

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE



Année 2005



Thèse N° 325

**INCIDENCE DES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE SENSIBILITE
DIMINUEE AUX GLYCOPEPTIDES A L'HOPITAL HAUT LEVEQUE
DE BORDEAUX (NOVEMBRE 2004 – AVRIL 2005)**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement

le 5 octobre 2005 à Bordeaux

par

Christine MORATE

Née le 26 février 1977 à Toulouse

Directrice de thèse
Madame le Docteur J. MAUGEIN

JURY

Madame le Professeur M.C. SAUX
Madame le Professeur C. BEBEAR
Madame le Professeur M.C. PLOY
Madame le Professeur S. ROGEZ

Présidente
Juge
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
ODART Nicole	PHARMACODYNAMIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
POUGET Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

PROFESSEUR ASSOCIE

BAMBA Moriféré

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel ANGLAIS

A Franck

Pour ta grande patience et ton soutien. Et pour tout simplement le fait d'être là...

A mis padres,

*me habeis siempre ayudado aunque algunas veces os haya costado
Por eso y por todo vuestro cariño, os dedico este trabajo.*

A mon frère José,

malgré nos différences, tu as été un modèle pour moi. Pour ton soutien si fraternel

A mon neveu préféré Virgile

A la famille Valmary

Pour vos précieux conseils et votre soutien

A Wilfrid et Katarina,

*nous avons formé un trio inséparable dès le premier jour de cet internat
Pour votre si précieuse amitié*

A tous mes amis

sans vos encouragements, je n'en serai pas là.

A tous les internes, assistants et autres chefs que j'ai pu croiser pendant ma formation,

merci pour votre patience et le savoir que vous m'avez transmis

A mes relecteurs (Olivier et Emilie)

Un remerciement particulier

A toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie de Haut-Lévêque pour leur gentillesse et leurs encouragements et particulièrement à Jocelyne, Myriam, Denise, et Sébastien.

A toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie de la faculté de Bordeaux pour son accueil et tout particulièrement Alain Charron pour son optimisme.

A Delphine Chainier, pour ta disponibilité et ton aide dans la partie technique de cette thèse.

A NOTRE PRESIDENTE DE JURY

Madame le Professeur M. C. SAUX

Professeur de Pharmacie clinique et de Pharmacocinétique

Pharmacien, Praticien Hospitalier

Chef de service

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse.

Recevez mes remerciements et ma gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.

Soyez assurée de ma reconnaissance.

A NOS JUGES

Madame le Professeur C. BEBEAR

Professeur de Bactériologie

Médecin, Praticien Hospitalier

Chef de service

Nous sommes sensibles à l'honneur que vous nous faites de juger cette thèse.

Nous vous remercions de votre accueil au sein de votre laboratoire.

En témoignage de notre estime et de notre respectueuse gratitude.

Madame le Professeur M. C. PLOY

Professeur de Bactériologie

Pharmacien, Praticien Hospitalier

Vous avez accepté sans hésiter de collaborer avec nous.

Nous tenons à vous remercier pour votre grande disponibilité et votre accueil au sein du laboratoire de Limoges.

Soyez assurée de notre profonde reconnaissance et de notre plus grande estime.

Madame le Professeur S. ROGEZ

Professeur de Bactériologie-Virologie

Pharmacien, Praticien Hospitalier

Vous avez très gentiment accepté de juger ce travail.

Votre présence dans ce jury nous procure le plus grand plaisir.

Soyez assurée de nos sincères remerciements.

A NOTRE DIRECTRICE DE THESE

Madame le Docteur Jeannette MAUGEIN

Maître de conférence des Universités

Médecin, Praticien Hospitalier

Vous êtes à l'origine de ce travail. Je tenais à vous remercier de m'avoir fait confiance.

Par vos conseils et votre patience, vous m'avez guidé tout au long de cette étude.

Par ce travail, je veux vous témoigner ma plus grande estime et ma plus profonde sympathie.

TABLE DES MATIERES

GENERALITES

PARTIE I : LES STAPHYLOCOQUES

I. HISTORIQUE	p17
II. TAXONOMIE	p17
III. HABITAT ET EPIDEMIOLOGIE	p18
IV. POUVOIR PATHOGENE	p19
1. Les infections suppuratives superficielles et profondes	p19
a) Staphylococcies localisées cutanées et muqueuses	p19
b) Les localisations viscérales	p19
2. Les infections non suppuratives d'origine toxinique	p21
a) Les syndromes cutanés staphylococciques	p22
b) Choc toxique staphylococcique	p23
c) Les intoxications digestives	p24
d) Pathologie associée à la leucocidine de Panton Valentine	p25
e) Maladies possiblement liées aux toxines staphylococciques	p25
V. PHYSIOPATHOLOGIE ET FACTEURS DE VIRULENCE	p26
1. Rôle des composants de la paroi	p27
2. Facteurs d'adhésion et d'invasion	p27
3. Substances élaborées par <i>S. aureus</i>	p29
a) Les toxines	p30
b) Les enzymes	p32
c) Régulation des facteurs de virulence par le système <i>agr</i>	p33
VI. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE	p35
1. Les prélèvements	p35
2. L'examen direct	p35
3. Caractères cultureux	p35
4. Diagnostic de genre et d'espèce	p36
a) La catalase	p36
b) La coagulase libre	p36

c) Recherche simultanée de divers caractères de <i>S. aureus</i>	p36
d) Identification biochimique	p37
e) Identification génotypique	p38
VII. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	p38
1. Les β -lactamines	p38
a) Les pénicillinases	p38
b) La résistance intrinsèque ou hétérogène à la méticilline	p39
2. Les aminosides	p41
3. Les macrolides	p42
a) Modification de la cible ribosomale (sous-unité 30S)	p42
b) Inactivation de la cible	p43
c) Efflux actif de la molécule	p43
4. Les quinolones	p43
a) Modification de la cible	p44
b) Efflux	p44
5. La rifampicine	p44
6. Le fosfomycine	p44
7. L'acide fusidique	p44
8. Le chloramphénicol, les cyclines, le cotrimoxazole	p44

PARTIE II : LES GLYCOPEPTIDES

A – GENERALITES

I. STRUCTURE	p46
II. MECANISMES D'ACTION	p48
III. PHARMACOCINETIQUE	p51
IV. SPECTRE D'ACTIVITE	p52
V. EFFETS INDESIRABLES	p53
VI. SUIVI DU TRAITEMENT	p54
VII. INDICATIONS	p55

B – RESISTANCE

I. HISTORIQUE DE LA RESISTANCE	p57
II. LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE	p59
1. VRSA	p59
2. VISA ou GISA	p59
3. Hétéro-GISA (hGISA) ou hétéro-VISA (hVISA)	p62
4. Variants stables et instables	p64
III. MECANISMES DE RESISTANCE	p66
1. Souches résistantes aux glycopeptides	p66
2. Souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides	p66
a) Epaisseur accrue de la paroi bactérienne	p66
b) Faible degré de réticulation	p69
3. Bases génétiques	p72
IV. LES DIFFERENTES METHODES DE DETECTION	p73
1. Techniques de diffusion en milieu gélosé	p73
2. Screening sur gélose contenant de la vancomycine	p74
3. Techniques de diffusion en milieu liquide et en milieu solide	p75
4. E-test	p75
5. L'analyse de population	p77
a) Analyse de population simplifiée	p77
b) Analyse de population modifiée par Wooton ou « population analysis profile – area under the curve ratio » (PAP-AUC)	p78
6. Techniques recommandées	p79
a) Recommandations du CA-SFM	p79
b) Recommandations du CDC	p79
V. EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE ET IMPACT CLINIQUE	p79

OBJECTIFS

MATERIELS ET METHODES

I. LES SOUCHES BACTERIENNES	p86
II. LE SCREENING	p88

III. DETERMINATION DES CMI PAR LA METHODE DES « E-TEST »	p89
IV. ANALYSE DE POPULATION	p89
V. TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE	p91

RESULTATS

I. POPULATION	p98
II. SCREENING SUR GELOSE BHI A 4 mg/L DE TEICOPLANINE	p98
III. DETERMINATION DES CMI	p101
IV. ANALYSE DE POPULATION	p106
1. Entre le 1 ^{er} novembre 2004 et le 30 avril 2005	p106
2. Etude de population après le 30 avril 2005	p114
V. DOSSIERS CLINIQUES	p116
VI. ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE	p119

DISCUSSION

I. A PROPOS DE LA TECHNIQUE	p122
1. Le screening	p122
2. E-test en « macrométhode »	p125
3. Analyse de population	p126
II. CARACTERISTIQUES DES SOUCHES ET IMPACT CLINIQUE	p127

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

AB : antibiotique

Agr : accessory gene regulator

BHI : Brain Heart Infusion

CRCM : Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose

DID : diabète insulino-dépendant

DNID : diabète non insulino-dépendant

GISA : Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*

hGISA : hétéro- Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*

MH : Mueller Hinton

NAM : acide N-acétyl muramique

NAG : N-acétyl glucosamine

PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis

PVT : prélèvement

TTT : traitement

VRE: Vancomycin Resistant *Enterococcus*

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus est un des agents étiologiques les plus fréquemment en cause dans les infections nosocomiales. Depuis l'apparition, dans les années 1960, de souches résistantes à la méticilline (entre 20 et 40% au sein des hôpitaux français), les glycopeptides occupent une place essentielle dans le traitement de ces infections. Cependant, après l'émergence de souches résistantes à la vancomycine chez les entérocoques (VRE) et chez les staphylocoques coagulase négative, des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) ont été isolées, en particulier, au Japon (39, 41), en France (77), en Espagne (9), au Royaume Uni (42), en Italie (63) et aux Etats-Unis (85). Certaines de ces souches ont été isolées lors d'infections traitées par ces antibiotiques, d'autres à la suite de transmission croisée.

Diverses méthodes sont utilisées pour détecter ces souches GISA mais il n'y a pas pour le moment de consensus sur les modalités des techniques de détection.

Le but de notre étude était de déterminer la proportion de ces souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides au sein de notre hôpital à l'aide du protocole de détection utilisé au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges (76). Après un screening sur gélose BHI contenant 4 mg/L de teicoplanine, les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine ont été déterminées sur les souches sélectionnées. Celles dont les CMI étaient supérieures à certains seuils ont été ensuite étudiées en analyse de population. Nous avons ensuite déterminé par étude génomique l'appartenance ou non à un clone épidémique. Enfin, nous avons évalué par l'étude des dossiers l'impact clinique de ces souches.

GENERALITES

PARTIE I : LES STAPHYLOCOQUES

I. HISTORIQUE (10, 11, 19, 54)

Observés par Pasteur en 1879 dans des pus de furoncle et d'ostéomyélites, les staphylocoques doivent leur nom à Ogston (1883) qui a mis en évidence des grains « kokos » groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin « *staphylos* ». En 1884, Rosenbach obtient des cultures pures de ces bactéries et scinde le genre *Staphylococcus* en 2 groupes selon que les colonies sont blanches ou dorées.

II. TAXONOMIE

Dans l'édition 1986 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, la famille des *Micrococcaceae* est composée de 4 genres de coques gram positif en amas (4):

Staphylococcus

Micrococcus

Planococcus

Stomatococcus

Ces bactéries se caractérisent par la présence d'une catalase et se développent en aérobiose.

Le genre *Micrococcus* a un pouvoir pathogène pratiquement nul et ses espèces se rencontrent le plus souvent en bactériologie médicale en tant que contaminant.

Le genre *Staphylococcus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animale. Actuellement on distingue 43 espèces ; certaines sont trouvées chez l'homme, d'autres chez les animaux ou dans les aliments (viande, produits laitiers,...). Ce sont des cocci Gram positif isolés, en diplocoques ou en amas, non mobiles, asporulés, habituellement non capsulés, pour la plupart aéro-anaérobies facultatifs.

Trois espèces occupent une place privilégiée : *S. aureus*, *S. epidermidis*, et *S. saprophyticus*. L'espèce *S. aureus* se distingue généralement des autres staphylocoques par la présence d'une coagulase ; ceux-ci sont appelés staphylocoques à coagulase négative (SCN).

En 1997, une étude des groupes phylogéniques obtenus sur la base d'une analyse de séquences codant les ARNr 16S a conduit Stackebrandt et coll. à proposer une modification de la famille des *Micrococcaceae* qui serait constituée des genres *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium*, *Rothia*, *Stomatococcus*. La position des genres bactériens présentant des taux en GC bas (< 55%) tels que *Staphylococcus* et *Planococcus* reste à définir (4).

III. HABITAT ET EPIDEMIOLOGIE (10, 11, 19)

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement (air, eau, sol). Les staphylocoques, et en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». On peut estimer que 20 à 75% des sujets sont porteurs de *S. aureus* : porteurs persistants, occasionnels ou transitoires. On trouve également des « non-porteurs ».

S. aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhinopharynx, intestin). L'habitat préférentiel de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale où il est présent chez 10 à 40% des individus en dehors de tout contact hospitalier. Il n'est pas rare de l'isoler de selles.

Le nouveau-né est rapidement colonisé par *S. aureus* après l'accouchement et plus tard, l'enfant peut être contaminé au sein d'une collectivité.

La transmission est surtout interhumaine directe (contact, dissémination manuportée, à partir du nez notamment) ou indirecte par l'intermédiaire des aliments ou du milieu extérieur.

IV. POUVOIR PATHOGENE (10, 19, 99)

S. aureus a un potentiel de pathogénicité très important et il est responsable aussi bien d'infections communautaires que nosocomiales.

Certaines souches agissent aussi par libération d'une ou plusieurs toxines (intoxications alimentaires, syndrome de choc toxique, impétigo)

La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques sont liées à trois principaux facteurs :

- Le caractère ubiquitaire du germe.
- L'abaissement des défenses locales et générales des malades soumis à des soins intensifs, des interventions chirurgicales graves, etc...
- La fréquente résistance aux antibiotiques, notamment en milieu hospitalier.

Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés.

1. Les infections suppuratives superficielles et profondes

a) Les staphylococcies localisées cutanées et muqueuses

Les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion puis la destruction des tissus de l'hôte, la réponse inflammatoire locale et systémique. *S. aureus* est principalement responsable d'infections suppuratives loco-régionales.

L'infection cutanée superficielle se traduit le plus souvent par une folliculite, un impétigo, ou un onyxis. On peut voir des infections cutanées liées à la présence de cathéters.

La forme la plus typique est représentée par la folliculite, lésion inflammatoire suppurée et douloureuse centrée sur un follicule pileux, pouvant prendre une allure extensive en profondeur (furoncle, anthrax) ou en superficie (*sycosis barbae*). Le caractère tenace et récurrent peut faire suspecter un désordre immunitaire sous-jacent ou une maladie favorisante (diabète). L'impétigo est constitué de lésions maculo-vésiculeuses localisées au niveau de la peau des jambes et de la face, atteignant surtout l'enfant. Elles ne s'accompagnent pas de signes généraux.

L'infection cutanée profonde est représentée par des furoncles (abcès intrafolliculaires de la gaine du poil), des hidrosadénites (infections des canaux des glandes sudoripares).

L'anthrax est un conglomérat de furoncles et la staphylococcie de la face en est une localisation grave.

L'hydrosadénite suppurée est une infection des canaux des glandes sudoripares volontiers localisées au creux axillaire.

On peut observer des infections staphylococciques de la glande mammaire se développant chez 1 à 3% des femmes allaitantes.

Les infections à *S. aureus*, atteignant les yeux (conjonctivites), la sphère génitale (cervicites, salpingites, abcès pelviens,...) ou les voies aériennes (sinusites, otites, mastoïdites, parotidites, amygdalites ou infections pulmonaires) sont également fréquentes.

b) Les localisations viscérales

Les infections locales se compliquent parfois par extension loco-régionale ou par diffusion hématogène de la bactérie. *S. aureus* peut être alors responsable de septicémies, d'endocardites, de pneumopathies, d'ostéomyélites, d'arthrites, de méningites, ou d'infections urinaires.

✓ Les staphylococcies osseuses

Les ostéomyélites aiguës touchent le plus souvent les os longs chez les enfants et les adolescents, chez qui elles peuvent devenir chroniques, ou les vertèbres chez les adultes. *S. aureus* tient également une place dominante dans les infections ostéo-articulaires post-chirurgicales, d'inoculation ou après traumatismes.

✓ Les staphylococcies pleuro-pulmonaires

Elles sont rares mais graves en raison du risque de complications à type d'abcès, de nécrose pulmonaire extensive ou d'évolution vers des pleurésies enkystées. Il peut s'agir de pneumopathies d'inhalation survenant au décours d'une infection virale (grippe) ou à la suite de manœuvres d'aspiration bronchique ou d'intubation, ou encore de pneumopathies chez des sujets immunodéprimés ou atteints de cancer primitif du poumon.

✓ Les staphylococcies uro-génitales

On observe fréquemment des pyélonéphrites à staphylocoques mais on peut trouver également des abcès isolés du rein ou des phlegmons périnéphrétiques.

✓ Les staphylococcies neuro-méningées

Elles peuvent se produire soit par contiguïté à partir d'une sinusite ou suite à un traumatisme facial soit par voie hématogène, par exemple à partir d'une endocardite. Elles sont rares.

✓ L'endocardite staphylococcique

Elle est particulièrement fréquente et redoutable. Elle s'observe notamment chez les patients porteurs d'une valve cardiaque artificielle. Les septicémies des toxicomanes utilisant la voie intraveineuse peuvent être à l'origine d'endocardite du cœur droit.

✓ Les septicémies

Les septicémies à *S. aureus* sont causées et entretenues par un foyer infectieux primaire compliqué de thrombophlébite, elles sont fréquentes. Ces infections surviennent dans un tiers des cas chez des sujets sans antécédents à la suite d'une infection localisée sans gravité apparente mais sont cependant favorisées par des traumatismes locaux, des corps étrangers (cathéter, sonde,..), des interventions chirurgicales, des brûlures étendues, des traumatismes vasculaires répétés (héroïnomanes). Leur gravité tient tant au risque de survenue de choc staphylococcique qu'à la localisation de métastases septiques.

Le pronostic global des septicémies à *S. aureus* reste redoutable malgré le traitement antibiotique (20 à 30% de mortalité).

2. Les infections non-suppuratives d'origine toxinique (4, 19, 29)

Les infections non-suppuratives ou toxémies staphylococciques sont l'apanage de l'espèce *S. aureus* : syndromes cutanés staphylococciques, choc toxique staphylococcique et intoxication alimentaire.

Elles sont causées soit par la diffusion de toxines produites in vivo, à partir d'un foyer infectieux ou d'un site de colonisation, soit par l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé.

a) Les syndromes cutanés staphylococciques

✓ Staphylococcies cutanées bulleuses ou syndrome d'exfoliation généralisée

Le syndrome de la peau ébouillantée (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome ou SSSS) chez les jeunes enfants (ou syndrome de Ritter chez le nouveau-né) est provoqué par la diffusion d'exfoliatines ou d'épidermolysines, isolées par Melish et Glasgow en 1970. Le foyer de colonisation peut être ORL, conjonctival ou cutané.

Ce syndrome se rencontre dans la grande majorité chez le jeune enfant mais peut aussi se rencontrer chez l'adulte immunodéprimé et les patients atteints d'insuffisance rénale (nécrolyse épidermique toxique ou TEN « toxic epidermal necrolysis »).

Cette maladie débute brutalement par une érythrodermie très douloureuse, initialement péri-orbitaire et péri-buccale, généralisée en 24 heures, étendue, accompagnée d'un signe de Nikolsky (décollement de l'épiderme par frottement) et suivie assez rapidement d'un décollement bulleux généralisé. Celui-ci se fait par clivage de la partie superficielle de l'épiderme au niveau de la couche granuleuse, ce qui le différencie de la nécrolyse épidermique d'origine toxique ou allergique (syndrome de Lyell) où le décollement se fait par clivage entre le derme et l'épiderme au niveau de la couche basale. Les muqueuses ne sont habituellement pas atteintes. Les lésions prennent rapidement un aspect bulleux, dont l'exsudat est stérile.

L'évolution est en général favorable en une dizaine de jours, sous antibiothérapie, après une phase de desquamation généralisée. La mortalité est évaluée à 4% mais elle est d'environ 30% chez l'immunodéprimé (99).

Le syndrome de Ritter représente la même affection chez le nouveau-né ; le foyer primitif est souvent une omphalite, une circoncision infectée, une conjonctivite, une rhinite.

✓ Impétigo bulleux

Il est induit par la production d'exfoliatines au sein même des lésions cutanées. Il est constitué d'un nombre variable de bulles, prédominantes aux extrémités, à contenu trouble où l'on peut isoler le staphylocoque et la toxine (exfoliatine). Les bulles évoluent vers l'ouverture et la formation d'ulcérations puis de croûtes. La cicatrisation se fait en une semaine environ. Il s'agit d'une affection bénigne, qui justifie simplement une antibiothérapie orale.

b) Choc toxique staphylococcique

Le syndrome du choc toxique staphylococcique

Il est provoqué par la diffusion dans l'organisme de la toxine TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1) ou semble t'il, de certains sérotypes d'entérotoxines (C notamment)(4).

Il associe fièvre, hypotension systolique, rash maculo-érythrodermique scarlatiforme suivi d'une desquamation au niveau des paumes et des plantes et souvent de diarrhées, de vomissements, de myalgies, d'une thrombopénie, avec état de choc et atteintes pluriviscérales.

Cette pathologie a initialement été décrite en pédiatrie comme une complication d'infection suppurative staphylococcique. Depuis, de nombreux cas ont été rapportés, notamment lors de complications d'infections post-opératoires ou encore chez des femmes en période menstruelle lors de l'utilisation de tampons vaginaux hyper-absorbants.

Il survient généralement chez la jeune femme, durant la période menstruelle, utilisant des tampons périodiques. C'est une affection peu fréquente : 18 cas par an en France (19). La létalité est de 5 à 10%.

Le germe dont la prolifération est favorisée par l'utilisation de tampons est souvent isolé à partir du sang des règles mais les hémocultures restent stériles.

A côté de cette forme classique, d'autres formes cliniques incomplètes sont décrites :

- la scarlatine staphylococcique (caractérisée par une fièvre et un érythème scarlatiforme typique sans choc ni défaillance multiviscérale)
Elle se rencontre chez le jeune enfant et fait suite à une suppuration volontiers chirurgicale (ostéomyélite, arthrite, abcès). L'hémoculture est souvent positive. Les entérotoxines A, B, C, D et TSST-1 sont impliquées.
- le NTED (Neonatal Toxic shock syndrome-like Exanthematous Disease) (caractérisé par la survenue lors de la période néonatale d'une fièvre, d'une éruption cutanée et d'une thrombocytopenie)
- le REDD syndrome (Recalcitrant Erythematous Desquamating Disorder) (décrit initialement chez les patients sidéens, caractérisé par la survenue d'une fièvre, des lésions scarlatiformes et d'une défaillance multiviscérale mais sans état de choc)

c) Les intoxications digestives

✓ Les toxi-infections alimentaires

Elles sont dues à l'ingestion d'entérotoxines (A à E et G à R)(99) préformées dans l'aliment, résistantes aux sucs digestifs et pour certaines à la chaleur, entraînant des troubles d'apparition précoce (incubation courte de 1 à 6 heures, généralement 3 heures après le repas) avec vomissements, diarrhées, déshydratation et absence de fièvre. L'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement mais la survenue de choc toxique staphylococcique est possible lors d'une intoxication massive mais est propre des terrains particuliers. La toxine le plus souvent en cause est l'entérotoxine A, seule ou associée à d'autres toxines (19).

L'intoxication staphylococcique est l'une des plus fréquentes des toxi-infections alimentaires après les salmonelloses : elles représenteraient 15 à 30% des toxi-infections alimentaires (99). C'est le 2^{ème} agent de TIAC (toxi-infections alimentaires collectives) en France après les salmonelles.

Le lait et les produits laitiers, les viandes et les plats ayant nécessité des manipulations sont les aliments le plus souvent responsables. Ils ont été souillés par le personnel porteur de *S. aureus* au niveau des mains ou du nez et ont été conservés dans de mauvaises conditions, ce qui permet à la souche de développer sa toxine. Ces intoxications s'observent généralement sous forme d'épidémies localisées aux personnes ayant consommé le même repas (cantines, restaurants).

✓ Les entérocolites aiguës pseudo-membraneuses

Elles surviennent au décours d'une antibiothérapie qui a sélectionné une souche intestinale de *S. aureus* résistante au traitement et sécrétrice d'entérotoxine, de toxines synergohyménotropes LukD-LukE (4). La maladie se manifeste par une diarrhée intense avec déshydratation rapide d'évolution fatale. La muqueuse intestinale est ulcérée, hémorragique et recouverte de fausses membranes. *S. aureus* doit être recherché dans les selles.

d) Pathologie associée à la leucocidine de Panton Valentine (LPV)

Cette toxine est capable de détruire les leucocytes et est produite par moins de 3% des souches de *S. aureus* (99).

Elle est associée aux infections cutanées staphylococciques primitives, notamment la furonculose chronique, et à la survenue de pneumopathie nécrosante du sujet jeune.

Celle-ci touche principalement le grand enfant et le jeune adulte.

