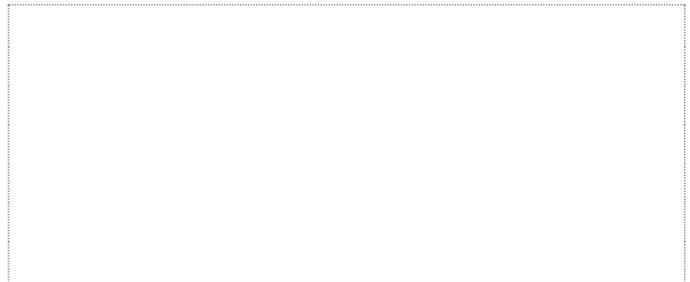
Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés. J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)



Professeur Karim Asehnoune

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)



Professeur Antoine Roquilly

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET

NOM / PRENOM : MULLER Damien

Titre de Thèse : Impact de l'Hétérogénéité des souches de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline sur le devenir des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique.

RESUME

Introduction : Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) représentent la première cause d'infection nosocomiale dans les services de réanimation et sont associées à une morbi-mortalité majeure. *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM) en est fréquemment responsable. Sa pathogénicité repose en grande partie sur son principal système régulateur *agr* (Accessory Gene Regulator). Quatre variants *agr*-I, II, III et IV caractérisent la population de SASM. L'hypothèse principale de ce travail était que l'hétérogénéité de la population de SASM est à l'origine d'échecs de traitement des PAVM.

Méthodes : Les données cliniques de 53 patients neuro-lésés hospitalisés dans deux services de réanimation du CHU de Nantes ayant développé une PAVM à SASM ont été recueillies rétrospectivement. 60 souches de SASM à l'origine de PAVM chez ces patients ont été caractérisées pour leur groupe *agr* et l'expression de plusieurs facteurs de virulence de *S. aureus* étudiée *in vitro* par PCR en temps réel. La détection de l'hémolysine delta par MALDI-TOF a été évaluée pour son apport pronostic dans ces infections. **Résultats** Les SASM du groupe *agr*-I était à l'origine de PAVM évoluant plus sévèrement (53% de SDRA tardifs modérés à sévères contre 32,3% pour les autres groupes, $p=0,09$) avec plus d'échecs de traitement (40% contre 17% pour les autres groupes, $p=0,003$), induisant des durées de séjours hospitalier prolongées de plus de 3 jours par rapport aux autres groupes. Cette pathogénicité était corrélée à une expression précoce et intense du système *agr*. La détection de l'hémolysine delta par MALDI-TOF était corrélée l'expression de l'hémolysine delta *in vitro* et avait sensibilité de 70% pour prédire les SDRA précoces et 77% pour prédire l'échec de traitement **Conclusion** La population de SASM est très hétérogène. Les souches de SASM du groupe *agr*-I ont une pathogénicité accrue dans les PAVM en lien avec une expression accrue du système *agr*. La technique de MALDI-TOF est prometteuse pour le pronostic de ces infections.

MOTS-CLES

Staphylococcus aureus sensible à la méticilline

Pneumonie acquise sous ventilation mécanique

Syndrome de détresse respiratoire aiguë

quorum sensing

accessory gene regulator

Hémolysine delta

MALDI-TOF