Elle est précédée d'un syndrome infectieux d'allure virale durant quelques jours puis survient un épisode de détresse respiratoire aiguë avec hémoptysies. Le taux de mortalité est élevé (75% avec une médiane de survie de 4 jours).

e) Maladies possiblement liées aux toxines staphylococciques

Les toxines superantigéniques staphylococciques (entérotoxines, exfoliatines A et B (4), et TSST-1) pourraient être impliquées dans l'étiologie du syndrome de Kawasaki, la mort subite du nourrisson et semblent, au moins, représenter un facteur aggravant de l'eczéma atopique.

Leur rôle dans les maladies auto-immunes serait dû à leur capacité d'induire une activation de lymphocytes auto-réactifs.

En effet, les superantigènes sont un groupe de molécules, capables de provoquer une activation polyclonale des lymphocytes T, en se fixant directement aux cellules présentant l'antigène, en dehors des sites de fixation classique des antigènes. Ainsi, ils peuvent être responsables (4) :

- d'une activation massive du système immunitaire, de la libération de cytokines de l'inflammation et la survenue de choc toxique.
- d'une activation parasite des lymphocytes dirigés contre les antigènes du « soi » et ainsi de la possible survenue de réactions auto-immunes.

Le rôle exact de ces toxines dans ces pathologies n'est pas encore établi : elles pourraient être soit un facteur étiologique soit un cofacteur favorisant la survenue de poussées évolutives (29).

V. PHYSIOPATHOLOGIE ET FACTEURS DE VIRULENCE

Le pouvoir pathogène d'une souche est lié à l'expression de facteurs de virulence.

On distingue les protéines de surface (adhésines) qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte, des facteurs inhibant la phagocytose qui conduisent au développement et à l'extension de l'infection et des toxines spécifiques responsables de la lésion des cellules et des syndromes pathologiques.

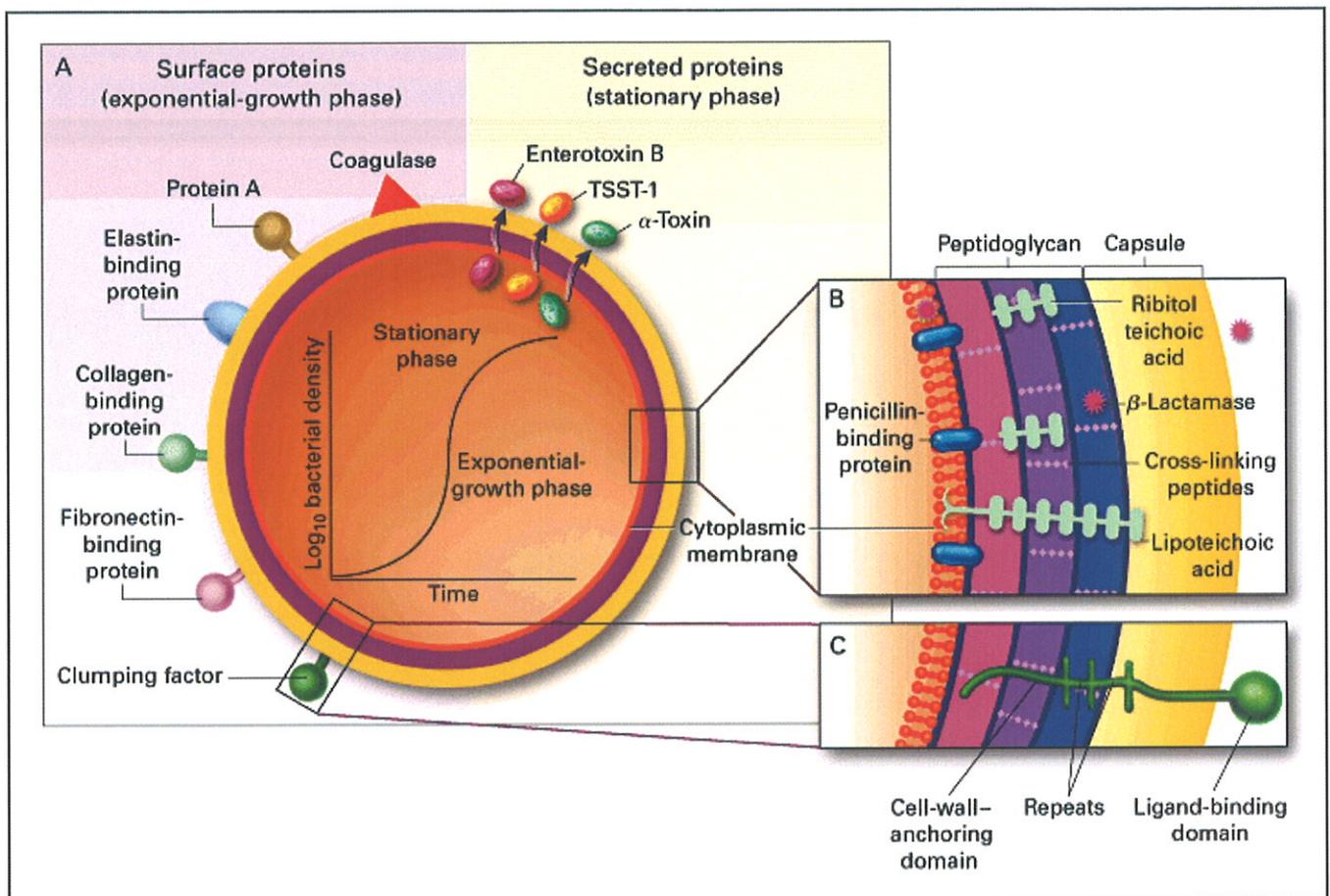


Figure 1 : Structure de *S. aureus*, d'après Lowy (60).

La partie A montre les protéines de surface et les protéines sécrétées. Les parties B et C montrent la structure de la paroi cellulaire.

1. Rôle des composants de la paroi

Les composants de la paroi comme le peptidoglycane, les acides teichoïques et lipoteichoïques entraînent des effets biologiques démontrés *in vitro*, notamment la sécrétion de cytokines par les cellules lymphomonocytaires (60). Alors que le peptidoglycane est peu immunogène, les acides teichoïques (polymères linéaires du ribitol phosphate) donnent naissance à des anticorps que l'on trouve dans le sérum de malades atteints d'infection récente. Ces acides teichoïques sont les récepteurs de bactériophages (lysotypie des staphylocoques) et sont liés de façon covalente aux chaînes du peptidoglycane. Les acides lipoteichoïques interviennent dans la colonisation, par leur partie hydrophobe orientée vers l'extérieur de la bactérie (6, 19).

Des polysaccharides capsulaires sont trouvés chez 90% des souches. Onze types capsulaires ont été décrits, les types 5 et 8 sont les plus fréquents (60). Cette capsule permet une meilleure résistance des souches à l'opsonisation et à la phagocytose. Certaines souches produisent un exopolysaccharide (glycocalix) qui entraîne la formation d'un biofilm engluant les bactéries et leur permettant d'adhérer aux surfaces extérieures.

Certaines protéines ou glycoprotéines sont responsables de la spécificité de type. Il existe 14 sérotypes mis en évidence par réaction d'agglutination au moyen d'immunsérums (6).

2. Facteurs d'adhésion et d'invasion

Pour coloniser un tissu, une bactérie doit préalablement adhérer aux cellules et aux composants de la matrice extra-cellulaire. Plusieurs constituants staphylococciques interviennent dans cette colonisation. *S. aureus* possède un grand nombre de protéines exposées à la surface de la bactérie, ancrées dans le peptidoglycane et qui ont la capacité de se fixer sur les molécules de l'hôte : les adhésines (figure 1). Un certain nombre appartient à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule) c'est-à-dire qu'elles reconnaissent les molécules de la matrice extra-cellulaire des cellules de l'hôte. Cette matrice joue un rôle dans l'organisation de l'architecture cellulaire, dans la régulation de la prolifération et de la migration cellulaire durant la croissance et la cicatrisation ; elle est composée de collagène, d'élastine, de protéoglycanes et de glycoprotéines de structure telles que la fibronectine (19, 99).

a) la protéine A (Spa)

Elle fait partie des MSCRAMM. Elle se lie au facteur Von Willebrand, peptide présent au niveau de l'endothélium lésé, et peut donc jouer le rôle d'une adhésine au début d'une infection intra-vasculaire.

De plus, elle possède 2 domaines de liaison aux immunoglobulines : l'un fixant le fragment Fc (partie constante) et l'autre le fragment Fab (partie variable). Elle intervient donc dans l'opsonisation et la phagocytose et se comporte comme un superantigène pour les lymphocytes B (99).

b) la protéine de liaison au collagène de type I, II, et IV (Cna)

Elle permet l'adhésion de *S. aureus* au cartilage et constitue un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires. Cette protéine Cna est exprimée chez 38 à 56% des souches (19).

c) la protéine de liaison à la fibronectine (FnBP)

Elle permet l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques mais aussi aux biomatériaux (cathéters, prothèses) ayant un contact prolongé avec le sang. Son rôle est très important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers.

Elle serait impliquée dans les phénomènes d'internalisation du staphylocoque dans la cellule endothéliale, cette étape prenant part à la physiopathologie des endocardites infectieuses à *S. aureus* (99).

d) la protéine de liaison au fibrinogène (facteur d'affinité pour le fibrinogène ou coagulase liée ou *clumping factor* : ClfA, ClfB)

Il s'agit d'une substance fixée à la surface de la cellule, diffusible dans le milieu après autolyse, et réagissant directement avec le fibrinogène ou les monomères solubles de fibrine.

An niveau des thrombi riches en plaquettes, la concentration en Ca^{2+} est basse et les bactéries circulantes viennent s'agréger à leur niveau par l'intermédiaire du ClfA. L'interaction ClfA-fibrinogène est régulée par la concentration calcique.

Le récepteur ClfA est présent à la surface des bactéries lorsque la culture a lieu en aérobiose ou en anaérobiose et ceci tout au long de la croissance. En cas de cultures anaérobies de *S. aureus* et en début de phase exponentielle, on trouve un deuxième récepteur à la surface des bactéries, le ClfB. Il semble que ce ClfB soit fortement impliqué dans la colonisation nasale.

Cette protéine de liaison au fibrinogène provoque l'agrégation de bactéries en présence de plasma permettant de transformer directement le fibrinogène en fibrine. Elle joue un rôle dans les infections des plaies et les infections sur corps étrangers (6).

En mettant en contact une souche et des particules de latex recouvertes de fibrinogène, on observe une agglutination chez 98% des *S. aureus* mais ce test peut être également positif chez certains staphylocoques coagulase négative, tels que *S. lugdunensis* et *S. schleiferi*.

e) La protéine de liaison à l'élastine (EbpS)

f) Les sidérophores

Le fer est essentiel à la croissance des staphylocoques. *S. aureus* s'adapte à des concentrations faibles en fer en sécrétant des sidérophores, composés de faible masse moléculaire capable de capter et de transporter le fer dans la bactérie. Cette sécrétion survient en phase post-exponentielle de croissance ; elle est maximale en phase stationnaire.

3. Substances élaborées par *S. aureus*

Elles sont particulièrement nombreuses chez *S. aureus*. On distingue des protéines diffusibles douées soit d'activité toxique, soit d'activité enzymatique.

a) les toxines

Les principales toxines décrites chez *S. aureus* sont :

✓ Les hémolysines (54)

Elles ont une activité cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les hématies et les plaquettes. La cytolysse libère des cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation expliquant le choc septique des infections sévères à *S. aureus*.

L'hémolysine alpha, de nature protéique, thermostable et antigénique, est cytotoxique et cytolytique pour une grande variété de types cellulaires. Elle semble s'insérer dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles et permet le passage de molécules de petite taille.

L'hémolysine bêta, thermolabile, est une sphingomyélinase qui donne une hémolyse accrue en présence de souches de *Streptococcus agalactiae* : c'est le CAMP test.

La gamma-hémolysine a une action pro-inflammatoire.

La delta-hémolysine agit comme un détergent sur les membranes.

✓ La leucocidine de Pantou et Valentine (LPV)

Elle fait partie de la famille des toxines synergohyménotropes (SHT). Ces toxines sont formées de 2 composés, codés par des gènes distincts, agissant en synergie sur l'un ou plusieurs des types cellulaires humains suivants : érythrocytes, granulocytes, monocytes et macrophages (74). La LPV provoque sur les polynucléaires et les macrophages une perte de mobilité, une dégranulation, une destruction nucléaire et une lyse cellulaire. Cette protéine a un rôle important dans la formation du pus.

Elle est leucotoxique et dermonécrotique mais non hémolytique. L'inhibition de la phagocytose et la destruction des granulocytes expliquent l'extension des lésions.

La LPV est un facteur de virulence important des infections nécrosantes cutanées (86% des furoncles et anthrax) et de toutes les infections graves à point de départ cutané, pneumopathie consécutive à une cellulite ou un anthrax par exemple.

✓ Les exfoliatines ou toxines épidermolytiques

Elles sont produites par environ 5% des souches de *S. aureus* (10). On distingue 2 sérotypes A et B : toxine A thermostable et d'origine chromosomique et toxine B thermolabile et d'origine

plasmidique. Récemment l'exfoliatine D a été décrite à partir d'une souche isolée dans une plaie cutanée (99). Ces toxines se fixent sur un composant des desmosomes, la desmoglérine 1, et entraînent une desquamation du ciment intercellulaire, une rupture des desmosomes et un élargissement des espaces intercellulaires (99). Son action provoque donc sur le plan histologique un décollement entre le *stratum granulosum* et le *stratum spinosum* créant cliniquement des lésions bulleuses. Elle n'agit spécifiquement que sur les cellules de certaines espèces (homme, singe, souris,...). La pathogénie des lésions cliniques est variable et dépend de la localisation de la souche et de l'état immunitaire du patient : lorsque celui-ci ne possède pas d'anticorps dirigés contre l'exfoliatine, celle-ci diffuse dans l'organisme et crée des lésions généralisées (maladie de Ritter, syndrome de la peau ébouillantée). Dans le cas de l'impétigo bulleux, on trouve des anticorps circulants : la souche produit la toxine *in situ* et peut être isolée dans le liquide cutané. 50 % des enfants de plus de 10 ans et 80 % des adultes possèdent des anticorps protecteurs (6) ; ils sont transmis passivement au nouveau-né.

✓ Les entérotoxines

Ce sont des protéines thermostables, d'origine chromosomique, impliquées dans les intoxications alimentaires, le choc toxique et la scarlatine staphylococcique et qui comprennent de nombreux types antigéniques (A à E et G à R) (99). Les plus fréquemment rencontrées sont les sérotypes A, B et D.

Les entérotoxines sont produites par 30 à 60% des souches de *S. aureus* (6). Certaines ont un effet mitogène sur les lymphocytes T. Elles résistent aux enzymes protéolytiques.

La dose minimale toxique se situe aux environs de 1 µg pour 100g d'aliments (10).

Ces toxines sont des superantigènes qui entraînent l'activation de sous-populations lymphocytaires à l'origine de la libération en chaîne de médiateurs d'inflammation responsables du choc.

✓ La toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1)

Il s'agit d'une protéine antigénique, sensible aux enzymes protéolytiques, d'origine chromosomique, impliquée dans le choc toxique, la scarlatine staphylococcique, le NTED et le REDD syndrome (99).

Cette toxine, comme les entérotoxines, a un effet pyrogène et elle est un superantigène qui entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous populations lymphocytaires ce qui induit la

libération de plusieurs médiateurs (interleukine, interféron gamma, TNF α et β) responsables de la symptomatologie du choc staphylococcique.

Elle entraîne la formation d'anticorps dont la fréquence dans la population augmente avec l'âge (85% à 30 ans) (6).

b) les enzymes

✓ La coagulase libre

C'est une exo-enzyme thermostable produite par *S. aureus* capable de coaguler en quelques heures le plasma humain ou de lapin. Elle se lie à la prothrombine de l'hôte et forme un complexe appelé staphylothrombine (19).

Cette enzyme joue certainement un rôle important dans la pathogénicité du *S. aureus* en coagulant le plasma autour des bactéries et en les protégeant de la phagocytose ; elle est à l'origine de thrombophlébites suppurées (6, 54).

Sa présence caractérise l'espèce *S. aureus* mais d'autres espèces, observées en pratique vétérinaire peuvent être productrices : *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* (54).

✓ La fibrinolysine (ou staphylokinase)

Elle est caractéristique des souches pathogènes humaines. En activant le plasminogène en plasmine, elle provoque la fragmentation des caillots endoveineux et libère ainsi des micro-embols septiques, facteurs de septicémie et de localisations septiques secondaires.

La diffusion hématogène de *S. aureus* se fait à partir de thrombophlébites locales (6).

✓ La hyaluronidase

C'est une enzyme thermolabile hydrolysant l'acide hyaluronique, substance fondamentale du tissu conjonctif. Elle favorise ainsi la diffusion des staphylocoques dans le tissu conjonctif (6, 10).

✓ La lipase (ou FAME, Fatty Acid Modifying Enzyme)

Elle est produite par 80% des souches et semble constituer un facteur de virulence dans les abcès, où en modifiant les lipides bactériens, elle favorise la survie des staphylocoques (6).

✓ La nucléase (ou Dnase)

Il s'agit d'une désoxyribonucléase ayant aussi une activité ribonucléasique. C'est une enzyme thermostable (thermonucléase) produite par toutes les souches de *S. aureus*, ainsi que par environ 5% des souches de staphylocoques coagulase négative (54). Son activité est mise en évidence sur milieu à base d'ADN avec du bleu de toluidine (halo rose) (10).

c) Régulation des facteurs de virulence par le système *agr* (19, 98)

L'expression des différents facteurs de virulence est sous la dépendance d'un système régulateur global, le système *agr* (« *accessory gene regulator* »).

Il agit comme un « *quorum sensor* » : système de régulation dit à deux composants, qui permet aux bactéries de modifier l'expression d'un ou de plusieurs gènes en fonction de la perception d'un signal environnemental, témoin de la densité bactérienne et de l'état de croissance.

Pendant la phase exponentielle de croissance bactérienne, la coagulase et la protéine A ont un rôle de protection contre la phagocytose et de détournement de l'opsonisation qui est essentiel dans les phases initiales du développement du foyer infectieux. Par contre, les hémolysines, les entérotoxines, la TSST-1, les leucocidines, les exfoliatines, la thermonucléase voient leur expression stimulée en phase post-exponentielle, ce qui entraîne l'extension du foyer infectieux en favorisant la diffusion locale et générale de l'infection.

Quand il y a multiplication bactérienne, le système *agr* diminue les facteurs d'adhérence et stimule l'expression des facteurs d'invasion et de dissémination de l'infection : c'est un répresseur transcriptionnel de l'expression de la protéine A et de la coagulase et un activateur des gènes des exoprotéines.

Le système *agr* est constitué de deux unités de transcription en orientation divergente, sous le contrôle de deux promoteurs P2 et P3. Le promoteur P2 produit un transcrit (ARN II), comprenant quatre phases de lecture ouvertes : *agr A*, *C*, *D* et *B* (figure 2).

Agr D code pour un précurseur mûri en un octapeptide sous l'effet du produit du gène *agr B*. Cet octapeptide est sécrété dans l'environnement extra-cellulaire et son accumulation agit comme un signal de densité cellulaire conduisant à l'activation du système de transduction à deux composants : *agr C* qui joue le rôle de capteur et *agr A* celui d'effecteur.

Ces produits activent leur propre promoteur P2 (boucle auto-catalytique) et aussi le promoteur P3 qui produit un ARN III, transcrit de 517 nucléotides indispensable à l'expression normale des exoprotéines. Cet ARN III non traduit est donc l'effecteur du système. Sa séquence contient le cadre de lecture de la δ -hémolysine.

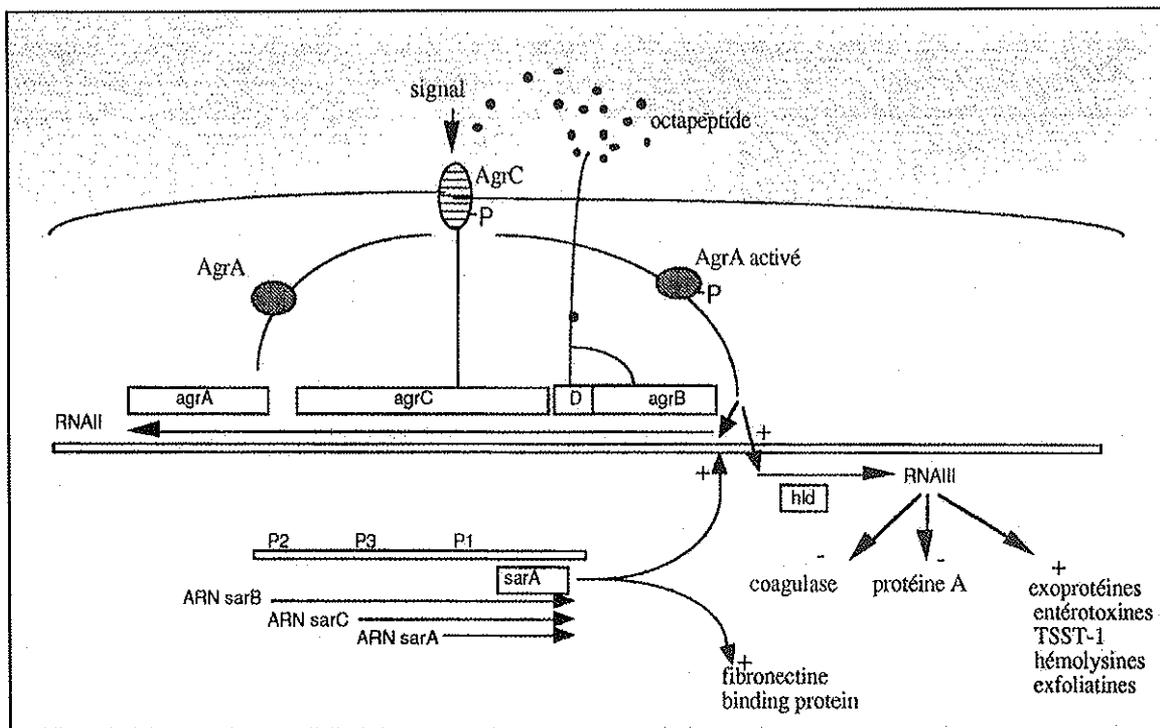


Figure 2 : Organisation des locus *agr* et *sar* et modèle de fonctionnement - d'après Vandenesch (98)

Un polymorphisme au niveau de l'octapeptide (codé par *agr D*) et de *agr C* définit quatre groupes différents (groupes I à IV) (81, 100).

Il existe d'autres systèmes de régulation décrits : *sar* (« staphylococcal accessory gene »), élément modulateur de l'expression du locus *agr*, *xpr* (« extracellular protein regulator »), *sae* (« *S. aureus* exoprotein expression »).

VI. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE (6, 10, 99)

1. Les prélèvements

Ils doivent être effectués avant toute antibiothérapie et pratiqués avec une asepsie rigoureuse. Il faut éviter la contamination du prélèvement par les souches de *S. aureus* souvent présentes sur la peau.

Les prélèvements de sang, d'urine ou de collection fermée doivent être pratiqués après une désinfection locale rigoureuse évitant les contaminations. Les hémocultures sont multipliées pour permettre l'isolement du germe à plusieurs reprises, étayant ainsi le diagnostic.

2. L'examen direct

Après coloration de Gram, les staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif. Ils peuvent être isolés, en diplocoques ou en amas (car les staphylocoques se divisent en deux plans). L'examen direct montrant la présence de germes associée à une réaction inflammatoire à polynucléaires revêt une importance considérable pour l'interprétation de l'étiologie staphylococcique d'une lésion.

3. Caractères cultureux

Les staphylocoques se développent rapidement, en 18 à 24 heures, à 37°C (culture possible de 10 à 45°C) sur milieux usuels. La plupart des souches de *S. aureus* produisent un pigment jaune-orange.

S. aureus pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 7,5% de NaCl contenant du mannitol). Le pH optimal est de 7,0 à 7,5.

Pour les produits pathologiques polymicrobiens ou alimentaires, il est donc intéressant de recourir à des milieux sélectifs comme le milieu de Chapman (la pousse entraîne une acidification du mannitol et un virage au jaune) ou le milieu de Baird-Parker au tellurite (utilisé surtout en microbiologie alimentaire, colonies noires entourées d'un halo clair).

De nouveaux milieux sont commercialisés : *S. aureus* ID (bioMérieux) est un milieu chromogène permettant l'isolement et l'identification de *S. aureus* dont les colonies apparaissent vertes par la production d' α -glucosidase (73).

4. Diagnostic de genre et d'espèce

a) La catalase

La catalase est un caractère constant chez les staphylocoques. Sa mise en évidence permet de distinguer parmi les cocci gram positif, les staphylocoques des streptocoques.

b) La coagulase libre

La mise en évidence de la coagulation du plasma par les bactéries est le principal test caractérisant *S. aureus*. Il consiste à incuber un mélange de plasma de lapin et de la souche à tester pendant 4 heures à 37°C. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube. Ce test permet l'identification de 99% des souches de *S. aureus* mais certaines souches ne produisant pas de coagulase, devront être identifiées par d'autres moyens.

De nouveaux test apparaissent sur le marché : staphychrom II (International Microbio, Signes, France) est un test rapide (2h) en microplaque contenant un milieu de culture déshydraté et un substrat chromogène de la staphylocoagulase, aussi sensible que le test de référence en tube et la spécificité est de 100% (30).

c) Recherche simultanée de divers caractères de *S. aureus*

On utilise la propriété de *S. aureus* de s'agglutiner en présence de plasma humain grâce à la présence de « *clumping factor* ». Le « Staphyslide test » (bioMérieux réf. 55081) permettait la recherche de facteur agglutinant, grâce à des particules de latex sensibilisées par du fibrinogène. Cependant, il a été montré que les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) possèdent un polysaccharide capsulaire qui masque la protéine A et le facteur d'affinité pour le fibrinogène. De plus, d'autres espèces de staphylocoques

(*S. schleiferi*, *S. lugdunensis* et *S. intermedius*) possèdent un facteur agglutinant d'où le risque de faux positifs. Aussi, compte tenu de l'existence de souches déficientes en l'une ou l'autre de ces exoprotéines l'identification des souches de *S. aureus* ne doit pas se baser sur un seul test phénotypique. Des tests d'agglutination détectant plusieurs antigènes ou récepteurs de surface (récepteur pour le fibrinogène, protéine A, antigènes capsulaires) ont été commercialisés.

PASTOREX® STAPH-PLUS (Biorad) est un test rapide d'agglutination sur lame permettant la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène (« *clumping factor* »), de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de type 5 et 8 de *S. aureus*.

D'autres tests sont commercialisés : SLIDEX STAPH-PLUS (bioMérieux), STAPHAUREX PLUS (Murex diagnostics).

La sensibilité et la spécificité sont respectivement de 98,2% et 98,9% pour le SLIDEX STAPH-PLUS, de 98,2% et 96,2% pour STAPHAUREX PLUS, de 98,7% et 95,7% pour PASTOREX STAPH-PLUS (97).

d) Identification biochimique

La détermination de l'espèce peut être réalisée à l'aide de galeries biochimiques d'identification miniaturisées : API Staph (bioMérieux) comportant 19 tests et ID32 Staph (bioMérieux) comportant 32 tests. Ces systèmes utilisent des tests d'acidification ou d'assimilation des sucres, des tests enzymatiques et des tests de résistance aux substances inhibitrices et permettent une identification après 18 à 24 heures d'incubation.

Un autre type de galerie, Rapidec staph (bioMérieux) permet, en 2 heures, de mettre en évidence la coagulase spécifique de *S. aureus* par clivage de substrats chromogènes fixés au fond des cupules (48).

Il existe des systèmes de microbiologie automatisés (Phoenix™ chez BD Diagnostic, Vitek2™ chez bioMérieux). L'identification sur BD Phoenix™ se fait grâce à des galeries comprenant des puits pourvus de substrats biochimiques secs, inoculées avec une solution à un standard McF 0,5 et incubées à 35°C. Elle utilise une série de tests biochimiques conventionnels, basée sur la chromogénie et la fluorogénie. Les galeries sont lues toutes les 20 min par l'automate BD Phoenix™.

e) Identification génotypique

Il existe également des techniques de biologie moléculaire qui permettent l'identification d'une souche par des techniques de PCR ou des techniques utilisant des sondes spécifiques.

Le Kit AccuProbe Rapid DNA Probe Test (GenProbe Inc.) permet la détection de séquences uniques d'ARN ribosomal, spécifiques de *S. aureus*, grâce à une sonde d'ADN monocaténaire marquée à l'ester d'acridium (traceur chimiluminescent). Cette sonde permet l'identification fiable de souches de *S. aureus* dépourvues de coagulase libre ou de facteur agglutinant. Elle permet aussi de détecter *S. aureus* dans les lavages broncho-alvéolaires.

Une autre sonde, non commercialisée, spécifique du gène de la thermonucléase (*nuc*) permet également l'identification de *S. aureus* (19).

VII. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES (10, 49, 59)

Les staphylocoques sont naturellement sensibles à de nombreux antibiotiques, mais les infections à staphylocoques posent des problèmes thérapeutiques du fait de la facilité qu'ont ces bactéries à acquérir des résistances.

1. Les β - lactamines

S. aureus est naturellement sensible à toutes les β -lactamines y compris la pénicilline G, mais il a rapidement acquis des résistances aux différentes molécules.

a) Les pénicillinases

Très rapidement après l'introduction de la pénicilline sur le marché (1944), environ 6% des souches de *S. aureus* ont produit une pénicillinase (β -lactamase) et sont devenues résistantes. Les raisons de l'apparition aussi précoce de ces résistances dès 1946 sont inconnues mais celles de l'étendue rapide de celles-ci sont claires : l'usage important et inapproprié des

antibiotiques. En 1948, plus de 50% des souches de *S. aureus* isolées en milieu hospitalier sont résistantes à la pénicilline. De nos jours, près de 90% des souches hospitalières et extra-hospitalières résistent à la pénicilline G par production de pénicillinases qui ouvrent le noyau β lactame de la molécule et inactivent l'antibiotique.

Ces pénicillinases sont extra-cellulaires, inductibles et généralement codées par des plasmides. Elles inactivent les pénicillines G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicillines, et les uréidopénicillines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique.

La méticilline, l'oxacilline et la cloxacilline restent actives.

b) La résistance intrinsèque ou hétérogène à la méticilline

Le début des années 60 voit le développement de nouveaux antibiotiques plus stables vis-à-vis des pénicillinases staphylococciques : méticilline, nafcilline, et oxacilline et les premières céphalosporines (céfalotine, céfalaridine). Ces composés ont un groupement 6' acyl volumineux qui empêche l'attaque du noyau β -lactame, ce qui leur permet d'être actifs sur les souches de *S. aureus* possédant une pénicillinase.

En 1961, année de la sortie de la méticilline sur le marché, les premières souches résistantes à ce médicament apparaissent.

Alors que cette famille d'antibiotiques se fixe sur 3 protéines de liaison aux pénicillines (PLP ou PBP) : PLP 1, 2, 3 pour inhiber la synthèse du peptidoglycane, les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) possèdent une PLP supplémentaire : PLP 2' ou 2a qui a une affinité moindre pour les β -lactamines. Cette nouvelle cible est codée par un gène chromosomique *mecA* porté par un fragment additionnel d'ADN intégré à l'ADN des SARM. De très nombreux facteurs génomiques modulent la résistance à la méticilline. Cette résistance peut être soit homogène (haut niveau), soit hétérogène (bas niveau). Les souches résistantes à la méticilline de façon hétérogène ont seulement une faible proportion des bactéries qui est capable d'exprimer la résistance et de croître en présence de méticilline.

La méticillino-résistance est mise en évidence par :

- la recherche du gène *mecA* (amplification et hybridation)
- la recherche de la PLP 2a (test d'agglutination)
- la mesure des diamètres de l'oxacilline (ou de la céfoxitine) sur l'antibiogramme.

Pour favoriser l'expression de cette résistance hétérogène sur l'antibiogramme, on place un disque de méticilline (ou d'oxacilline qui est plus stable) :

- Soit sur une boîte Mueller Hinton hypersalé (5% NaCl) incubé à 37°C
- Soit sur une boîte Mueller Hinton incubée entre 25 et 30°C observée après 24 – 48h.

Une souche SARM est rendue résistante à toutes les β -lactamines y compris les céphalosporines et l'imipénème. Elles sont également productrices de pénicillinases et sont habituellement résistantes à d'autres antibiotiques : aminosides, tétracyclines, macrolides.

La recherche de la PLP2a se fait grâce à des réactions d'agglutination de particules de latex sensibilisées avec des anticorps anti PLP 2a, avec une sensibilité voisine de 100% et une excellente spécificité (Slidex MRSA detection Biomérieux Réf 73117).

Dix à 40% des souches hospitalières de *S. aureus* isolées en France sont résistantes à la méticilline.

Il existe 3 autres mécanismes de résistance à l'oxacilline non liés au gène *mec A* (49) :

- souches BORSA (Borderline *Staphylococcus aureus*) qui hyperproduisent une pénicillinase et qui n'ont ni PLP 2a ni gène *mec A*.

On observe la restauration de la sensibilité in vitro si l'oxacilline est associée à un inhibiteur de β -lactamase.

- quelques souches semblent produire une méticillinase, dont le rôle et le gène ne sont pas connus, cela en absence de gène *mecA*.

- souches MODSA (Modified *Staphylococcus aureus*) qui ont une modification des PLP, autres que la PLP 2a. Ce sont des souches résistantes à bas niveau à l'oxacilline et non productrices de β -lactamase.

Tous les phénotypes de résistance sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Phénotypes de résistance acquise de *S. aureus* aux β -lactamines (49)

Mécanisme	Pénicilline G Pénicilline A Carboxypénicilline Uréidopénicilline	AB + inhibiteur de β lactamase	Pénicilline M	Céphalosporine Carbapénème
Sauvage	S	S	S	S
Pénicillinase	R	S	S	S
Modification des PLP (Gène <i>mecA</i>)	R	R	R	R
BORSA (rare)	R	R	R	S
MODSA (rare)	S	S	R	S

2. Les aminosides

La résistance aux aminosides est essentiellement liée à l'acquisition d'enzymes inactivant ces antibiotiques : phosphotransférases, nucléotidyltransférases, et acétyltransférases.

Les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à la tobramycine et à la kanamycine (phénotype KTG) et présentent une sensibilité diminuée à la nétilmicine et à l'amikacine.

Les souches résistantes à la tobramycine et à la kanamycine (phénotype KT) sont résistantes aussi à l'amikacine et à la néomycine mais restent sensibles à la gentamicine et à la nétilmicine.

Les souches résistantes à la kanamycine et à la néomycine (phénotype KNeo) sont également résistantes à l'amikacine.

Les différents phénotypes sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Phénotypes de résistance de *S. aureus* aux aminosides (49)

Phénotype	Streptomycine	Kanamycine	Gentamicine	Tobramycine	Nétilmicine	Amikacine Isepamicine	Enzyme
S	R	S	S	S	S	S	ANT(6')
K Néo	S	R	S	S	S	s→R	APH(3')-III
KT	S	R	S	R	S	s→R	ANT(4')
KTG	S	R	R	R	s→R	s→R	APH(2'')AAC(6')
S+Knéo +KTG	R	R	R	R	R	s→R	APH(3')+APH(2'') +AAC(6')

s→R : lecture interprétative

ANT : aminoside nucléotidyltransférase / APH : Aminoside phosphotransférase / AAC : aminoside acétyltransférase

3. Les macrolides

S. aureus est normalement sensible à tous les macrolides. On peut observer trois mécanismes de résistance impliqués (tableau 3).

a) Modification de la cible ribosomale (sous - unité 30S)

Les souches résistantes produisent une méthylase responsable d'une diméthylation spécifique de l'ARNr 23S qui provoque un changement de conformation de l'ARN, réduisant l'affinité des MLS pour le ribosome.

Cette nouvelle cible est codée par les gènes *ermA*, *ermB*, et *ermC*.

L'expression de la résistance peut être soit inductible (résistance croisée pour tous les macrolides à 14 et 15 atomes de carbone et sensibilité aux macrolides à 16 atomes de carbone), soit constitutive (résistance croisée à tous les macrolides en C14, C15, C16, les lincosamides, et les streptogramines B : résistance de type MLSb).

La résistance au composé B ne modifie pas la synergie des 2 composants des streptogramines.

b) Inactivation de l'antibiotique

Par acquisition de plasmides, la bactérie peut synthétiser certaines enzymes, dont une adénylase responsable d'une résistance aux lincosamides.

Une acétyl transférase modifiant le facteur A, et une hydrolase modifiant le facteur B entraînent une résistance aux streptogramines.

Trois phénotypes sont possibles : LS_A , $(L)S_A+S_B$, MLS_B+S_A

c) Efflux actif de la molécule

L'expression de cette résistance est sous la dépendance du gène *msrA*, qui code pour la protéine MsrA responsable de l'élimination accrue de l'érythromycine intrabactérienne.

Tableau 3 : Phénotypes de résistance acquise des *S. aureus* aux MLS

Phénotypes	C 14+C15	C 16	Lincomycine (clinda)	S _B	S _A	Pristinamycine
MLS _B inducible	R	S	S	S	S	S
MLS _B constitutif	R	R	R	R	S	(S)
M	R	S	S	(S)	S	S
L	S	S	R	S	S	S
LS _A	S	S	I/R	S	R	s→I/R
S _A /S _B	S	S	S	R	R	R

→ : lecture interprétative

(S) : activité bactéricide diminuée

(C14 : érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine/ C15 : azithromycine/ C16: spiramycine, josamycine)

4. Les quinolones

Les staphylocoques sont naturellement résistants aux quinolones de 1^{ère} génération mais sont en revanche sensibles aux fluoroquinolones.

2 mécanismes de résistance ont été décrits.

a) Modification de la cible

La survenue de mutations chromosomiques dans les gènes *gyrA* et *parC* provoque une modification de la cible qui entraîne une diminution de la liaison des quinolones à leurs cibles intra-cellulaires : les complexes ADN-gyrase et ADN-topoisomérase IV.

La résistance est liée essentiellement à la sélection de mutants résistants, elle est croisée entre toutes les fluoroquinolones (tester péfloxacin et ofloxacin).

b) Efflux

Ce mode de résistance est surtout décrit pour la ciprofloxacine et l'ofloxacin.

5. La rifampicine

Elle reste active mais doit toujours être utilisée en association pour éviter la sélection de mutants résistants.

6. La fosfomycine

Les résistances à la fosfomycine sont dues à des mutations survenant à haute fréquence et portant sur le transport de l'antibiotique. Il doit être utilisé en association.

On a décrit le gène *fosB*, porté par des plasmides chez *S. aureus*, et qui entraînerait une inactivation de l'antibiotique par conjugaison au glutathion.

7. L'acide fusidique

Les résistances sont dues à des mutations survenant à haute fréquence et justifiant son utilisation en association.

8. Le chloramphénicol, les cyclines et le cotrimoxazole

Ils ne peuvent pas être considérés comme des antistaphylococciques de premier choix.

PARTIE II : LES GLYCOPEPTIDES

A - GENERALITES

La famille des glycopeptides comprend 2 antibiotiques utilisés actuellement en médecine humaine et réservés à l'usage hospitalier : la vancomycine et la teicoplanine. Les glycopeptides ne sont apparentés à aucune autre famille d'antibiotiques.

La vancomycine a été isolée en 1954 (Mc Cormick) à partir d'une bactérie (anciennement *Streptomyces*) *Amycolatopsis orientalis* contenue dans un échantillon de sol ramené de Bornéo. Son activité a d'abord été démontrée sur les staphylocoques dont la sensibilité vis-à-vis des agents classiques des années 50 diminuait (pénicilline, érythromycine, tétracyclines). Cette molécule est rapidement introduite en thérapeutique (1956) et commercialisée (1960) dans le traitement des infections à staphylocoques résistants à la pénicilline. Mais les fréquents effets indésirables dus à des impuretés et à l'apparition de nouvelles molécules comme la méticilline l'ont marginalisé.

Devant l'apparition des souches de *S. aureus* méticilline résistants (SARM) dans les années 80 et grâce à l'amélioration des techniques de purification sous chromatographie liquide haute performance (HPLC) en 1985, la vancomycine devient un antibiotique majeur pour le traitement des patients infectés par des SARM.

La teicoplanine, isolée à partir d'un *actinomyces*, *Actinoplanes teichomycetus* en 1978, est mise sur le marché en 1988 en France avec comme argument une meilleure tolérance.

Leurs spectres, limités aux bactéries gram positif, (car ils ne peuvent pas traverser la membrane des bactéries gram négatif) en font des agents thérapeutiques de premier choix pour traiter les infections dues aux SARM et à d'autres bactéries gram positif résistantes aux autres antibiotiques.

I. STRUCTURE

Les glycopeptides sont de volumineuses molécules de haut poids moléculaire (1450 daltons pour la vancomycine et 1890 daltons pour la teicoplanine).

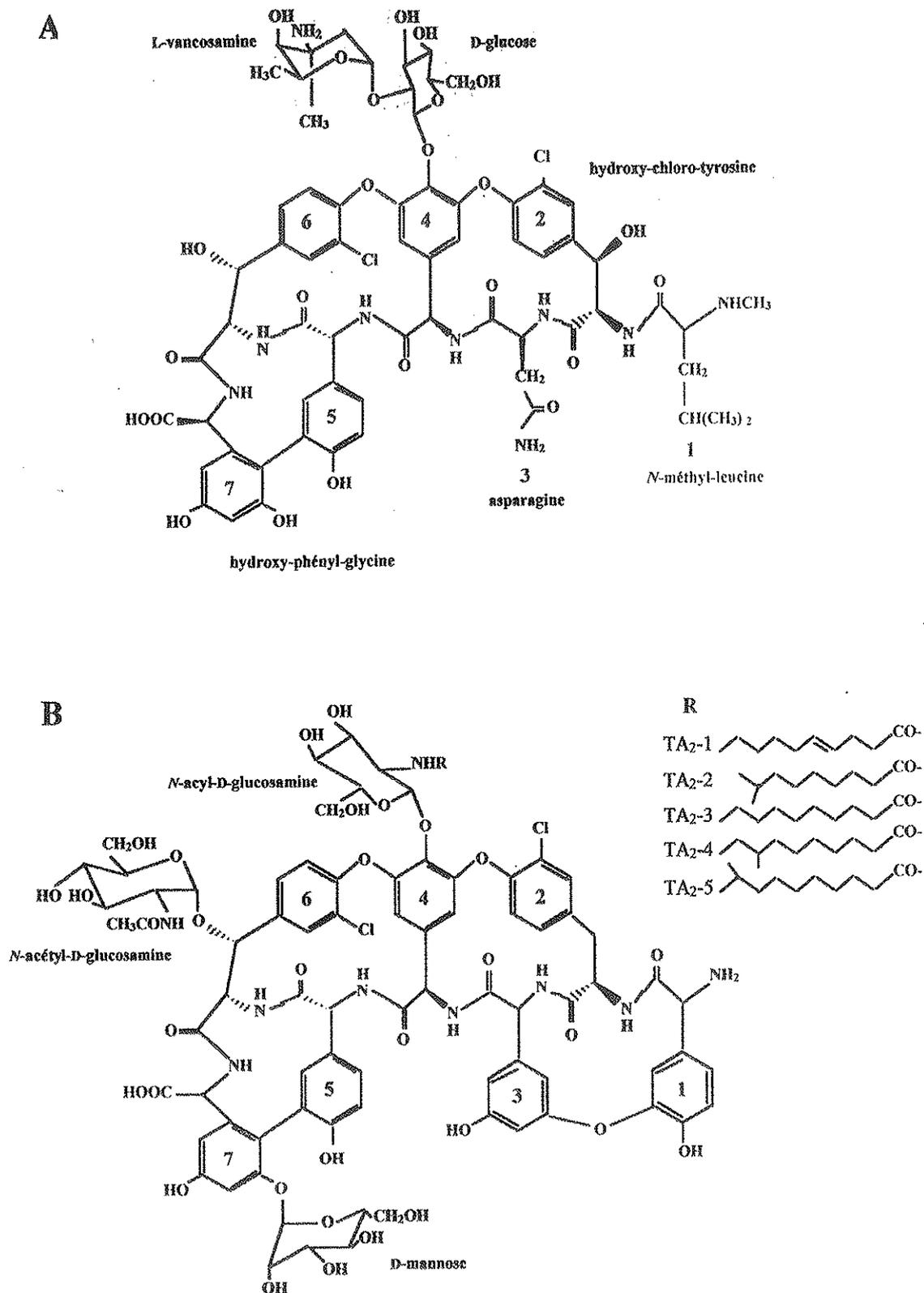


Figure 3 : structure de la vancomycine (A) et de la teicoplanine (B)

Ils comportent un noyau central peptidique de sept acides aminés (figure 3).

Les différences entre la vancomycine et la teicoplanine se situent au niveau des acides aminés 1 et 3 des substrats attachés aux groupes aromatiques des acides aminés.

La formule chimique de la vancomycine est $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ et ses acides aminés 1 et 3 sont respectivement la leucine et une asparagine alors qu'il s'agit de deux hydroxyphényl-glycines pour la teicoplanine.

La vancomycine est hydrosoluble si le pH est inférieur à 4 ; la teicoplanine est hydrosoluble et liposoluble, ce qui permet une meilleure pénétration tissulaire.

II. MECANISME D ACTION (57, 103)

Les glycopeptides sont des antibiotiques temps dépendant. Le mode d'action majeur est une inhibition de la synthèse du peptidoglycane avec pour conséquence la lyse bactérienne.

Dans le cas de la vancomycine, à ce mécanisme s'ajoutent deux autres modes d'action mineurs : l'altération de la perméabilité membranaire et l'inhibition de la synthèse d'ARN, ce qui lui confère probablement une certaine protection vis-à-vis du développement de résistances.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette famille d'antibiotiques, il est intéressant de rappeler les mécanismes de biosynthèse de la paroi cellulaire (cf figure 4).

Le peptidoglycane, constituant principal de la paroi des bactéries à Gram positif, est un polymère composé de chaînes linéaires polysaccharidiques constituées d'une alternance de sous-unités d'acide N-acétyl-muramique (NAM) et de N-acétyl-glucosamine (NAG).

Celles-ci sont reliées entre elles par des ponts peptidiques. Les précurseurs sont synthétisés dans le cytoplasme, puis transférés à la surface de la membrane et incorporés dans le peptidoglycane pré-existant.

L'étape initiale de production de monomères de muréine est la formation de glucosamine-1-phosphate à partir de glucose ou de glucosamine. La biosynthèse de la pyrimidine (UDP) se fait à partir de la glutamine via un certain nombre de réactions complexes ; celle-ci se lie à la glucosamine-1-phosphate pour former la première sous-unité d'UDP-N-Acétyl-glucosamine (UDP-NAG). L'étape suivante est la formation de la deuxième sous-unité à

partir d' UDP-NAG, ce qui implique la production initiale de phosphoénolpyruvate (PEP) à partir de glucose. La combinaison de l'UDP-NAG et de PEP donne la deuxième sous-unité acide UDP-N-Acétyl-muramique (UDP-NAM). Puis viennent se lier une L-Alanine, suivi de D-Glutamate, L-lysine, et D-Alanyl-D-Alanine pour former le pentapeptide UDP-NAM.

Celui-ci est transféré sur le C55-undécaprénylphosphate pour former LIPIDE-I. Ce phospholipide en C55 est un transporteur lipidique qui va prendre en charge ce précurseur et lui faire traverser la membrane cytoplasmique.

Cinq résidus de glycine sont ensuite fixés sur la L-lysine du pentapeptide UDP-NAM pour former une chaîne latérale de pentaglycine. Le D-glutamate de NAM est transformé en D-glutamine par transfert d'un groupement NH_4^+ provenant d'une molécule de L-glutamine libre dans le cytoplasme. Une sous-unité de NAG vient se lier.

Le complexe LIPIDE-II est transféré à travers la membrane où il est relié à la chaîne de peptidoglycane en synthèse grâce à l'action des transglycosylases, pour former la liaison NAG-NAM-pentapeptide-pentaglycine.

La transpeptidase relie la chaîne de pentaglycine d'un monomère à l'avant-dernier résidu de D-alanine du pentapeptide de la chaîne de peptidoglycane voisine, avec la libération d'une D-alanine du pentapeptide receveur. En théorie, la totalité des extrémités D-Alanyl-D-Alanine devrait être consommée dans ce procédé de transpeptidation ; en fait, 20% environ demeurent intactes.

Une troisième enzyme, la DD carboxypeptidase régule la croissance du peptidoglycane après transformation du pentapeptide en tétrapeptide par excision d'une D-Alanine des dipeptides D-Alanyl-D-Alanine terminaux qui n'ont pas été utilisés par les transpeptidases.

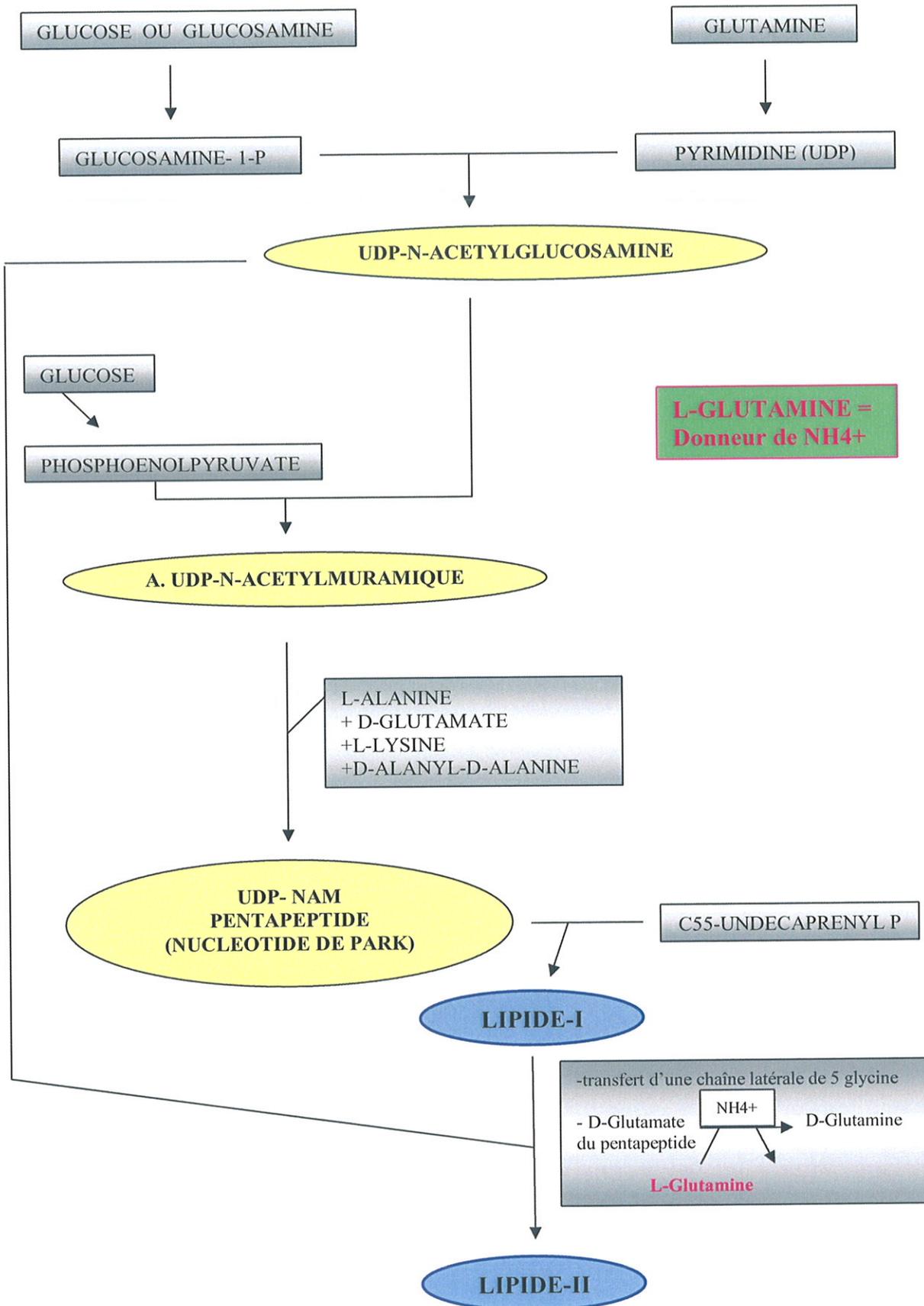


Figure 4 : Etapes de la synthèse du LIPIDE II d'après Ruzin (80)

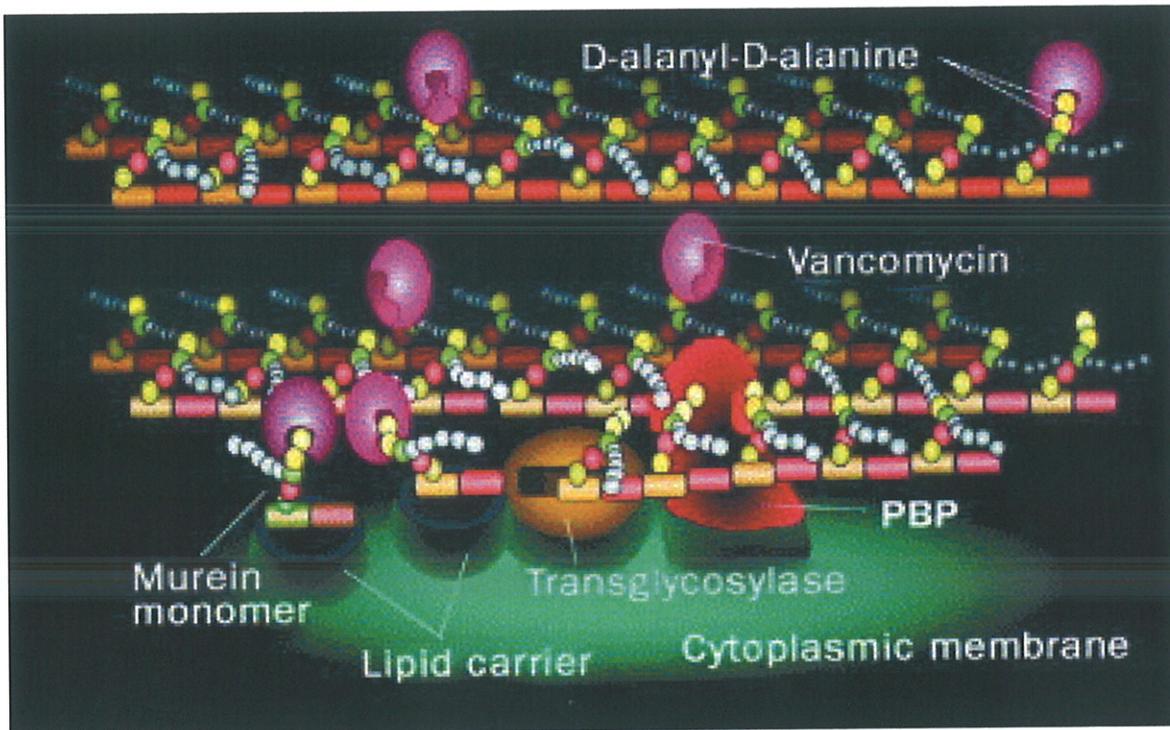


Figure 5 : Mécanisme d'action de la vancomycine - d'après Hiramatsu (38)

Les glycopeptides se fixent de manière spécifique sur les sites D-Alanyl-D-Alanine libres de la chaîne polysaccharidique et des monomères de muréine. Cette fixation forme une poche rigide qui gêne le positionnement des transglycosylases et masque le site d'action des transpeptidases chargées de former les ponts peptidiques du peptidoglycane.

Ceci aboutit à l'inhibition de la croissance puis à la mort bactérienne.

Les glycopeptides agissent donc par inhibition de la transglycosylase et de la transpeptidase par encombrement stérique interdisant l'accès aux enzymes. La vancomycine inhibe la synthèse et l'organisation du peptidoglycane à un stade plus précoce que les β -lactamines.

L'action bactéricide lente, de 24 à 48 heures, temps-dépendant avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) basses, situés entre 0,5 et 4 mg/L, se fait par le système autolytique de la bactérie.

III. PHARMACOCINETIQUE (33)

Les glycopeptides se caractérisent par l'absence de résorption digestive. Leur administration est donc parentérale pour un traitement systémique.

La vancomycine doit être administrée par voie IV en perfusion seulement, de préférence dans une veine à fort débit (nécroses tissulaires observées après injection IM), tandis que la teicoplanine peut être administrée par voie IM ou IV (perfusion ou voie IV directe)

La diffusion tissulaire est excellente, excepté au niveau du LCR où elle est dose-dépendante et fonction du degré d'inflammation des méninges.

La liaison protéique est différente pour les 2 antibiotiques : 30 à 55% pour la vancomycine contre 90 à 95% pour la teicoplanine (cette fixation augmentée est à l'origine d'un relargage lent qui explique la demi vie plus longue). La vancomycine présente une demi-vie courte (6 à 8 heures) tandis que la teicoplanine possède une demi vie longue (40 à 70 heures) autorisant une seule injection par jour.

L'élimination est principalement rénale par filtration glomérulaire ce qui incite à pratiquer de dosages plasmatiques chez l'insuffisant rénal pour adapter les posologies.

IV. SPECTRE D'ACTIVITE (15)

Les glycopeptides ont un spectre d'activité étroit largement limité aux bactéries à gram positif, car ils ne peuvent pas traverser la membrane externe des bactéries gram négatif.

Il comprend : *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative, sensibles ou résistants à la pénicilline ou à la méticilline, les streptocoques, y compris les pneumocoques et les entérocoques, les corynebactéries, *Listeria* et certains *Clostridium* en particulier *Clostridium difficile*.

Outre les bactéries à gram négatif (excepté *Flavobacterium meningosepticum*) certaines bactéries à gram positif sont naturellement résistantes aux glycopeptides : *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Nocardia*, ainsi que certaines souches de *Lactobacillus*. Certains entérocoques présentent un bas niveau de résistance à la vancomycine : *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*.

La teicoplanine a une activité un peu plus importante vis-à-vis des *S. aureus*, des streptocoques et des *Clostridium*, et un peu plus faible vis-à-vis de certains staphylocoques coagulase négative (en particulier *S. haemolyticus*).

V. EFFETS INDESIRABLES

Les progrès réalisés dans les techniques de purification ont notablement diminué l'incidence des effets secondaires.

Les glycopeptides peuvent produire des réactions d'intolérance locale qui se manifestent sous forme de phlébotoxicité, plus fréquentes avec la vancomycine, ce qui oblige à administrer le produit dilué. On décrit également l'apparition de douleurs locales après l'administration intramusculaire de teicoplanine (chez 10% des patients).

On décrit des réactions d'hypersensibilité survenant pendant ou immédiatement après l'administration IV. Après une administration trop rapide, des hypotensions sévères avec arrêt cardiaque ainsi que des réactions anaphylactoïdes ont été rapportées. Une réaction caractérisée par l'apparition d'un érythème au cou et à la partie supérieure du tronc (appelée « red man syndrom » ou syndrome de la nuque rouge) accompagnée d'une sensation d'angoisse, de dyspnée, et de démangeaisons est due à la libération d'histamine à la suite d'une administration IV trop rapide (27).

La fréquence de ces réactions serait moindre avec la teicoplanine.

Une surveillance des fonctions rénales et auditives est indispensable.

La néphrotoxicité est rare lorsque la vancomycine est administrée seule. Elle devient plus fréquente lorsque la vancomycine est associée par exemple à un aminoside ou lorsqu'il y a surdosage. Il est donc nécessaire de surveiller les taux sériques. La posologie doit être adaptée, en fonction de la clairance à la créatinine, chez le sujet âgé et l'insuffisant rénal.

La toxicité auditive (à prédominance cochléaire), secondaire à une altération de la fonction rénale, le plus souvent réversible à l'arrêt du traitement, est concentration-dépendante. Pour la vancomycine, elle est rare pour des concentrations plasmatiques inférieures à 30 mg/L, fréquente au dessus de 80 mg/L.

Avec la teicoplanine, la toxicité sur l'oreille semble rare et la néphrotoxicité est moins fréquente.

Une neutropénie réversible peut être observée chez 2% des patients ayant reçu de la vancomycine.

La teicoplanine est contre-indiquée chez la femme enceinte et allaitante ainsi que chez le nouveau né (son innocuité n'ayant pas été véritablement établie).

VI. SUIVI DU TRAITEMENT (27)

Compte tenu de son faible index thérapeutique, de sa néphrotoxicité, de son ototoxicité et de sa forte variabilité intra- et interindividuelle, un suivi pharmacologique de la vancomycine est justifié afin de prévenir l'accumulation rénale tout en maintenant une concentration plasmatique suffisante pour conserver une efficacité et prévenir les résistances. En perfusion continue, une concentration sérique comprise entre 20 mg/L et 40 mg/L est recommandée. En perfusion pluri-quotidienne, les concentrations recommandées sont comprises entre 20 et 40 mg/L pour la C_{max} et 10 à 20 mg/L pour la C_{min}, exception faite des endocardites à *S. aureus* où la C_{min} doit être maintenue entre 20 et 25 mg/L. La dose journalière standard de vancomycine chez l'adulte avec une fonction rénale normale est de 1g toutes les 12 heures, correspondant à 30 mg/kg/jour ou éventuellement 1g toutes les 8 heures durant les 2-3 premiers jours d'une infection sévère.

Le monitoring est utile et recommandé chez les patients ayant une fonction rénale altérée, les patients recevant des doses supérieures à la moyenne ou une association d'antibiotiques néphrotoxiques (aminosides), et ceux dont le volume de distribution est modifié (grands brûlés, enfants, obèses).

Dans le cas de la teicoplanine et compte tenu de sa longue demi vie, l'utilisation d'une dose de charge suivie d'une seule administration quotidienne est préconisée. Un taux résiduel >10 mg/L obtenu par une dose de charge (3 injections de 6 mg/kg à 12 heures d'intervalle) suivie d'une injection quotidienne (6 mg/kg) en l'absence d'insuffisance rénale, est préconisé pour la plupart des infections à germes sensibles (CMI < 4mg/L). Dans le cas d'endocardite à *S. aureus* le taux doit être maintenu > 20 mg/L.

VII. INDICATIONS (15, 33, 57)

Les glycopeptides sont indiqués dans le traitement hospitalier des infections documentées à cocci Gram positif en cas de résistance ou d'allergie aux β lactamines et restent le traitement probabiliste de choix des états infectieux graves, en association avec des antibiotiques actifs sur les bactéries à gram négatif.

Les principales indications sont les infections à staphylocoques résistants à la méticilline ou sensibles mais chez le patient allergique aux β -lactamines, les infections péritonéales lors de dialyse péritonéale chronique seul ou associé à la rifampicine, les infections à streptocoques, les endocardites à entérocoques et les infections à germes gram positif multi résistants (*Corynebacterium jeikeium*, pneumocoques résistants à la pénicilline, ...).

Ils sont recommandés en antibioprophylaxie chez des sujets allergiques aux β lactamines.

Ils ont une indication formelle pour la prévention de l'endocardite bactérienne, à la dose de 1g IV perfusé durant les 60 minutes précédant l'acte chirurgical.

Le traitement en 2^{ème} intention (si échec du métronidazole) de la colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile* est la vancomycine par voie orale à la dose de 125mg toutes les 6 heures pendant 7 à 10 jours.

PARTIE II : LES GLYCOPEPTIDES

B - RESISTANCE

I. HISTORIQUE DE LA RESISTANCE (88)

Pendant de nombreuses années, les microbiologistes se sont demandés pourquoi ils devaient tester la sensibilité des cocci gram positif vis-à-vis de la vancomycine alors que ces organismes étaient toujours sensibles.

En 1988, Leclercq et al décrivent dans le *New England Journal of Medicine* (56) la première souche d' *Enterococcus faecium* ayant acquis un plasmide de résistance à la vancomycine chez un patient en France. Cette même année, Uttley et al (96) rapportent, en Grande Bretagne, l'isolement de 48 souches d' *E. faecium* et de 7 souches d' *E. faecalis* résistantes à la vancomycine isolées chez 22 patients insuffisants rénaux. Le mécanisme de la résistance est porté par un opéron de 5 gènes qui orchestre le remplacement du dipeptide (D-Alanyl-D-Alanine) de la paroi, incluant le site de liaison de la vancomycine, par un depsipeptide (D-Alanyl-D-Lactate), qui ne lie pas la vancomycine.

En 1992, Noble et son équipe (70) ont réussi le transfert conjugatif de l'opéron *vanA* d' *E. faecalis* résistant à la vancomycine vers *S. aureus*. Cette expérience a montré que les souches de *S. aureus* pouvaient recevoir et exprimer la résistance *vanA*.

En 1997, la première souche de *S. aureus*, SARM, de sensibilité diminuée à la vancomycine a été publiée au Japon (41). Elle a été isolée chez un enfant de 4 mois qui avait reçu de multiples cures de vancomycine pour une infection sur cicatrice sternale. Cette souche Mu50, dont la CMI de la vancomycine était de 8 mg/L, ne contenait pas *vanA* ni aucun des autres déterminants de la résistance à la vancomycine des entérocoques. La sensibilité diminuée de cette souche a été attribuée à une augmentation inhabituelle de l'épaisseur de la paroi bactérienne.

Un deuxième type de souche ayant une sensibilité diminuée à la vancomycine dite hétérogène a été décrite au Japon (39). Cette souche Mu3 (CMI de 3 mg/L) a été isolée d'une expectoration d'un patient de 64 ans ayant eu une pneumonie à SARM après opération d'un cancer du poumon primaire et échec de la thérapeutique par la vancomycine.

Des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été décrites aux Etats-Unis (1, 85), en France (77), en Belgique (28), au Royaume Uni (42), en Espagne (9), en Allemagne (14,

34), en Italie (63) et semblent s'être développées à partir d'infections à SARM (87). Toutes ces souches possèdent des parois bactériennes inhabituellement épaissies, semblent avoir une croissance sur gélose plus lente que les souches sensibles à la vancomycine et surtout ne sont pas détectées par les techniques classiques d'antibiogramme par diffusion sur gélose.

En juin 2002, la première souche VRSA contenant *vanA* (21) a été isolée chez un patient de 40 ans, diabétique et dialysé en ambulatoire dans le Michigan. Après avoir reçu diverses cures de vancomycine pour le traitement d'une surinfection chronique d'un ulcère du pied, le malade a développé une septicémie à SARM après une amputation. En juin 2002, une souche SARM isolée d'un cathéter présente une CMI de la vancomycine élevée, à 1024 mg/L.

Le mécanisme par lequel le gène de résistance *vanA* a été transféré à une souche SARM, implique le transfert d'un plasmide d'entérocoque contenant le transposon *vanA*, Tn1546, d'une souche d'*E. faecalis* vers une souche SARM contenant son propre plasmide de 45kb, codant pour une β -lactamase et la résistance à la gentamicine.

Cette nouvelle souche, VRSA, contient donc un nouveau plasmide chimérique de 57kb contenant Tn 1546. Ce nouveau plasmide garde sa capacité de transférer la résistance à la vancomycine à d'autres staphylocoques et d'exprimer pleinement la résistance (93).

Deux mois plus tard, un deuxième VRSA a été isolé d'un patient en Pennsylvanie (94) à partir d'un ulcère chronique du talon. La CMI de la vancomycine de cette souche est de 32 mg/L et elle contient également le gène *vanA*. Dans ce cas, le gène de résistance *vanA* est porté par un plasmide chimérique d'environ 130kb contenant des séquences plasmidiques d'entérocoques et de staphylocoques. En effet, dans ce cas, le procédé d'intégration se fait en 2 temps : tout d'abord, la conjugaison suivie de l'intégration dans le génôme de la cellule hôte (24). Le transposon Tn1546 a subi quelques modifications : une importante délétion de nucléotides en amont de *vanA*, et 2 insertions de séquences (23).

Ces différences au niveau de Tn 1546 pourraient expliquer la différence de CMI entre les 2 souches, mais permettent également de penser que les deux premières souches VRSA sont le résultat d'événements génétiques indépendants (107).

La différence entre les CMI (32 mg/L pour la souche de Pennsylvanie et 1024 mg/L pour la souche du Michigan) peut s'expliquer par l'instabilité du grand plasmide dans lequel *vanA* est inséré (93).

Une 3^{ème} souche VRSA a été isolée en 2004, à New York (2), dans l'urine d'un patient hospitalisé dans un service de long séjour. La CMI de la vancomycine de cette souche est de 64 mg/L. Elle est porteuse des gènes *mecA* et *vanA*. La caractérisation de cette souche est en cours.

Une 4^{ème} souche VRSA aurait été isolée début 2005 dans le Michigan sans aucun lien avec la 1^{ère} souche isolée en 2002 (93).

II. LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE

1. VRSA

Le terme **VRSA** (Vancomycin-resistant *S. aureus*) suggère l'échec de la vancomycine pour éradiquer l'infection à *S. aureus* même si elle a été administrée à des doses appropriées durant une période adaptée.

Aux Etats-Unis, ce terme est réservé à des souches ayant des CMI vancomycine ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ (87).

2. VISA ou GISA

Les termes **VISA** (Vancomycine intermédiaire *S. aureus*) et **GISA** (glycopeptide intermédiaire *S. aureus*) sont définis différemment en fonction des sociétés (89).

Le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory standards) aux Etats-Unis définit comme « sensible » des souches dont la CMI vancomycine est ≤ 4 mg/L

« intermédiaire » des souches dont la CMI vancomycine est comprise entre 8 et 16 mg/L

« résistant » des souches dont la CMI vancomycine est ≥ 32 mg/L.

De la même façon pour la teicoplanine (un antibiotique non utilisé aux Etats-Unis), les souches sont dites

« sensibles » pour des CMI ≤ 8 mg/L

« intermédiaires » pour des CMI de 16 mg/L

« résistantes » pour des CMI ≥ 32 mg/L

La même définition est publiée par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie)(5).

Par contre, la BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) utilise différents seuils et classe comme

« sensible » les souches dont la CMI vancomycine est ≤ 4 mg/L

« résistant » les souches dont la CMI vancomycine est ≥ 8 mg/L

Ces critères sont également utilisés au Japon.

Ainsi, les limites anglaises et japonaises de résistance étant 8 mg/L, certaines souches seront appelées GRSA ou VRSA dans leurs publications alors qu'elles sont considérées GISA ou VISA aux Etats-Unis ou en France.

Même si le terme GISA est techniquement plus précis pour définir les souches, sachant que la majorité sont classées comme intermédiaire à la vancomycine et à la teicoplanine, le terme VISA est souvent préféré pour communiquer la résistance, par comparaison au terme VRE (vancomycin resistant enterococci)(91).

Tous ces critères sont résumés dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Catégorisation clinique des souches de *Staphylococcus aureus* selon les valeurs critiques de la CMI (mg/L) de la vancomycine

REFERENCE	SENSIBLE	INTERMEDIAIRE	RESISTANT
NCCLS	≤ 4	8 – 16	≥ 32
CA-SFM	≤ 4	8 – 16	≥ 32
BSAC	≤ 4	~	≥ 8
SRGA	≤ 4	~	≥ 8

CMI : concentration minimale inhibitrice ; NCCLS : National Committee for Clinical laboratory Standards ; CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie ; BSAC : British Society for Antimicrobial Chemotherapy ; SRGA : Swedish Reference Group for Antibiotics

Tableau 5 : Catégorisation clinique des souches de *Staphylococcus aureus* selon les valeurs critiques de la CMI (mg/L) de la teicoplanine

REFERENCE	SENSIBLE	INTERMEDIAIRE	RESISTANT
NCCLS	≤ 8	16	≥ 32
CA-SFM	≤ 4	8 – 16	≥ 32
BSAC	≤ 4	~	≥ 8
SRGA	≤ 4	~	≥ 8

CMI : concentration minimale inhibitrice ; NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards ; CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie ; BSAC : British Society for Antimicrobial Chemotherapy ; SRGA : Swedish Reference Group for Antibiotics

Le CDC a proposé 3 critères qui permettent d'identifier les souches GISA (89):

- CMI en milieu liquide entre 8-16 mg/L
- CMI par E-test ≥ 6 mg/L
- Croissance sur milieux commerciaux BHIA (Brain Heart Infusion Agar) contenant 6 mg/L de vancomycine.

3. Hétéro-GISA (hGISA) ou hétéro-VISA (hVISA).

L'hétéro-résistance à la vancomycine a été tout d'abord rapportée par Hiramatsu (39). Il a décrit une souche Mu3, trouvée sensible par la technique des CMI (CMI de la vancomycine = 3 mg/L), mais qui possédait une sous-population ($\sim 10^{-6}$) qui pouvait croître en présence de plus de 4 mg/L de vancomycine dans un milieu, comme le BHIA (brain heart infusion agar).

En fait, les hétéro-GISA sont des *S. aureus* dont les CMI vis-à-vis de glycopeptides sont comprises entre 1 et 4 mg/L, mais au sein desquels il existe des sous-populations bactériennes capables de se développer sur un milieu contenant 4 mg/L de vancomycine. Les CMI de ses sous-populations vis-à-vis des glycopeptides sont 2 à 8 fois plus élevées (62).

Walsh et Howe (103) ont rajouté une condition à cette définition : l'hétérogénéité de la souche doit être montrée par analyse de population (figure 6). Selon eux, on définit l'hétéro-résistance d'un *S. aureus* par un ratio entre l'aire sous la courbe de l'étude de population de la souche et celle de la courbe témoin Mu3 qui doit être $\geq 0,90$.

L'analyse de population est la meilleure méthode pour identifier ces hGISA car elle étudie de 10^7 à 10^9 UFC (unités formant colonies) contre les 10^4 UFC étudiées par les méthodes standard.

Bien que leur impact clinique soit remis en question, ce type de souches semble être associé à des échecs thérapeutiques et pourrait représenter la première étape vers l'émergence de mutants résistants aux glycopeptides. Hiramatsu les décrit comme des précurseurs des GISA (38). Les souches GISA sont définies comme des homo-GISA par opposition aux souches hétéro GISA ou hGISA.

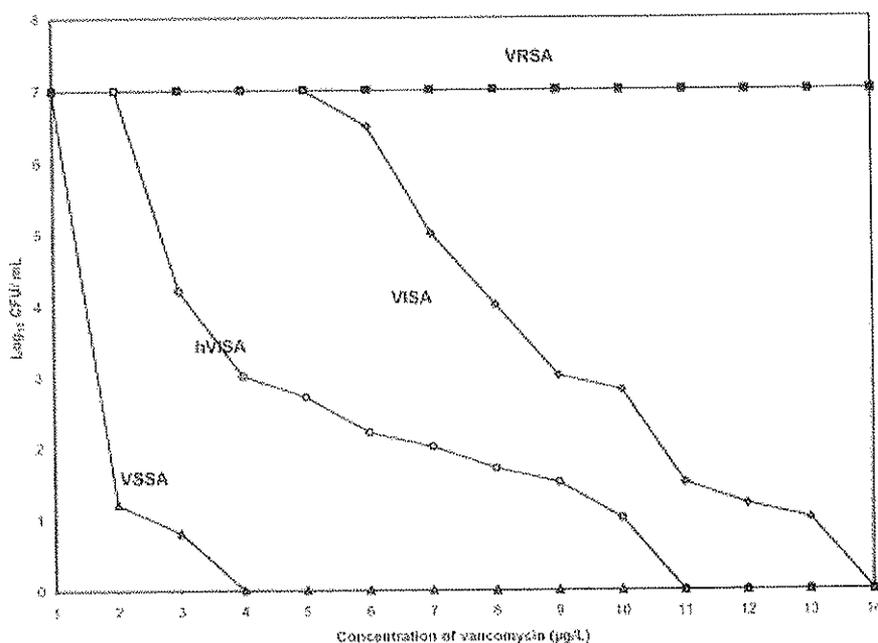


Figure 6 : Exemple de courbes d'analyse de population d'après Liu (58)

VSSA : *S. aureus* sensible à la vancomycine

Ce phénomène d'hétérorésistance peut être rapproché de la résistance hétérogène à la méticilline. En effet, bien que les souches hGISA soient rangées dans la catégorie « sensible » à la vancomycine selon les critères de CMI, elles génèrent à une haute fréquence des souches GISA parmi leur population.

Parmi toutes les souches GISA et hGISA isolées de part le monde, il existe un certain nombre de caractéristiques que l'on retrouve dans toutes les souches. La principale est une paroi cellulaire anormalement épaissie. On trouve en plus chez certaines souches une susceptibilité réduite à la lysostaphine et une capacité d'autolyse diminuée (103). On a démontré également, par des études de turbidimétrie, qu'elles avaient une croissance plus lente (89).

D'un point de vue macroscopique, ces souches paraissent dissociées avec des morphologies variables sur les cultures primaires et les subcultures (64), ceci permettant d'objectiver la résistance (figure 7).

Une autre caractéristique pouvant poser problème dans le diagnostic au laboratoire est le fait que certaines souches ont une coagulase faible voire négative (103).



Figure 7 : Culture de LIM2 (souche GISA isolée à Limoges) (77) sur BHI contenant 4mg/L de vancomycine

Caractéristiques des GISA :

- paroi bactérienne épaissie
- susceptibilité réduite à la lysostaphine
- autolyse réduite
- croissance ralentie
- aspect dissocié des colonies sur gélose

4. Variants stables et instables

Le phénotype de résistance à la vancomycine n'est pas stable. Après plusieurs passages sur des milieux ne contenant pas de glycopeptides (15 jours dans l'étude de Boyle-Vavra) (18), il est possible d'obtenir des révertants pour lesquels les CMI des glycopeptides sont diminuées par rapport aux souches de GISA dont elles sont issues.

Ces souches possèdent les mêmes propriétés que leurs parents en ce qui concerne l'activité hémolytique, la susceptibilité à la lysostaphine et l'activité de la coagulase (18).

Hiramatsu (38) a émis l'hypothèse qu'il y avait 2 types d'hétérorésistance : stable et instable (figure 8).

Le variant stable proviendrait soit de différents cycles d'exposition à la vancomycine ou à l'acquisition d'une altération génétique unique mais stable.

Le variant instable n'exprime sa résistance qu'en présence de glycopeptides.

Les problèmes de détection au laboratoire viendraient de là. Ces souches exprimeraient leur hétéro-résistance chez un patient soumis à une thérapeutique avec vancomycine mais le phénotype se perdrait lors de l'isolement de la souche sur des milieux simples sans antibiotique, contribuant à la sous-estimation de la prévalence des hGISA.

Pour certains auteurs (25, 38), ces révertants seraient des hGISA. Le passage d'une résistance hétérogène à une résistance homogène serait secondaire à l'administration de glycopeptides. En l'absence de pression de sélection par l'antibiotique, les GISA retourneraient à l'état de hGISA.

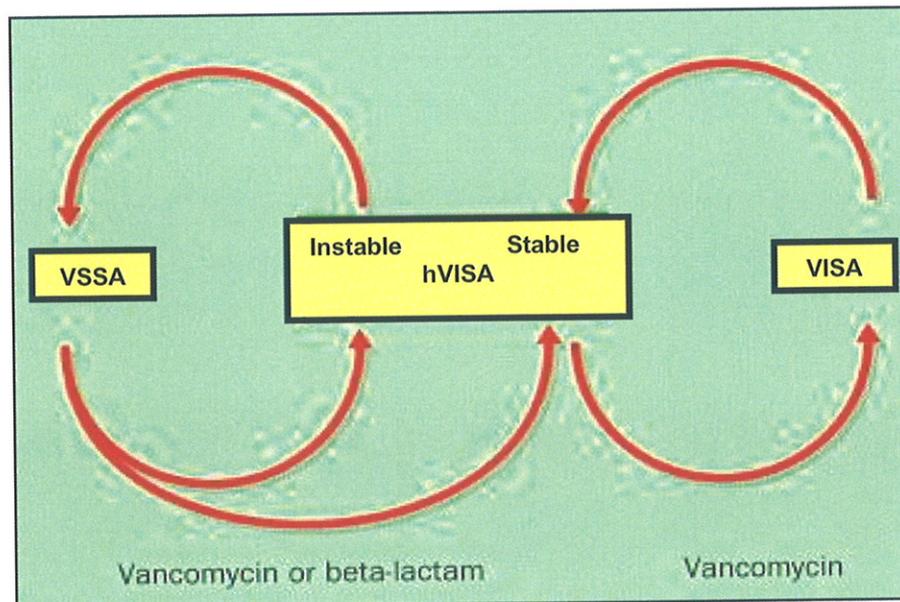


Figure 8 : Place des hVISA dans la résistance des *S. aureus* aux glycopeptides - d'après Hiramatsu (38)

III. MECANISMES DE LA RESISTANCE

1. Souches résistantes aux glycopeptides

Les souches de très haut niveau de résistance aux glycopeptides isolées récemment aux États-Unis sont dues à l'acquisition du gène *vanA* impliqué dans la résistance des entérocoques (2, 21, 94).

Ce gène *vanA* est porté par un transposon, Tn1546, qui s'intègre dans un plasmide de conjugaison, pLW1043 (40, 106).

L'expression de ce gène entraîne la formation, à la place des résidus D-Alanyl-D-Alanine, de résidus D-Alanyl-D-Lactate présentant une faible affinité pour la vancomycine et à un moindre degré pour la teicoplanine. Il s'agit de premiers cas de transfert *in vivo* de ce gène entre un entérocoque et *S. aureus*.

La CMI de la vancomycine est ici supérieure à celle de la teicoplanine ; alors que c'est l'inverse chez les *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (67).

2. Souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides

Les processus impliqués dans la résistance sont encore mal connus. Les résultats issus des différentes études réalisées sur des souches hGISA n'étayaient pas l'hypothèse d'un seul mécanisme mais l'existence de plusieurs mécanismes plus ou moins associés.

L'une des principales différences entre les souches résistantes et les souches sensibles aux glycopeptides est l'épaisseur de la paroi bactérienne avec un degré de réticulation faible (25).

a) Epaisseur accrue de la paroi bactérienne

Il est bon de rappeler que les cibles de glycopeptides sont les résidus D-Alanyl-D-Alanine des monomères de muréine.

On peut distinguer deux types de cibles (figure 9) :

- les résidus D-Alanyl-D-Alanine dans les couches de peptidoglycane ou ceux des chaînes de peptidoglycane en synthèse ;
- les monomères de muréine situés dans la membrane cytoplasmique qui servent de substrats aux transglycosylases.

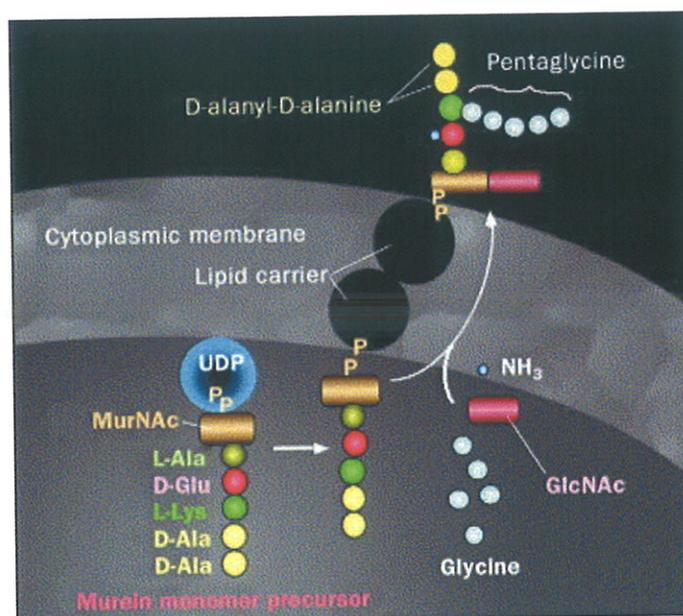


Figure 9 : Action de la vancomycine d'après Hiramatsu (38)

La liaison des glycopeptides avec le premier type de cible n'inhibe pas complètement la synthèse du peptidoglycane bien qu'elle interfère avec la formation de ponts interpeptidiques catalysée par les transpeptidases (PLP). Par contre, la liaison des glycopeptides avec les monomères de la membrane cytoplasmique inhibe la synthèse du peptidoglycane et la cellule cesse de se multiplier.

Avant d'atteindre ces cibles, les molécules d'antibiotiques doivent traverser une vingtaine de couches de peptidoglycane sans être piégées par le premier type de cibles. Les couches de peptidoglycane possèdent beaucoup d'extrémités D-Alanyl-D-Alanine libres qui peuvent se lier aux glycopeptides.

L'observation de la paroi de la souche Mu50 (GISA) en microscopie électronique a permis de conclure qu'elle produisait des taux élevés de peptidoglycane. On a observé plus de monomères de muréine et plus de couches de peptidoglycane (environ 30 – 40 couches contre environ 20 chez les VSSA) (36).

Le peptidoglycane de Mu50 a une capacité 1,4 fois supérieure à fixer des molécules de vancomycine que celui de Mu3 (hGISA) (37).

Il a été mis en évidence une corrélation entre l'accroissement de l'épaisseur du peptidoglycane et l'augmentation de la CMI des glycopeptides. Cui et al. (25) ont démontré une relation statistiquement significative entre l'épaisseur de la paroi bactérienne et les CMI de la vancomycine en étudiant 48 souches de *S. aureus*. Plus la paroi est épaisse, plus les molécules de vancomycine sont séquestrées, ainsi un nombre réduit de molécules d'antibiotique va atteindre la membrane cytoplasmique où se situent les cibles.

Pour expliquer l'épaisseur inhabituelle de la paroi cellulaire, deux mécanismes peuvent être mis en cause :

- L'accélération de la synthèse du peptidoglycane
- La réduction de l'activité catalytique

➤ Accélération de la synthèse du peptidoglycane

Chez les souches Mu3 (hGISA) et Mu50 (GISA), il a été observé une synthèse de la paroi cellulaire et un turnover accélérés. Ceci est démontré par l'incorporation augmentée de N-acétylglucosamine (NAG) dans la paroi (de 3 à 20 fois plus), le pool cytoplasmique augmenté de précurseurs de monomères de muréine (UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide) (de 3 à 8 fois plus), et de taux augmentés de penicillin-binding protein 2 (PLP 2 et PLP 2') (de 3 à 5 fois le taux des VSSA) (36).

L'accélération de la synthèse du peptidoglycane entraîne une augmentation du nombre de sites D-alanyl-D-alanine disponibles pour fixer des glycopeptides. Une quantité supérieure de antibiotiques sera donc nécessaire pour atteindre les sites actifs au niveau de la membrane cytoplasmique. Ce mécanisme de séquestration de l'antibiotique est appelé « affinity trapping » (38).

Cui et al (26, 38) ont également démontré que la structure des couches les plus externes de peptidoglycane peut être détruite par les molécules, de glycopeptides séquestrées, ce qui empêche la pénétration ultérieure d'autres molécules d'antibiotiques : il s'agit du « clogging phenomenon »

Certains auteurs ont montré l'augmentation des PLP 2 et 2' chez les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (36, 110).

Ces PLP se fixent sur l'extrémité D-Alanyl-D-Alanine et ont une activité de transpeptidation, dernière étape de la synthèse du peptidoglycane. Elles masqueraient les sites D-Alanyl-D-Alanine de fixation des glycopeptides, diminuant ainsi leur activité bactéricide.

Cette élévation isolée du taux des PLP pourrait jouer un rôle spécifique dans la diminution de la sensibilité à la teicoplanine. Historiquement, *S. aureus* a acquis la résistance à la teicoplanine avant la résistance à la vancomycine. Il a été démontré que la surexpression de PLP 2' chez une souche VSSA entraîne une augmentation de la CMI de la vancomycine de 1 µg/mL alors que la CMI de la teicoplanine augmente de 2 à 8 µg/mL. Ceci serait dû au fait que la teicoplanine inhiberait plus la transpeptidation que la vancomycine, dont l'action prédominerait sur la transglycosylation (38).

De même, l'inactivation du gène *pbpB*, codant pour la protéine PLP 2, entraîne la réduction de la résistance aux glycopeptides chez des staphylocoques mutants (84).

➤ Réduction de l'activité catalytique

Des nouvelles couches de peptidoglycane sont sans cesse produites à la surface de la membrane cytoplasmique et remplacent les couches plus anciennes qui seront détruites grâce des enzymes autolytiques (enzymes hydrolysant le peptidoglycane).

On observe chez les GISA une altération de ces enzymes autolytiques. Il a été montré, par Northern Blot, que l'expression d'*atl*, le gène le plus important des autolysines, était diminuée de façon significative. De plus, la réduction de l'activité serait liée à la diminution de la sensibilité à la lysostaphine (la sensibilité à la lysostaphine est diminuée dans les cellules entières et augmentée dans les parois cellulaires purifiées) (53).

b) Faible degré de réticulation

Deux théories ont été proposées pour expliquer le faible degré de réticulation : l'« amidation » réduite des mucopeptides et la diminution de l'expression de PLP 4 (103).

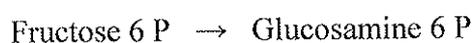
➤ L' « amidation » réduite des muopeptides.

L'accélération de la synthèse et du renouvellement de la paroi bactérienne de ces souches semble nécessiter une augmentation de la quantité de NAM (A.N-Acétyl-muramique) disponible et une accélération du captage du NAG (N-Acétyl glucosamine). Cette augmentation des besoins en précurseurs nécessiterait l'activation d'une seconde voie de synthèse du NAG, entraînant une consommation accrue de glutamine ; la disponibilité de cette dernière deviendrait alors insuffisante pour fournir un groupement NH₄⁺ à l'iso-D-glutamate. Ces souches à paroi bactérienne épaissie ont une proportion supérieure de pentapeptides contenant un acide aminé iso-D-glutamate n'ayant pas reçu de groupement NH₄⁺. Le défaut d'amidation qui en résulte semble responsable d'un degré de réticulation plus faible du peptidoglycane ce qui permettrait d'augmenter le nombre de sites D-Alanyl-D-Alanine disponibles pour empêcher les glycopeptides d'atteindre leur cible en fixant ceux-ci à la surface externe des bactéries.

De plus, les extrémités D-Alanyl-D-Alanine des peptidoglycanes présentant un défaut d'amidation du glutamate pourraient avoir une affinité supérieure pour les glycopeptides (37). En augmentant le nombre de sites de liaison et en accroissant l'affinité de ces derniers pour les glycopeptides, *S. aureus* peut réduire le nombre de molécules d'antibiotiques atteignant les sites actifs au niveau de la membrane cytoplasmique. L'accélération de synthèse de la paroi aurait un coût énergétique important, qui pourrait être responsable de la vitesse de croissance plus lente des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Au cours de la synthèse du peptidoglycane, lors de l'étape de pré-transfert vers la membrane cytoplasmique le groupement D-Glutamate du complexe pentapeptide est converti en D-Glutamine (figure 4). Les muopeptides contenant un groupement D-Glutamine au lieu d'un groupement D-Glutamate seraient des substrats moins spécifiques des transpeptidases, ce qui expliquerait pourquoi il y a moins de liaisons formées.

L'anabolisme du peptidoglycane est fortement dépendant de la disponibilité du **L-glutamine**. Il agit comme un donneur de groupements amine dans la réaction :



aboutissant à la production de NAG.

C'est un composant initial du Phospho Enol Pyruvate (PEP) dans la formation de NAM.

De plus, il agit également comme un donneur de groupement aminé pour transformer le D-glutamate du pentapeptide en D-glutamine. Cette réaction est catalysée par une Glutamine synthétase, qui est une des enzymes les plus régulée de la cellule bactérienne. Elle serait inhibée par la Glucosamine 6 P et activée en présence de 2-kétoglutarate ou de L-Glutamate (103).

Chez Mu50, il a été montré que la cellule utilisait préférentiellement le glucose par rapport au glucosamine de l'environnement pour synthétiser le peptidoglycane (26). Ainsi, le pool de L-glutamine est diminué par la production augmentée de glucosamine-6-P dans la formation de glucosamine-1-P et par voie de conséquence dans la formation de NAG. Par conséquent, la quantité de L-glutamine disponible pour l'« amidation » du D-glutamate du pentapeptide est également réduite.

En résumé, il apparaît que la synthèse des ponts interpeptidiques du peptidoglycane est intrinsèquement liée aux taux de L-Glutamine disponibles. Plus les taux de L-Glutamine sont faibles, moins il y a de groupements NH₄⁺ disponibles pour la conversion de D-Glutamate en D-Glutamine du pentapeptide, ce qui le rend moins spécifiques de la transpeptidase et diminue la formation de ponts interpeptidiques, d'où un maillage plus lâche au niveau des chaînes de peptidoglycane.

➤ Expression réduite de PLP 4

PLP 4 est une protéine avec une activité DD-carboxypeptidase jouant le rôle d'une transpeptidase secondaire. Elle agit dans l'extension de la chaîne de peptidoglycane.

Si l'activité de PLP 4 diminue, le degré de réticulation diminue et les cibles pour la vancomycine augmentent.

Dans les souches présentant une résistance à la vancomycine, PLP 4 a soit une activité très diminuée, soit elle est inactivée (103).

Le mécanisme exact par lequel le gène *pbpD* qui code pour la protéine PLP 4 est régulé dans ces souches, n'est pas encore élucidé.

3. Bases génétiques

Bien que l'expression réduite de PLP 4 et la déplétion en L-glutamine due à l'accélération de l'anabolisme de la paroi apportent des explications à la paroi épaissie avec degré de réticulation faible des GISA, les origines génétiques de ces phénomènes ne sont pas élucidées (109). La régulation de la résistance à la vancomycine doit être sous le contrôle de divers gènes.

On sait maintenant que le gène *mecA* n'est pas impliqué dans la résistance aux glycopeptides (36, 67). Certaines protéines cellulaires, comme les adhésines considérées comme essentielles à la pathogénicité de *S. aureus*, peuvent avoir leur expression altérée. En regardant différents cas de patients infectés par des souches de GISA, on voit que, en plus d'une exposition prolongée à la vancomycine, la majorité des ces patients ont des infections impliquant du matériel biomédical tels que des valves cardiaques artificielles, des stents biliaires, des cathéter veineux centraux,... (81).

Les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides adhèrent plus volontiers aux surfaces artificielles que les SARM. Walsh (102) a montré que cette adhésion était 5 à 20 fois plus importante chez les GISA que chez les SARM ce qui posera un problème dans la gestion des infections nosocomiales.

Nous avons vu que deux loci, *agr* et *sar* contribuent à la régulation de déterminants de virulence chez le *S. aureus*. Le gène *agr* influence l'expression de plusieurs protéines (δ hémolysine, protéine de liaison de la fibronectine, protéine A) et la production de biofilm. Sakoulas (81) a émis l'hypothèse que la fixation augmentée sur les matériels et la propriété hémolytique atténuée observée chez les GISA pourraient être corrélées à la perte de fonction du gène *agr*. En effet, toutes les souches GISA et hGISA ont une expression diminuée de la δ -hémolysine. Or, elle est codée par le même gène que RNA III, effecteur du système *agr* mais dans un autre cadre de lecture, elle est donc le témoin de l'intégrité du système *agr*.

Le fait que la δ -hémolysine ne soit pas exprimée dans ces souches suggère que le système *agr* ne fonctionne pas chez les GISA.

De plus, cette même équipe a montré que toutes les souches hGISA et GISA isolées aux Etats-Unis et au Japon appartenaient à un système *agr* du groupe II, ce qui permet d'avancer l'hypothèse que *agr II* serait un marqueur génétique de souches sélectionnées par le traitement par la vancomycine (66).

D'un autre côté, une autre étude (100) a démontré que la majorité des souches européennes appartenaient aux groupes I et II.

Ainsi, il apparaît que des mutations au niveau des gènes *agr* et/ou *sar*, ou une expression altérée de ces régulateurs, aboutirait à des phénotypes GISA ou hGISA et affecterait la bactérie dans l'expression de ces facteurs de virulence et la formation de son biofilm.

D'autres gènes seraient également impliqués : la perte d'expression du gène *tcaA*, qui code pour une protéine transmembranaire, serait associée à une augmentation de la résistance aux glycopeptides chez *S. aureus* (79).

IV. LES DIFFERENTES METHODES DE DETECTION

Il a été suggéré que l'hétéro-résistance était responsable d'échecs thérapeutiques à la vancomycine. Mais avant de pouvoir estimer l'impact clinique ou la prévalence des hGISA, on doit établir une méthode fiable de détection.

1. Technique de diffusion en milieu gélosé

Les souche hétérorésistantes apparaissent sensibles avec les techniques usuelles. En effet, il est établi que les méthodes de diffusion en milieu gélosé (méthodes des disques) manquent à la fois de spécificité et de sensibilité pour la détection de telles souches. Elles n'arrivent pas à différencier les souches avec une sensibilité diminuée à la vancomycine des souches sensibles (67).

Tenover (92) avait émis l'hypothèse qu'un disque de teicoplanine chargé à 30 µg pouvait être capable de différencier les souches VSSA des souches VISA : si le diamètre est ≥ 16 mm, la souche est sensible, si le diamètre est ≤ 15 mm, la souche est intermédiaire. Cette technique n'a pas été validée.

Cependant le CA-SFM a émis des critères de suspicion d'une souche de GISA (5) qui sont :

- le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 17 mm autour du disque de l'un des 2 glycopeptides

- le diamètre de la zone d'inhibition autour d'un disque de teicoplanine est inférieur d'au moins 3 mm à celui de la vancomycine
- quelques colonies sont présentes dans la zone d'inhibition de l'un des 2 glycopeptides
- il existe un phénomène d'interaction (synergie ou antagonisme) entre l'un des glycopeptides et un disque d'oxacilline à 5 µg.

En effet, un antagonisme entre la vancomycine et les β -lactamines a été observé chez beaucoup de souches GISA et hGISA et ceci a été proposé comme méthode de détection (43). Mais le mécanisme d'action exact n'a jamais été élucidé et de plus, il n'est pas certain que ceci s'exprime chez tous les *S. aureus* avec une sensibilité diminuée aux glycopeptides (103).

2. Screening sur gélose contenant de la vancomycine (vancomycin agar screen)

Deux méthodes ont été décrites dans la littérature : celle de Tenover et al (92) et celle de Hubert et al (46).

a) Méthode de Tenover et al (92)

Un inoculum de densité égale à 0,5 Mac Farland (McF) est réalisé à partir d'une culture de 24h sur gélose au sang. Dix µL de cette suspension sontensemencés sur des géloses BHI contenant de la vancomycine à 6 mg/L. Les géloses sont ensuite incubées pendant 48 h à 37°C et la pousse est observée à 24 et 48h.

b) Méthode de Hubert et al (46)

La méthode est similaire. On ensemence des milieux MHA (Mueller-Hinton Agar) contenant de la vancomycine à 5 mg/L avec 10 µL d'une suspension à 0,5 Mac Farland. Les géloses sont ensuite incubées à 35°C pendant 48 h et observées à 24 et 48h.

Ces techniques de screening représentent des alternatives intéressantes. En effet, elles sont moins coûteuses que les E-test et peuvent être mises en place en routine dans les laboratoires.

Ceci a été démontré par l'équipe de Bernard et al (12) dans une étude comparative entre BHI contenant 2 mg/L de vancomycine et 5 mg/L de teicoplanine.

3. Techniques de dilution en milieu liquide et en milieu solide

Il s'agit des procédures décrites par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)(7). Ces techniques assurent une détermination précise de la CMI. La microdilution en milieu liquide est la technique de référence recommandée par le NCCLS pour la détermination des CMI, mais la taille trop faible de l'inoculum utilisée (0,5 Mac Farland), le milieu de Mueller-Hinton, et la lecture après 18h d'incubation ne permettent pas la détection des souches intermédiaires aux glycopeptides avec une sensibilité suffisante. D'après le tableau 6, on a 11% de sensibilité pour la détermination de la CMI de la vancomycine et 40% pour celle de la teicoplanine.

L'étude de Walsh et al (102) a permis de confirmer les directives du NCCLS et du CDC qui préconisent d'étudier plus précisément les souches ayant une CMI ≥ 4 mg/L avec la méthode en milieu liquide. Cependant, les hGISA ne peuvent pas être identifiées de façon satisfaisante par cette méthode qui ne permet pas la mise en évidence des sous-populations capables de croître en présence de concentrations élevées de glycopeptides.

4. E-test

La technique du E-test est une méthode de détermination de la CMI par diffusion en milieu gélosé d'un gradient exponentiel d'antibiotiques déposé sur une bandelette. Son coût élevé et sa non automatisation limitent son emploi en pratique courante.

Avec un inoculum d'une turbidité 0,5 Mac Farland, déposé sur un milieu de Mueller-Hinton pendant 24 h, cette technique s'avère sensible et spécifique pour l'identification des GISA.

L'utilisation d'un inoculum lourd de 2 Mac Farland, déposé sur une gélose BH (brain-heart) et incubé 48h à 37°C augmente la sensibilité et permet de détecter les souches hGISA de manière satisfaisante. Cependant, cette « macrométhode » ne doit pas être considérée comme une détermination de la CMI.

Dans la « macrométhode » (E-test avec un inoculum à 2 Mac Farland), une souche est considérée de sensibilité diminuée aux glycopeptides si la CMI de la vancomycine ≥ 8 mg/L et CMI de la teicoplanine ≥ 8 mg/L ou si la CMI de la teicoplanine ≥ 12 mg/L. Cette méthode est considérée comme la méthode de choix à utiliser en routine pour le screening des GISA (102, 104).

Les critères du E-test avec un inoculum à 0,5 Mac Farland sont CMI vancomycine ≥ 4 μ g/mL et CMI teicoplanine ≥ 6 mg/L mais cette technique détecte trop de faux-positifs (20 contre 7 pour la « macrométhode » d'après le tableau 6).

Tableau 6 : Sensibilité et spécificité de différentes méthodes de détection de GISA et hGISA d'après Walsh et al (102)

Méthode	Nombre de souches GISA et/ou hGISA identifié ($n = 45$)	Nombre de faux positifs	Nombre de faux négatifs	% Sensibilité	% Spécificité
Analyse de population simple	32	34	13	71	88
CMI vancomycine Milieu liquide	5	0	40	11	100
CMI teicoplanine Milieu liquide	18	1	27	40	>99
CMI vancomycine Milieu solide	9	0	36	20	100
CMI teicoplanine Milieu solide	21	0	24	47	100
Etest, 0.5 McF	37	20	8	82	93
Etest, 2.0 McF	43	7	2	96	97
Screening sur BHI	10	8	35	22	97
Screening sur Mueller-Hinton	9	3	36	20	99

5. L'analyse de population

La méthode d'analyse de population permet de mettre en évidence l'existence de sous-populations capables de croître sur des concentrations croissantes de glycopeptides au sein d'une souche de *S. aureus*. Cette méthode consiste à déposer un inoculum fort sur des milieux gélosés BHI contenant des concentrations croissantes de glycopeptide, par paliers de 1 à 2 mg/L. Les souches de GISA et de hGISA peuvent ainsi être détectées.

a) L'analyse de population simplifiée (39)

L'analyse de population décrite par Hiramatsu consistait à ensemencer 10 µL d'un inoculum spécifique (0,5 Mac Farland) sur une gélose BHI contenant 4 mg/L de vancomycine et à l'incuber à 37°C pendant 48h.

Après 24 h d'incubation, les souches GISA sont identifiées par la confluence de leurs colonies. Leurs CMI doivent être déterminées par des techniques de microdilution en milieu liquide ou de diffusion en gradient de concentration (E test).

Après 48 h d'incubation, les souches hGISA sont suspectées si le nombre de colonies ayant poussé est de 1 à 30. Une subculture de ces colonies est effectuée sur un milieu BHI contenant 8 mg/L de vancomycine. Le statut hGISA est confirmé si la souche produit un sous-clone capable de croître sur ce milieu et si cette résistance persiste après 9 jours de culture en milieu ne contenant pas de vancomycine.

Le principal défaut de cette méthode est qu'elle sélectionne la résistance plus qu'elle ne la détecte (44, 45). En effet, d'après Howe et al (44), la pré-incubation des souches avec de la vancomycine a un effet sur l'expression de la résistance par les souches GISA étudiées. Il y a une augmentation des CMI. En la comparant avec la technique modifiée de Wootton, elle entraîne de nombreux faux positifs (tableau 6).

b) L'analyse de population modifiée par Wootton (110) ou « population analysis profile – area under the curve ratio » (PAP-AUC)

Une culture pure et les dilutions à 10^{-3} et 10^{-6} d' un bouillon trypticase soja, sont ensemencées sur des géloses BHI contenant 0,5 ; 1 ; 2 ; 2,5 et 4 mg/L de vancomycine. Les colonies formées sont comptées après 48 h d'incubation à 37°C. Le logarithme du nombre de colonies poussant à une concentration de vancomycine donnée, rapporté à la gamme des concentrations de vancomycine, définit une courbe spécifique de chaque souche de *S. aureus*. L'aire sous la courbe (AUC) obtenue pour la souche Mu3 permet de classer les souches testées en 2 catégories : les souches possédant un ratio AUC souche/ AUC Mu3 inférieur à 0,9 seraient des souches de *S. aureus* sensibles aux glycopeptides, celles possédant un ratio supérieur ou égal à 0,9 seraient des hGISA (figure 10). Cette méthode détecterait plus qu'elle ne sélectionnerait la « résistance » par rapport à l'étude simplifiée (34 faux positifs) (102). Elle est considérée comme la technique la plus précise et devrait être utilisée comme méthode de confirmation dans les laboratoires de référence mais c'est une méthode très lourde et non adaptée aux laboratoires de routine (104). L'étude de Walsh dont nous rapportons les résultats la prend comme référence et lui compare toutes les autres techniques.

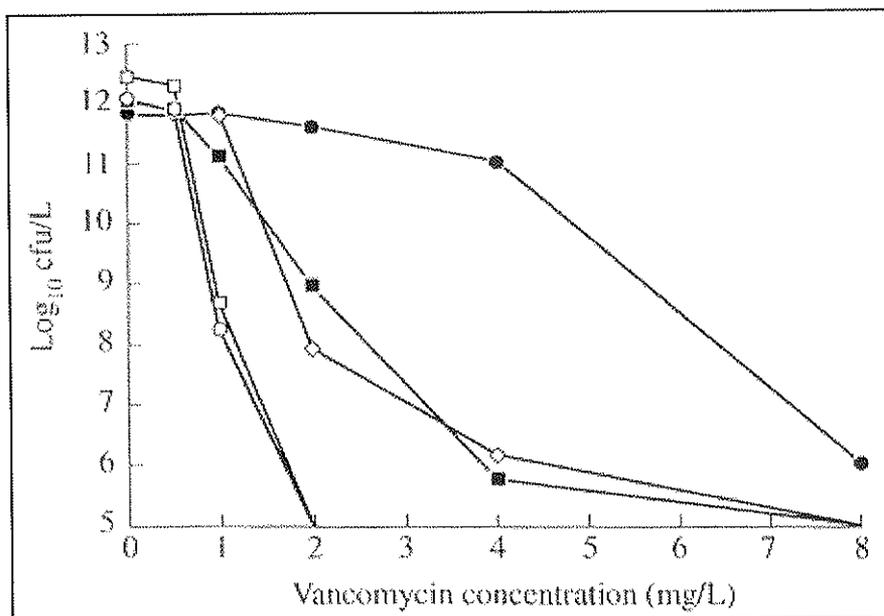


Figure 10 : Profils d'analyse de population de souches hGISA Mu3(○) et SMH2 (■) , GISA Mu50(●) et de 2 souches GSSA (○ et □) d'après (45)

6. Techniques recommandées

a) Recommandations du CA-SFM (5)

La société française de microbiologie (CA-SFM) a défini des critères de suspicion de la sensibilité diminuée aux glycopeptides (IV-1). Elle recommande un screening sur une gélose MH additionnée de 5 mg/L de teicoplanine ensemencée par dépôt de 10 µl d'une suspension de Mac Farland 2, incubée à 35-37°C. La sensibilité diminuée est suspectée par la présence d'au moins 4 colonies au niveau des spots après incubation à 35-37°C et lecture à 24 et 48 heures (5).

b) Recommandations du CDC (3)

Toutes les souches de *S. aureus* dont la CMI de la vancomycine ≥ 4 mg/L par la technique de détermination de la CMI par E-test à 0,5 Mac Farland, doivent être suspectées de sensibilité diminuée et envoyées à un laboratoire de référence pour confirmation de la résistance.

Le CDC recommande une méthode de screening sur gélose BHI additionnée de 6 mg/L de vancomycine ensemencée par dépôt de 10 µl d'une suspension de Mac Farland 0,5. La sensibilité diminuée est suspectée par la présence d'au moins 2 colonies après incubation à 35-37°C et lecture à 24 et 48 heures.

V. EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE ET IMPACT CLINIQUE

Les infections dues à des *S. aureus* résistants à la vancomycine ou VRSA sont rares. Seulement trois cas ont été publiés (2, 21, 94). Les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont plus fréquentes que les souches résistantes. On a rapporté au moins 20 cas dans le monde. La prévalence des souches présentant une résistance hétérogène aux glycopeptides ou hGISA est supérieure à celle des souches GISA et varie également dans le monde (79).

AIRE GEOGRAPHIQUE	PREVALENCE (%)
Europe	0 – 27
Asie	0 – 26
Brésil	3
USA	0 – 3,1

La majorité des études européennes trouvent des taux compris entre 0 et 5%. Un taux élevé de 27% a été retrouvé chez les greffés rénaux infectés ou colonisés par des SARM (13). En 1997, une étude japonaise (47) rapporte l'absence de souches de sensibilité diminuée, GISA ou hGISA, parmi les 6625 souches de SARM testées provenant de 278 hôpitaux à travers le Japon.

Liu et al. (58) ont revu 14 études publiées entre 1997 et 2001 et ont trouvé 132 hGISA parmi 7920 souches de *S. aureus* testées ce qui leur a permis de calculer une prévalence moyenne de 1.67%.

Selon les études (tableau 7), la prévalence varie de façon très importante. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces variations :

- la définition des GISA
- l'origine des souches
- la méthode de détection

La majorité des hGISA sont résistants à la méticilline mais ces résultats peuvent être biaisés par le fait que dans 9 études sur 14, les souches screenées étaient des SARM. Le problème dans la détermination de la prévalence des GISA et hGISA est que leur résultat doit être interprété avec précaution et dépend de la définition et de la méthodologie utilisée pour le screening et la confirmation de la résistance. Toutes ces études n'ont pas été standardisées.

Les infections à *S. aureus* de sensibilité diminuée sont soit des cas ponctuels associés à des échecs thérapeutiques après ou en cours de traitement par les glycopeptides, soit des bouffées épidémiques hospitalières (61, 76). L'impact clinique de telles souches est encore mal défini. Si Fridkin ne trouve pas de différences en terme de devenir pour les patients infectés par des souches de SARM sensibles aux glycopeptides (CMI de la vancomycine \leq 4 mg/L) ou par des souches hGISA ou GISA (32), par contre, Joly-Guillou (50) a montré que lors d'épisodes

épidémiques, notamment dans des services de réanimation, il existait une surmortalité chez les patients infectés par une souche GISA en comparaison avec les souches SARM.

De la même façon, Charles (22) qui a comparé 53 patients présentant une bactériémie à SARM soit hGISA (n=5) soit non GISA (n=48), trouve que les souches SARM hGISA sont plus volontiers associées à une durée plus longue de l'épisode fébrile, à un nombre plus élevé d'hémocultures positives, à un nombre de jours de bactériémie plus important, à une vancocinémie plus faible pendant la première semaine de traitement.

Il semble donc que l'isolement d'une souche hGISA soit associé à un échec thérapeutique. En conclusion de l'étude, Charles (22) propose, comme des éventuels marqueurs cliniques d'une infection à hGISA, une fièvre persistante et une bactériémie qui se maintient plus de 7 jours après le début du traitement par vancomycine.

Enfin, des échecs thérapeutiques ont été décrits dans plusieurs observations (8, 9, 13, 68, 69, 77, 101, 105) mais peu d'études donnent les dosages de glycopeptides lors du traitement et on peut penser que l'échec n'est pas lié seulement à la résistance de la souche, mais aussi à une mauvaise diffusion de l'antibiotique au niveau du foyer ou à un taux trop bas de glycopeptides.

Par conséquent, l'utilisation d'un glycopeptide dans le traitement de ces souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides ne peut se faire qu'en utilisant des doses correctes permettant d'obtenir l'équilibre des valeurs supérieures à 30 mg/L en concentration sanguine. Joly-Guillou recommande une association avec l'imipénème, la dalfopristine-quinupristine, ou le cefpirome (50). Enfin, le linézolide, 1^{er} antibiotique de la famille des oxazolidinones représente une alternative thérapeutique intéressante (86).

Tableau 7 : Prévalence des hVISA dans 14 études épidémiologiques -d'après Liu (58)

ETUDE (reference)	SOUCHES SARM			SOUCHES MSSA			TOTAL DES SOUCHES		
	Nbre de souches	Nbre de hVISA	% hVISA	Nbre de souches	Nbre de hVISA	% hVISA	Total	Nbre de hVISA	% hVISA
Hiramatsu (39)	1149	35	3.05	0	0	0	1149	35	3.05
Franchi (31)	30	0	0	0	0	0	30	0	0
Ariza (9)	19	14	73.68	0	0	0	19	14	73.68
Kantzanou (51)	72	1	1.39	25	0	0	97	1	1.03
Geisel (34)	85	7	8.24	0	0	0	85	7	8.24
Wong (108)	52	3	5.77	112	0	0	164	3	1.83
Bierbaum (14)	367	2	0.54	90	0	0	457	2	0.44
Schmitz (83)	302	0	0	0	0	0	302	0	0
Marchese (63)	179	2	1.12	0	0	0	179	2	1.12
Kim (52)	3371	59	1.75	1172	0	0	4543	59	1.30
Bobin-Dubreux (16)	0	0	0	469	1	0.21	469	1	0.21
Reverdy (78)	171	3	1.75	0	0	0	171	3	1.75
Trakulsomboon (95)	155	5	3.23	0	0	0	155	5	3.23
Wootton (110)	100	0	0	0	0	0	100	0	0
Total	6052	131	2.16	1868	1	0.05	7920	132	1.67

OBJECTIFS

L'émergence de souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides peut être préoccupante.

Le but de notre étude était :

- d'estimer la prévalence de ce type de souche au sein de l'hôpital Haut-lévêque. Pour cela, nous avons appliqué le protocole de détection mis en place à Limoges, dans le service de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges.

Il s'articule en trois parties :

- ✓ un screening de toutes les souches de *S. aureus* sur gélose BHI contenant 4 mg/L de teicoplanine
- ✓ une détermination de la CMI de la vancomycine et de la teicoplanine des souches sélectionnées, sur gélose BHI avec un inoculum à 2 McF.
- ✓ une analyse de population des souches dont les CMI étaient supérieures à certains seuils.

- d'étudier les souches de sensibilité diminuée pour déterminer s'il s'agissait d'un même clone épidémique.

- de déterminer l'impact clinique de ces souches par l'étude des dossiers afin de voir si elles étaient associées ou non à des échecs thérapeutiques à la vancomycine.

MATERIEL ET METHODES

I. LES SOUCHES BACTERIENNES

Les 468 souches étudiées ont été isolées dans le laboratoire de l'hôpital Haut Lévêque du CHU de Bordeaux. Elles provenaient de produits pathologiques et de portage de malades hospitalisés entre le 1^{er} novembre 2004 et le 30 avril 2005. la répartition des prélèvements en fonction de leur nature est donnée dans le tableau 8 et la figure 11.

Tableau 8 : Répartition des prélèvements de novembre 2004 à avril 2005

NATURE	NBRE DE SOUCHES	%
PVT.PULMONAIRES	176	37,7
PUS SUPERFICIEL	113	24,1
ORL	47	10
HEMOCULTURE	39	8,3
PUS PROFOND	25	5,3
MATERIEL	20	4,3
URINE	19	4,1
PORTAGE	14	3
PVT ABDOMINAL	7	1,5
LIQ.PONCTION	6	1,3
GENITAL	1	0,2
BIOPSIE	1	0,2
TOTAL	468	100

Les souches étaient repiquées sur gélose Mueller-Hinton (MH), à partir de l'antibiogramme classique. A ce stade, la catalase était vérifiée. La coagulase a été effectuée par 2 techniques : PASTOREX® STAPH-PLUS (Biorad) et SLIDEX STAPH-PLUS (bioMérieux) L'identification de certaines souches a été confirmée par galerie Api Staph (bioMérieux). Elles ont été ensuite traitées suivant le protocole de détection des GISA (Glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*) utilisé au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Dupuytren à Limoges (76). Nous avons utilisé comme témoins, les souches japonaises, Mu3 (hGISA) et Mu50 (GISA), ainsi que LIM2, souche GISA isolée à Limoges (77).

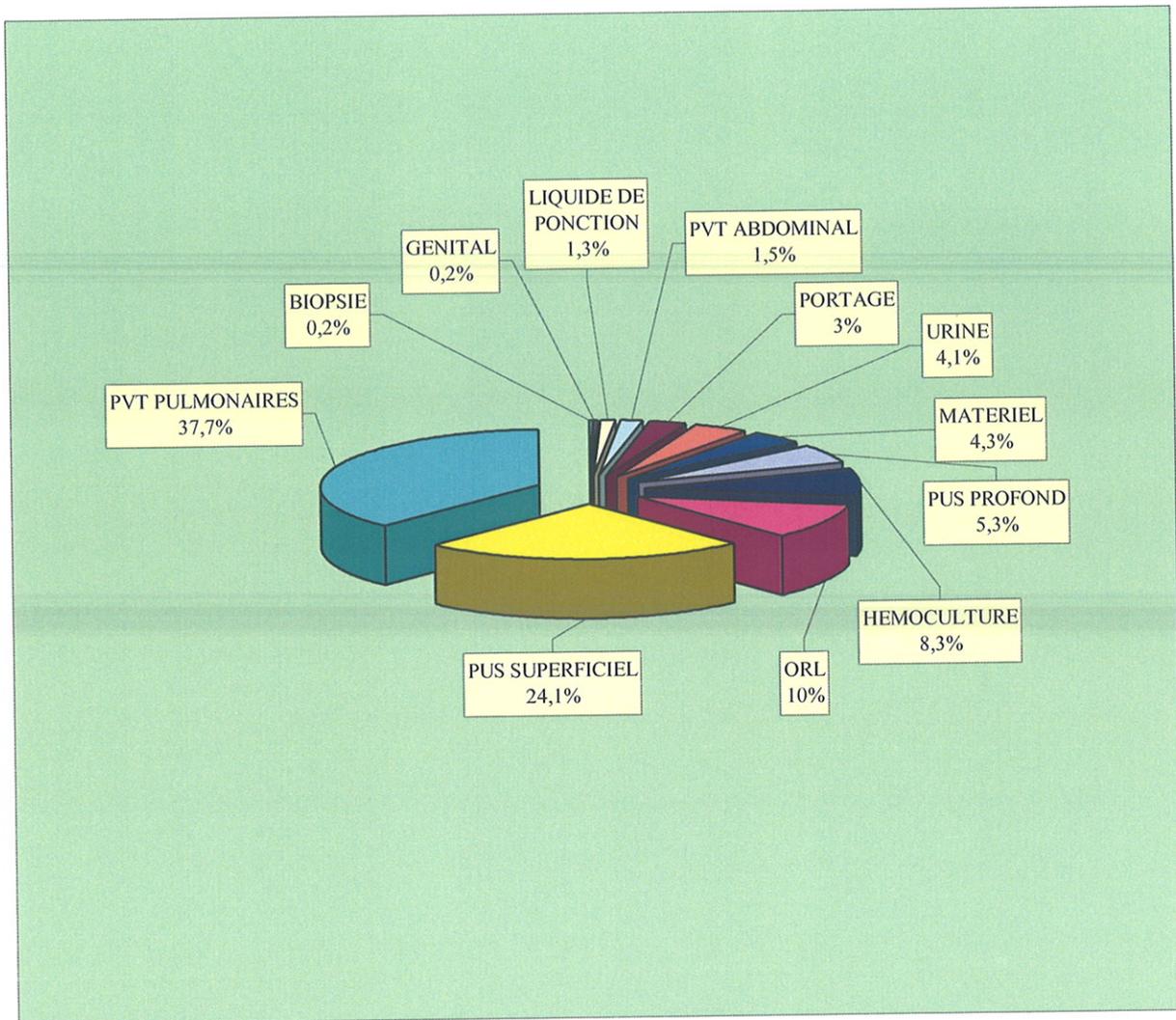


Figure 11 : Répartition des prélèvements de novembre 2004 à avril 2005

II. LE SCREENING

Des géloses BHI (Brain Heart Infusion) contenant 4mg/L de teicoplanine ont été utilisées pour détecter les *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

1) Préparation des géloses à 4 mg/L de teicoplanine ou géloses T4

Les géloses BHI ont été préparées au laboratoire à partir du milieu déshydraté gélosé Cerveau-Cœur (AES Ref : AEB150402) à raison de 52g pour 1L.

Une solution de teicoplanine (teicoplanine sodium salt, Lepetit n°11495/BR, Aventis Pharma) à 1280 mg/L a été préparée en mélangeant 14,3 mg de poudre titrée dans 10 mL d'eau stérile. Cette solution a ensuite été diluée en progression géométrique de raison 2 dans de l'eau distillée stérile de façon à obtenir une concentration de 40 mg/L.

Les géloses ont été ensuite coulées en incorporant 2 ml de cette solution de teicoplanine et 18 mL de BHI en surfusion afin d'obtenir une concentration finale de 4 mg/L.

2) Technique de screening

Chaque souche a été repiquée sur gélose au sang et au bout de 18 h d'incubation, nous avons réalisé une suspension à 2 Mac Farland en NaCl.

Un spot de 10 µL de cet inoculum a été déposé sur les géloses T4.

Un spot de 10 µL d'un témoin positif, inoculum à 2 Mac Farland de Mu50, était déposé sur chaque boîte.

Les géloses étaient incubées 48h à 37°C.

Les souches présentant une pousse au niveau du spot ont été conservées dans des milieux de conservation (Storage Medium, Biorad) pour réaliser ultérieurement les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine.

III. DETERMINATION DES CMI PAR LA METHODE DES «E-TEST»

Pour chaque souche sélectionnée après screening, les CMI ont été effectuées, sur des géloses BHI précoulées (AES Ref : AB520410).

Les souches étaient repiquées sur des géloses au sang et incubées 18 h, puis un inoculum à 2 Mac Farland était préparé en NaCl.

Les géloses BHI étaientensemencées par inondation, puis séchées 1/2h à l'étuve.

Les bandelettes (AB Biodisk VA 0,016-256 µg/mL et TP 0,016-256 µg/mL) étaient déposées sur les géloses qui étaient ensuite incubées 48 h à 37°C.

Les souches de *S. aureus* dont :

- La CMI de la vancomycine ≥ 4 mg/L et la CMI de la teicoplanine ≥ 8 mg/L
- Ou la CMI de la vancomycine ≤ 4 mg/L et la CMI de la teicoplanine ≥ 12 mg/L

étaient considérées comme ayant, potentiellement, une sensibilité diminuée aux glycopeptides et donc étudiées en analyse de population.

IV. ANALYSE DE POPULATION

L'analyse de population nous a permis de déterminer si les souches sélectionnées précédemment étaient hétéroGISA, homoGISA ou sensibles.

1) Préparation des souches

Les souches ont été repiquées sur géloses au sang et incubées 18 h à 37°C.

Puis, un bouillon BHI 5mL a étéensemencé avec **une** colonie et incubé 18 h à 37°C.

L'inoculum 0 (le plus concentré) a été préparé à partir de ce bouillon par dilution pour obtenir une suspension de Mac Farland 2 (environ $6 \cdot 10^8$ UFC/mL).

Cinq autres inoculums ont été réalisés par dilutions successives allant de 10^{-1} à 10^{-5} (figure 12).

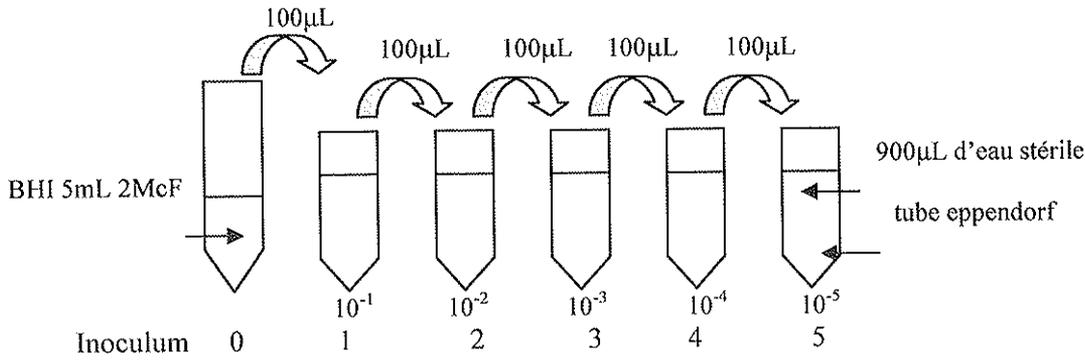


Figure 12 : Protocole de préparation des différents inoculums

2) Préparation des géloses

Les géloses étaient préparées comme pour le screening, à partir de milieu BHI (AES Ref : AEB150402, 500g).

Les géloses étaient ensuite coulées : 20 mL de BHI additionnés de vancomycine (VANCOMYCINE DAKOTA® Pharm) en quantité variable selon la concentration souhaitée, suivant le tableau 9 ci-après.

Tableau 9 : Volume de vancomycine en µl à introduire en fonction de la concentration finale en mg/L

Concentration finale en vanco mg/L	0	1	2	3	4	6	8
Volume de vancomycine à 5g/L	0	4µL	8µL	12µL	16µL	24µL	32µL
Nombre de boîtes à couler/souche	V0 : 2	V1 : 2	V2 : 2	V3 : 2	V4 : 2	V6 : 1	V8 : 1

3) Ensemencement des boîtes

Les géloses étaient ensuiteensemencées au râteau avec 100 µL d'inoculum suivant le tableau 10. Les boîtes étaient incubées 48 h à 37°C.

Tableau 10 : Concentration des boîtes à ensemer en fonction de l'inoculum

<i>INOCULUMS</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Dilutions correspondantes	-	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Boîtes à ensemer	V4 V6 V8	V3 V4	V3	V2	V2 V1 V0	V1 V0

4) Lecture et interprétation des résultats

Pour chaque souche, le dénombrement des colonies a été réalisé sur la boîte où les colonies étaient le mieux individualisées, tout en vérifiant, sur les autres boîtes, la corrélation entre le nombre de colonies et la dilution.

Le calcul des UFC/mL correspond au nombre de colonies multiplié par 10, multiplié par le facteur de dilution de la boîte dénombrée.

Ces résultats ont été rapportés sur un graphique en courbe log (UFC/mL) en fonction de la concentration de vancomycine.

V. TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE (35)

La technique de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) repose sur le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN total après digestion par des enzymes de restriction à faible fréquence de coupure (générant des fragments de grande taille) ce qui permet de comparer des souches bactériennes en fonction de leur profil de restriction. Le principe consiste en l'application de champs électriques qui changent régulièrement d'orientation pendant la durée de l'électrophorèse et qui imposent à la molécule d'ADN des étapes de réorientation plus ou moins longues en fonction de sa taille, avant sa migration effective (figure 13). L'ADN migre par « reptation » et les fragments de grande taille ne sont plus bloqués. La migration des fragments d'ADN dépend de nombreux paramètres : direction du champ électrique, concentration et type d'agarose, température du tampon d'électrophorèse, cinétiques de pulsation. En électrophorèse classique, seule la force du champ électrique influence la migration des fragments d'ADN. En PFGE, l'angle de réorientation et la durée d'application des champs sont deux paramètres électrostatiques supplémentaires. Cette technique nécessite

une préparation d'ADN de bonne qualité. Pour cela, les bactéries sont incluses dans des blocs d'agarose afin que leur ADN soit protégé des nucléases et autres agressions. Les réactifs diffusent à travers les mailles de l'agarose. Les différentes étapes de la technique sont résumées sur la figure 14. Les profils de bande obtenus sont appelés pulsotypes.

Cette technique a un grand pouvoir discriminant et trouve tout son intérêt dans des études épidémiologiques bien qu'il s'agisse d'une technique lourde à mettre en œuvre, longue et nécessitant un appareillage spécifique très coûteux.

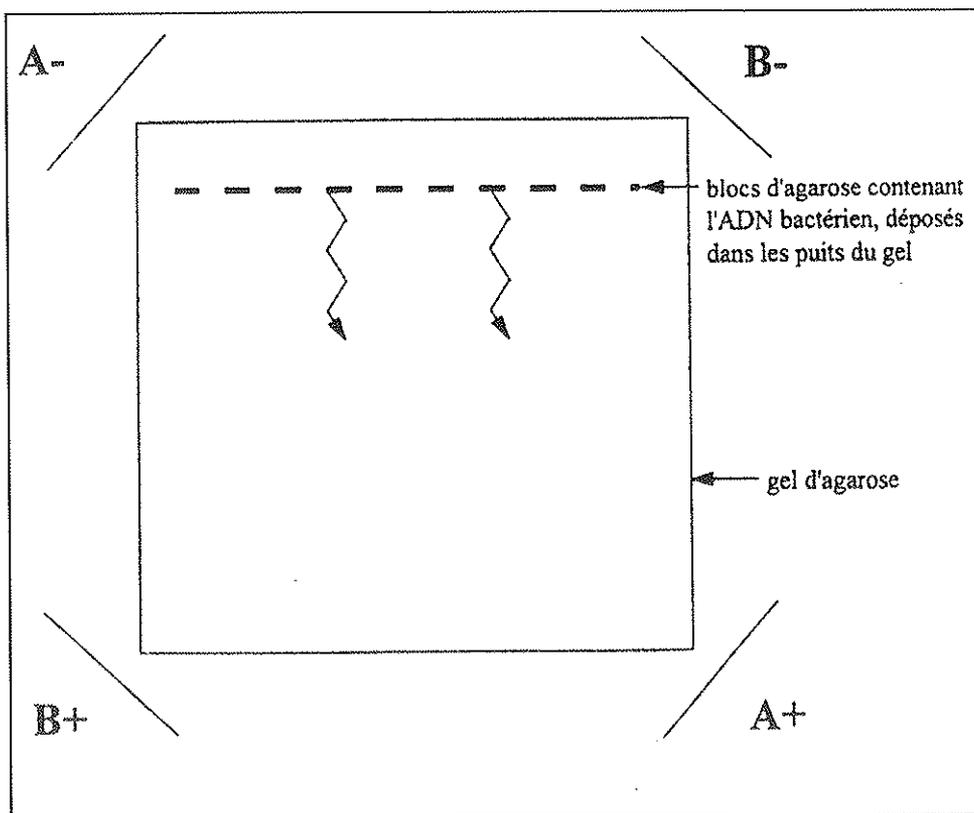


Figure 13 : Principe général de l'électrophorèse en champ pulsé (35)

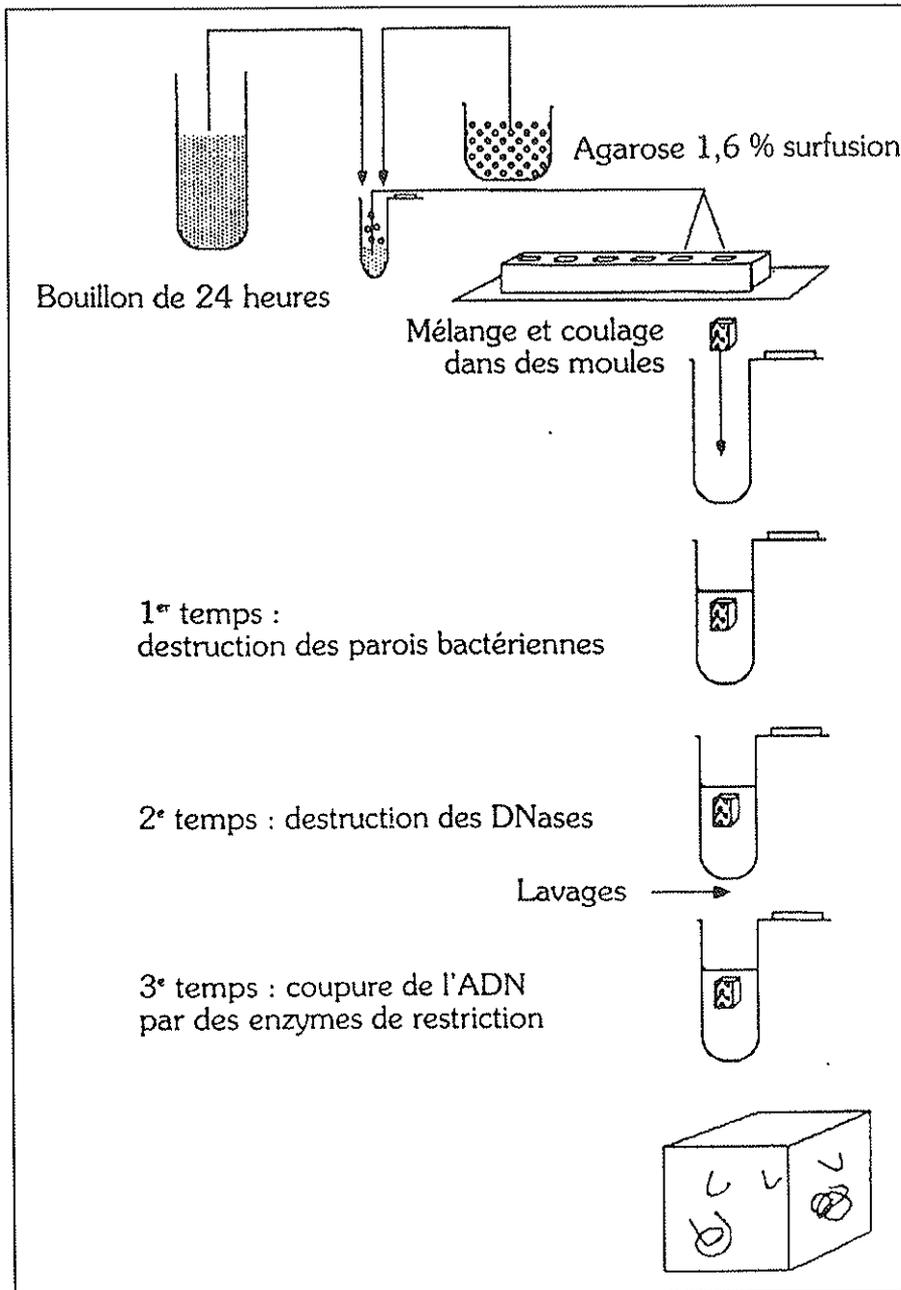


Figure 14 : Les différentes étapes de l'électrophorèse en champ pulsé

1. Réalisation des blocs

Une colonie de chaque souche était mise en culture en bouillon BHI pendant 24 h à 37°C.

Les bouillons étaient centrifugés 15 min à 4000 tours/min.

Les culots étaient récupérés et remis en suspension dans du TE 10 : 50 (10mM Tris-HCl pH 8 ; 50 mM EDTA pH 8) afin d'obtenir une suspension bactérienne de densité optique comprise entre 1,4 et 1,7 à une longueur d'onde de 650 nm. (Spectrophotomètre GENESYS 6 Thermo Spectronic).

La suspension bactérienne était mélangée volume à volume avec de l'agarose 1% en tampon TE 10 : 50 (InCert ® agarose, FMC) et répartie dans un moule contenant 10 puits (100 µL de suspension par puits).

Le moule était placé à + 4°C afin que les blocs durcissent.

2. Lyse des bactéries

Après démoulage, les blocs étaient incubés trois heures à 37°C dans 1mL d'EDTA 0,1 M auquel étaient ajoutés 200 µL de lysostaphine (1 unité/µL) (SIGMA – Lysostaphin from *Staphylococcus staphylolyticus* – lot L7386 à 542,2 U/mg de protéines) et 100 µL de lysosyme (10 mg/mL). Les blocs étaient ensuite rincés dans du tampon TE 10 : 1.

Une seconde lyse était réalisée dans un tube à hémolyse contenant :

- 2 mL d'EDTA à 0,5 M (pH=8)
- 200 µL de N-lauroyl sarcosine à 10%
- 100 µL de protéinase K à 20 mg/mL

Les blocs ont été incubés jusqu'à ce qu'ils deviennent transparents à 56°C (au maximum 48h)

3. Rincages

Plusieurs rincages ont été effectués avec :

- 10 mL de tampon TE 10:1 additionnés de 100 µL de phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF, inhibiteur des protéases, 17,5 mg/mL d'isopropanol) pendant 1 h à 37°C sous agitation.
- 10 mL de tampon TE 10:1 additionnés de 100 µL de phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF) pendant 1 h à température ambiante sous agitation.
- Puis 3 rincages avec 10 mL de tampon TE 10:1 pendant 1 h à température ambiante sous agitation.

Ainsi rincés, les blocs peuvent être conservés 15 jours en TE 10 : 1 à + 4°C.

4. Digestion enzymatique

Une digestion enzymatique a été réalisée pendant 6 heures à 25°C, avec 2 µL de l'enzyme de restriction SmaI (HC – Catalog #R4124 – System Lot #192989 – concentration 80 U/µL- une unité est définie comme la quantité d'enzyme requise pour cliver 1 µg d'ADN en 1h à 25°C dans 50 µL de tampon contenant du BSA à une concentration finale de 0,1 mg/mL).

L'enzyme avait été au préalable diluée au 1/5 dans son tampon.

5. Migration électrophorétique

Le système CHEF-DR III (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field - Biorad) a été utilisé dans notre étude.

Chaque bloc a été inclus dans un puit d'un gel d'agarose à 1% (1,5g d'agarose dans 150 mL de TBE 0,5X). Le concatémère d'ADN de phage λ (Lambda Ladder - PFG Marker – N03405 – 50 µg/mL – Lot 86 – New England Biolabs) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le tampon de migration était du TBE 0,5X maintenu à la température de 14°C. La durée de migration était de 18 h, avec des temps de pulses allant de 1 à 30 secondes sous un courant de 180 volts.

6. Révélation et interprétation des profils

A la fin de la migration, le gel a été coloré dans une solution de bromure d'éthidium (50 µL de BET dans 500 mL de tampon TBE 0,5X) à température ambiante, sous agitation, pendant 30 minutes.

Après rinçage et décoloration dans de l'eau à + 4°C pendant une nuit, le gel a été déposé sur un transilluminateur UV dont les rayons ont excité les molécules de colorant rendant les fragments d'ADN fluorescents.

Les pulsotypes ont été interprétés selon les recommandations de Tenover (90).

RESULTATS

I. POPULATION

Du 1er novembre 2004 au 30 avril 2005, nous avons étudié 468 souches de *S. aureus*, isolées chez 331 patients hospitalisés au centre hospitalier Haut Lévêque.

Parmi ces souches, 178 étaient résistantes à la méticilline (38% de SARM) ce qui correspond à 124 patients porteurs d'un SARM (37,5% des patients). 17 souches étaient des SARM résistants à la gentamicine (3,6%), ce qui correspond à 13 patients (3,9%).

Nous avons étudié chaque souche, indépendamment, sans élimination des doublons. Il n'a été isolé pour la majorité des patients (248 patients) qu'une souche, mais pour 83 patients, nous avons testé plusieurs souches. La répartition de ces souches est résumée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Répartition des souches en fonction des patients.

NOMBRE DE SOUCHES PAR PATIENT	NOMBRE DE PATIENT
1	248
2	48
3	21
4	11
5	2
7	1
TOTAL	331

II. SCREENING SUR GELOSE BHI A 4 mg/L DE TEICOPLANINE

Parmi les 468 souches testées, 65 souches ont poussé sur le milieu BHI à 4 mg/L de teicoplanine et ont été souchées. Ces souches provenaient de 59 patients.

Pour 38 patients toutes les souches isolées sont sorties positives lors du screening (64,4%).

Pour 21 patients, toutes les souches de *S. aureus* isolées n'ont pas poussé :

- 10 patients ont une seule souche positive sur les 2 isolées : COU59, CUS98, FLO69, GON29, MAT74, PEN25, ROU89, SOM77, TEY25, ZOM85.
- 4 patients ont une seule souche positive sur les 3 isolées : BOU65, LAG21, NOR26, PIG77.
- 3 patients ont une seule souche positive sur les 4 isolées : FON41, LAF28, RET30.
- 2 patients ont une seule souche positive sur les 5 isolées : COM80 et KOW00.
- Un patient a 2 souches positives sur les 3 isolées : DUV49 et DUV85.
- Un patient a 2 souches positives sur les 7 isolées : ROG37 et ROG47.

Pour 3 patients, le profil de résistance des souches testées sur l'antibiogramme classique était différent (DUV49, FLO69, et ROU89). FLO69 est résistante à la méticilline et à la gentamicine alors que l'autre souche testée était sensible. ROU89 est résistante à la méticilline alors que l'autre souche était également sensible. DUV49 est résistante à la méticilline et DUV85 a une résistance à la gentamicine supplémentaire alors que la souche négative au screening a le même profil que DUV49.

Parmi les souches détectées, la proportion de SARM s'élève à 46,2% (30 souches) et 9 souches sont des SARM gentamicine résistants (13,8%).

Tableau 12 : Répartition des prélèvements après le screening sur BHI 4 mg/L de teicoplanine

NATURE	NBRE DE SOUCHES	%
PVT. PULMONAIRES	24	36,9
PUS SUPERFICIEL	15	23,1
ORL	8	12,3
HEMOCULTURE	6	9,2
PUS PROFOND	5	7,7
PORTAGE	2	3,1
URINE	2	3,1
MATERIEL	2	3,1
LIQ PONCTION	1	1,5
TOTAL	65	100

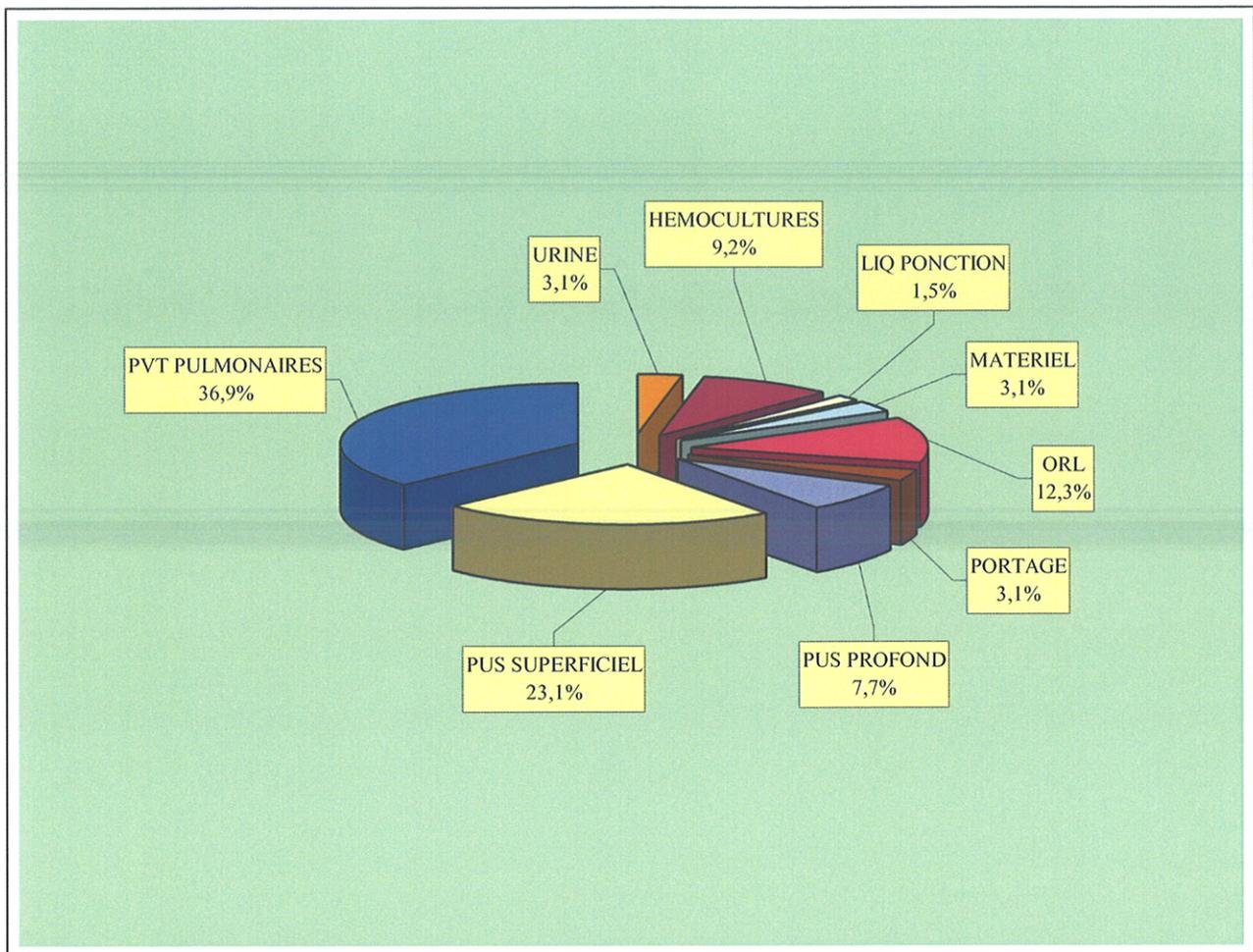


Figure 15 : Répartition des prélèvements de novembre 2004 à avril 2005 après screening

Si l'on compare la nature des échantillons avant et après le screening (figures 11 et 15), la répartition est conservée, en particulier, en ce qui concerne le pourcentage de souches trouvées dans les hémocultures (~ 8-9%), les pus superficiels (~ 23-24%), et les échantillons pulmonaires (~ 37%).

III. DETERMINATION DES CMI

La détermination des CMI des 65 souches nous a permis de sélectionner pour l'étude de population 41 souches selon les critères de sélection définis par le protocole de Limoges :

- la CMI de la vancomycine est ≥ 4 mg/L et la CMI de la teicoplanine est ≥ 8 mg/L
- ou
- la CMI de la vancomycine est ≤ 4 mg/L et la CMI de la teicoplanine est ≥ 12 mg/L.

Le tableau 13 et la figure 16 résument la répartition des souches en fonction des CMI de la vancomycine et de la teicoplanine. La majorité des souches ont des CMI de la vancomycine comprises entre 6 et 8 mg/L. Seulement 3 souches ont une CMI de la vancomycine à 12 mg/L. Aucune souche n'a été trouvée ayant une CMI de la vancomycine supérieure à 12 mg/L.

Par contre, les CMI de la teicoplanine sont plus élevées : 9 souches ont une CMI à 12 mg/L, 2 souches ont une CMI à 16 mg/L, 3 souches ont une CMI à 24 mg/L et une souche à 32 mg/L.

Tableau 13 : Répartition des souches en fonction des différentes CMI

CMI VANCOMYCINE (mg/L)	NOMBRE DE SOUCHES	CMI TEICOPLANINE (mg/L)	NOMBRE DE SOUCHES
3	0	3	0
4	10	4	8
6	35	6	16
8	17	8	26
12	3	12	9
16	0	16	2
24	0	24	3
32	0	32	1

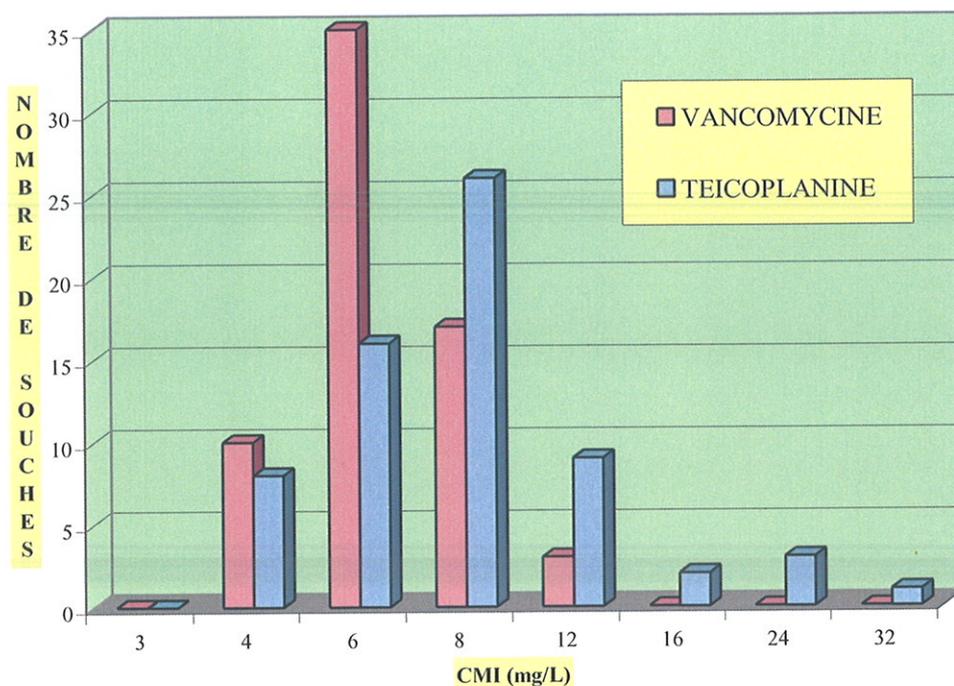


Figure 16 : Répartition des souches en fonction des différentes CMI

Les résultats des CMI de la teicoplanine et de la vancomycine réalisées sur les 65 souches sélectionnées par le screening, ainsi que leurs principales caractéristiques sont données dans le tableau 14.

Les souches ayant les CMI de la teicoplanine les plus élevées sont : FOU72 (CMI à 32 mg/L), FOU91 (CMI à 24 mg/L), DUV85 (CMI à 24 mg/L), CHA91 (CMI à 24mg/L).

Les souches ayant les CMI de la vancomycine les plus élevées sont : FOU72, FOU91, et DUV85. Les 3 souches ont une CMI à 12 mg/L.

Il y a donc concordance entre les CMI des deux antibiotiques. Ces souches sont toutes résistantes à la méticilline et à la gentamicine.

Tableau 14 : Caractéristiques des souches sélectionnées après le screening sur gélose BHI à 4 mg/L de teicoplanine

SOUCHE	DATE PVT	ORIGINE	SERVICE	METI	GENTA	CMI TEC 2McF	CMI VAN 2McF
BAC98	25/11/2004	SEC BR PULM	MEDECINE	R	S	6	4
BEJ90	05/01/2005	ORL	CHIRURGIE	R	R	4	6
BOA48	21/04/2005	SEC BR PULM	MEDECINE	S	S	8	6
BOI21	29/11/2004	PUS SUP	CHIRURGIE	R	R	12	4
BOU65	14/02/2005	PORTAGE	MEDECINE	S	S	8	6
CHA07	05/01/2005	SEC BR PULM	CRCM	R	R	6	6
CHA91	27/04/2005	SEC BR PULM	CRCM	R	R	24	6
CHE81	01/12/2004	SEC BR PULM	CRCM	S	S	8	6
CHE73	06/04/2005	SEC BR PULM	CRCM	S	S	8	6
CHO26	07/11/2004	PUS SUP	CHIRURGIE	S	S	8	8
CHP05	01/02/2005	SEC BR PULM	MEDECINE	R	S	8	8
CLA77	16/11/2004	SEC BR PULM	REA	R	S	8	6
COM80	07/03/2005	HEMOC	MEDECINE	S	S	4	6
COU59	02/12/2004	URINE	MEDECINE	R	S	4	6
CUS98	16/11/2004	PUS PRO	MEDECINE	R	S	12	6
DAR19	08/02/2005	ORL	CHIRURGIE	S	S	8	6
DAU34	22/04/2005	SEC BR PULM	MEDECINE	S	S	12	8
DEY86	02/11/2004	PUS SUP	MEDECINE	R	S	6	6
DUC11	11/03/2005	ORL	MEDECINE	S	S	12	6
DUF11	08/03/2005	SEC BR PULM	CHIRURGIE	S	S	12	6
DUV49	23/11/2004	PUS SUP	MEDECINE	R	S	8	8
DUV85	20/04/2005	HEMOC	MEDECINE	R	R	24	12
ETC67	24/11/2004	MATERIEL	MEDECINE	S	S	4	4
ETO86	02/12/2004	SEC BR PULM	REA	S	S	16	8
FEU40	21/01/2005	URINE	MEDECINE	R	R	12	4
FLO69	13/01/2005	PORTAGE	CHIRURGIE	R	R	8	6
FON41	18/02/2005	PUS SUP	CHIRURGIE	S	S	8	6
FOU91	20/02/2005	SEC BR PULM	CHIRURGIE	R	R	24	12
FOU72	21/03/2005	SEC BR PULM	MEDECINE	R	R	32	12
GON29	08/11/2004	PUS PRO	CHIRURGIE	S	S	8	6
GOZ13	17/01/2005	SEC BR PULM	REA	S	S	4	4
GUY19	22/02/2005	MATERIEL	REA	S	S	8	8

Souches sélectionnées pour l'étude de population
 Souches considérées comme sensibles après détermination des CMI

SOUCHÉ	DATE PVT	ORIGINE	SERVICE	METI	GENTA	CMI TEC 2McF	CMI VAN 2McF
HUI81	14/02/2005	PUS PRO	MEDECINE	R	S	8	8
KOW00	30/03/2005	SEC BR PULM	CRCM	S	S	8	8
LAC95	05/11/2004	PUS SUP	GERIATRIE	R	S	8	6
LAV90	09/11/2004	ORL	MEDECINE	R	S	8	4
LAF28	01/02/2005	LIQ PONCTION	REA	S	S	8	4
LAG21	12/04/2005	HEMOC	REA	R	S	8	6
LAN76	03/12/2004	SEC BR PULM	REA	S	S	8	6
LEB55	06/11/2004	ORL	MEDECINE	S	S	4	4
LEC09	17/02/2005	PUS SUP	MEDECINE	S	S	8	8
MAN56	07/03/2005	PUS SUP	MEDECINE	R	R	12	6
MAQ84	11/02/2005	PUS SUP	MEDECINE	S	S	6	8
MAR53	08/03/2005	HEMOC	CHIRURGIE	S	S	12	8
MAR25	10/03/2005	PUS PRO	CHIRURGIE	S	S	6	6
MAT74	11/01/2005	ORL	MEDECINE	S	S	4	6
MOG64	24/11/2004	PUS SUP	MEDECINE	R	S	8	8
NOR26	20/04/2005	SEC BR PULM	REA	R	S	12	8
NOU93	16/11/2004	ORL	MEDECINE	R	S	8	6
OLL39	03/12/2004	PUS SUP	MEDECINE	S	S	4	4
PEN25	14/02/2005	PUS SUP	MEDECINE	R	S	6	6
PIG77	18/01/2005	SEC BR PULM	MEDECINE	R	S	8	8
RET30	16/02/2005	SEC BR PULM	MEDECINE	S	S	8	4
REZ13	05/11/2004	PUS PRO	REA	S	S	6	6
ROG37	24/01/2005	SEC BR PULM	REA	R	S	6	6
ROG47	24/02/2005	SEC BR PULM	REA	R	S	6	6
ROU89	31/03/2005	SEC BR PULM	REA	R	S	6	6
SOM77	09/11/2004	HEMOC	MEDECINE	S	S	8	6
SAI85	22/03/2005	HEMOC	MEDECINE	S	S	6	8
SAR53	04/11/2004	SEC BR PULM	MEDECINE	S	S	6	8
TEY25	09/11/2004	PUS SUP	MEDECINE	S	R	6	6
TOU67	30/03/2005	ORL	MEDECINE	S	S	6	6
VAN81	05/04/2005	SEC BR PULM	CHIRURGIE	R	S	16	6
WER59	12/01/2005	PUS SUP	CHIRURGIE	S	S	6	8
ZOM85	17/01/2005	PUS SUP	MEDECINE	S	S	6	6

Souches sélectionnées pour l'étude de population
Souches considérées comme sensibles après détermination des CMI

On trouve 24 souches qui se révèlent être sensibles après détermination des CMI. Parmi ces 24 souches, 15 étaient sensibles à la méticilline et seulement deux étaient résistantes à la gentamicine.

La majorité des souches sélectionnées par le screening ont été isolées chez des patients hospitalisés dans des services de médecine. La répartition des souches en fonction des services d'hospitalisation est résumée dans le tableau 15.

Tableau 15 : Répartition des souches en fonction de services d'hospitalisation

SERVICES	NOMBRE DE SOUCHES
MEDECINE	34 (52,3%)
CHIRURGIE	13 (20%)
REANIMATION	12 (18,5%)
CRCM	5 (7,7%)
GERIATRIE	1 (1,5%)

IV. ANALYSE DE POPULATION

1. Entre le 1^{er} novembre 2004 et le 30 avril 2005

Les 41 souches sélectionnées après la détermination des CMI provenaient de 38 patients différents. Nous avons donc éliminé les doublons qui présentaient le même profil de résistance sur l'antibiogramme: CHE81 et CHE73 étaient sensibles à la méticilline et à la gentamicine, FOU72 et FOU91 étaient résistantes à la méticilline et à la gentamicine.

Dans un cas, les 2 souches ne présentaient pas le même profil de résistance : DUV49 était résistant à la méticilline et sensible à la gentamicine et DUV85 était méticilline et gentamicine résistant. Elles n'ont pas été considérées comme des doublons et nous les avons donc testées toutes les deux en étude de population.

Trente neuf souches ont donc été étudiées en analyse de population.

La souche Mu3 a été utilisée comme témoin positif pour l'hétéro-résistance. Les souches Mu50 et LIM2 ont été utilisées comme témoins positifs pour la souche GISA.

Les figures 17 à 24 représentent les courbes log (UFC/mL) en fonction de la concentration en vancomycine (mg/L). Le profil de la courbe de chaque souche a été comparée à celui de la courbe Mu3. Les souches présentant une sous-population poussant à une concentration minimale de vancomycine de 4 mg/L (V4), un aspect dissocié sur la boîte et dont le profil de la courbe était proche de celui de Mu3 étaient considérées comme hGISA.

Deux souches présentaient des courbes d'aspect inhabituel ou inattendue, aussi elles ont été testées plusieurs fois pour confirmer leur profil :

- Lors de l'étude de population n°3, CUS98 ne présentait pas de pousse à V2 mais son profil était proche de celui de Mu3 et l'aspect de ses colonies était dissocié (figure 19).
- Le profil de la courbe de ETO86 (figure 20) était proche de Mu3. Or il s'agissait d'une souche méticilline sensible.

Elles ont été testées à nouveau lors de l'étude n°8 (figure 24). La sensibilité diminuée a ainsi été confirmée pour les souches ETO86 et CUS98.

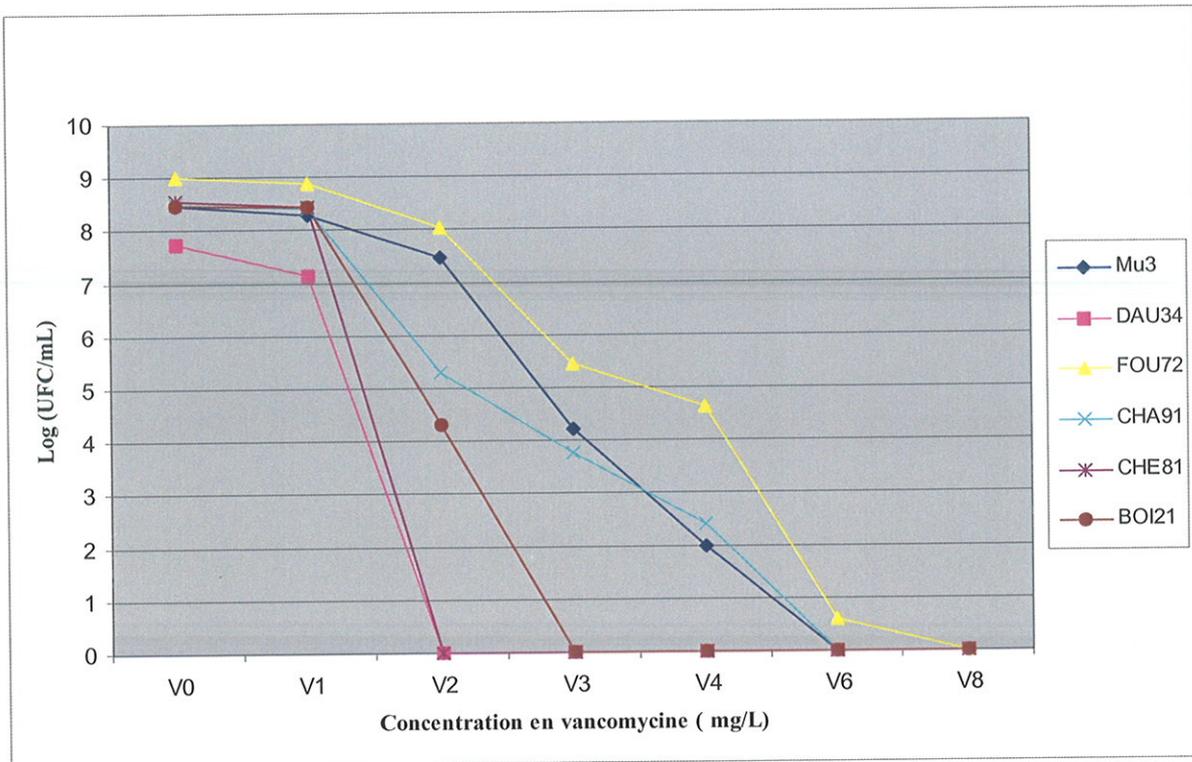


Figure 17 : courbe de l'analyse de population n°1

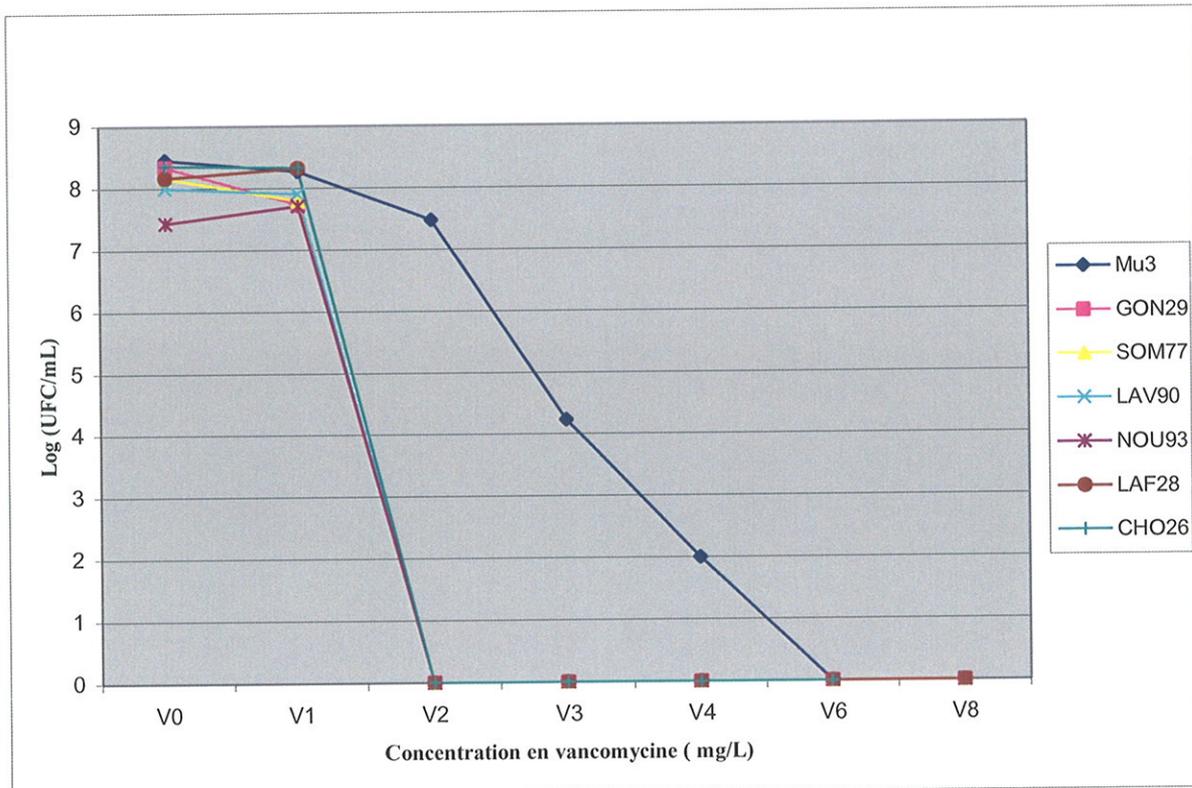


Figure 18 : Courbe de l'analyse de population n°2

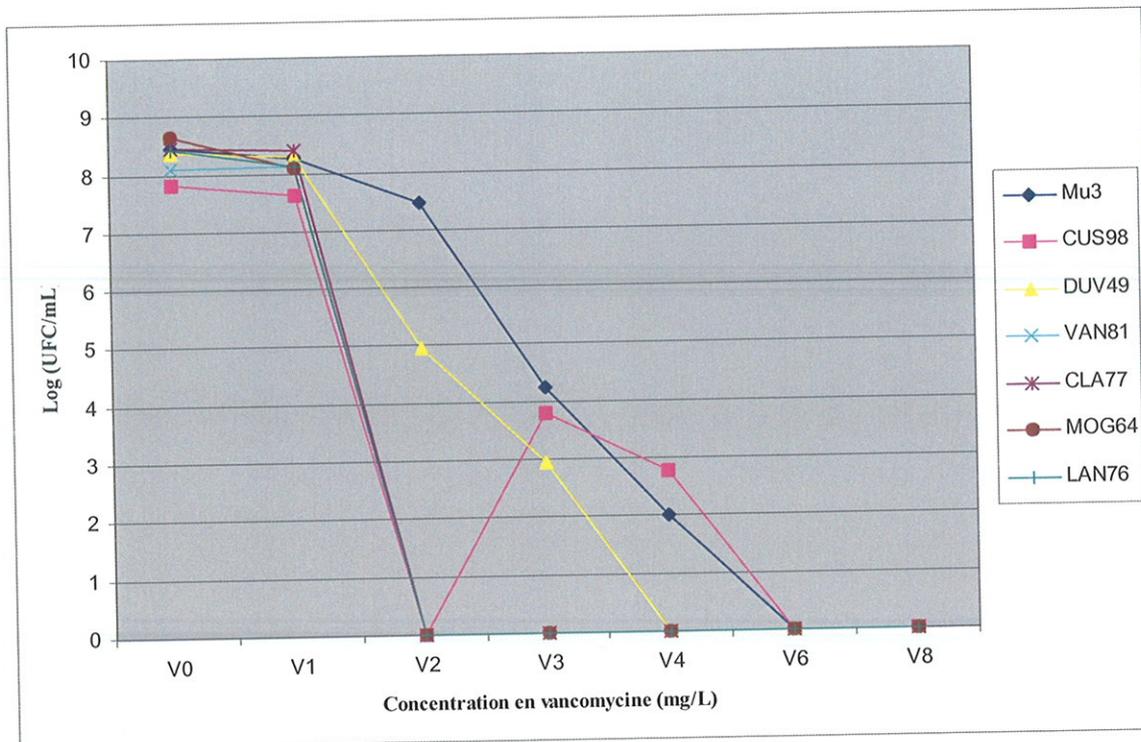


Figure 19 : Courbe de l'analyse de population n°3

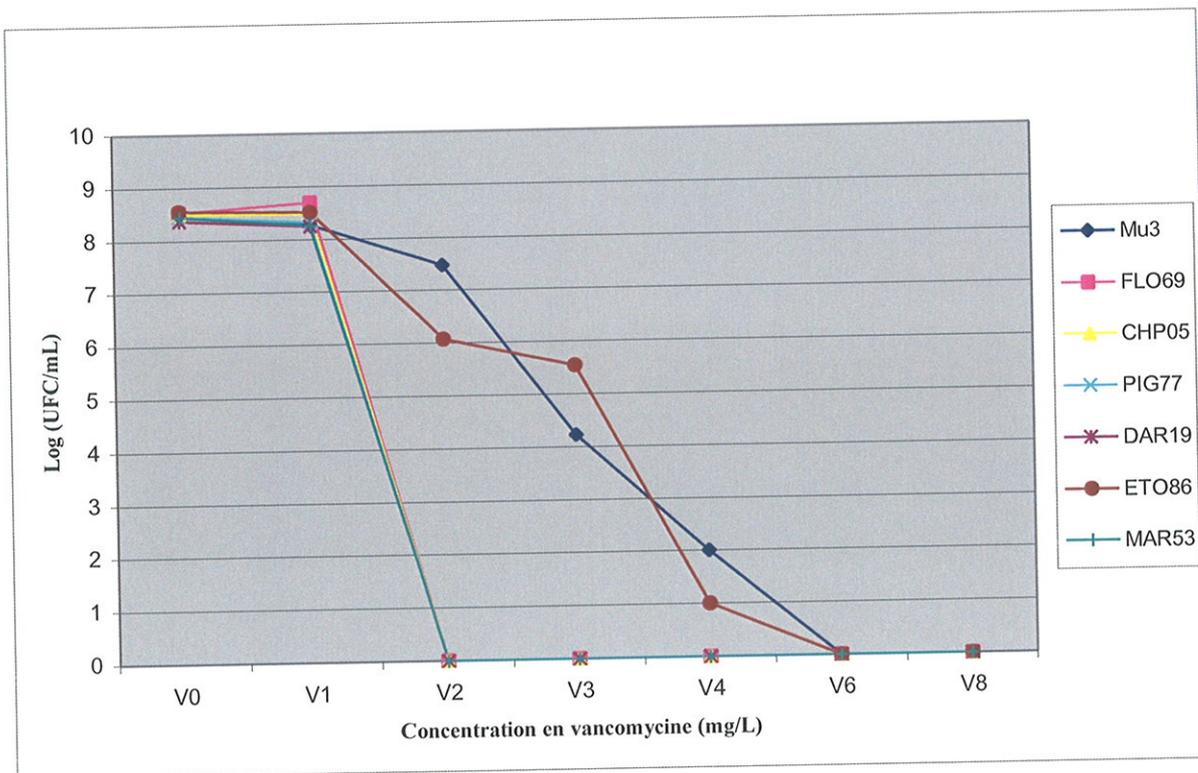


Figure 20 : Courbe de l'analyse de population n°4

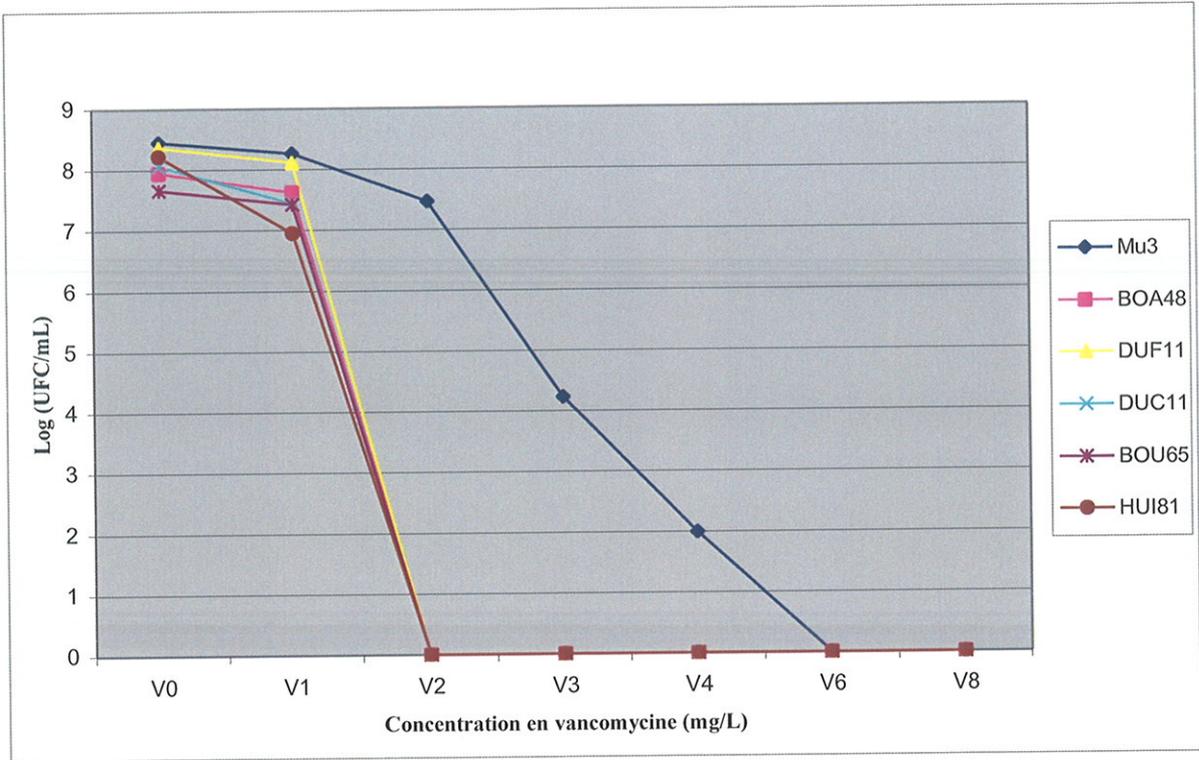


Figure 21 : Courbe de l'analyse de population n°5

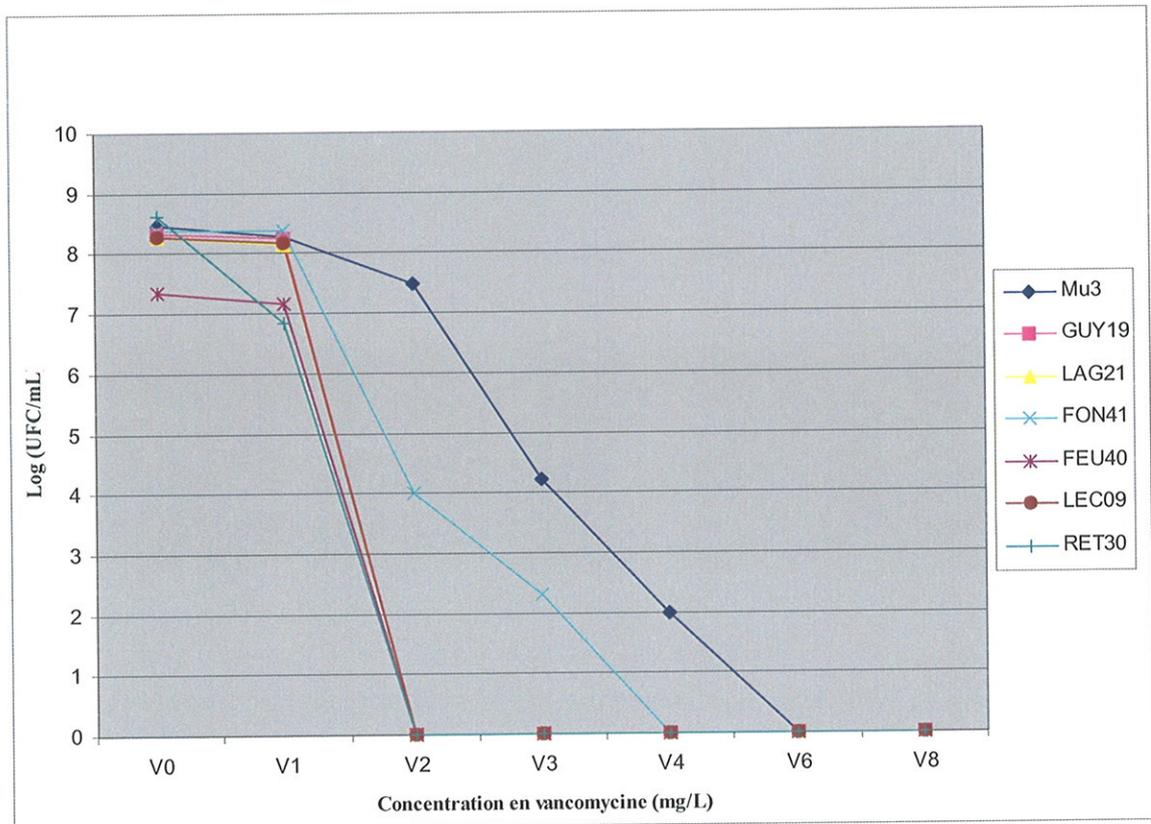


Figure 22: Courbe de l'analyse de population n°6

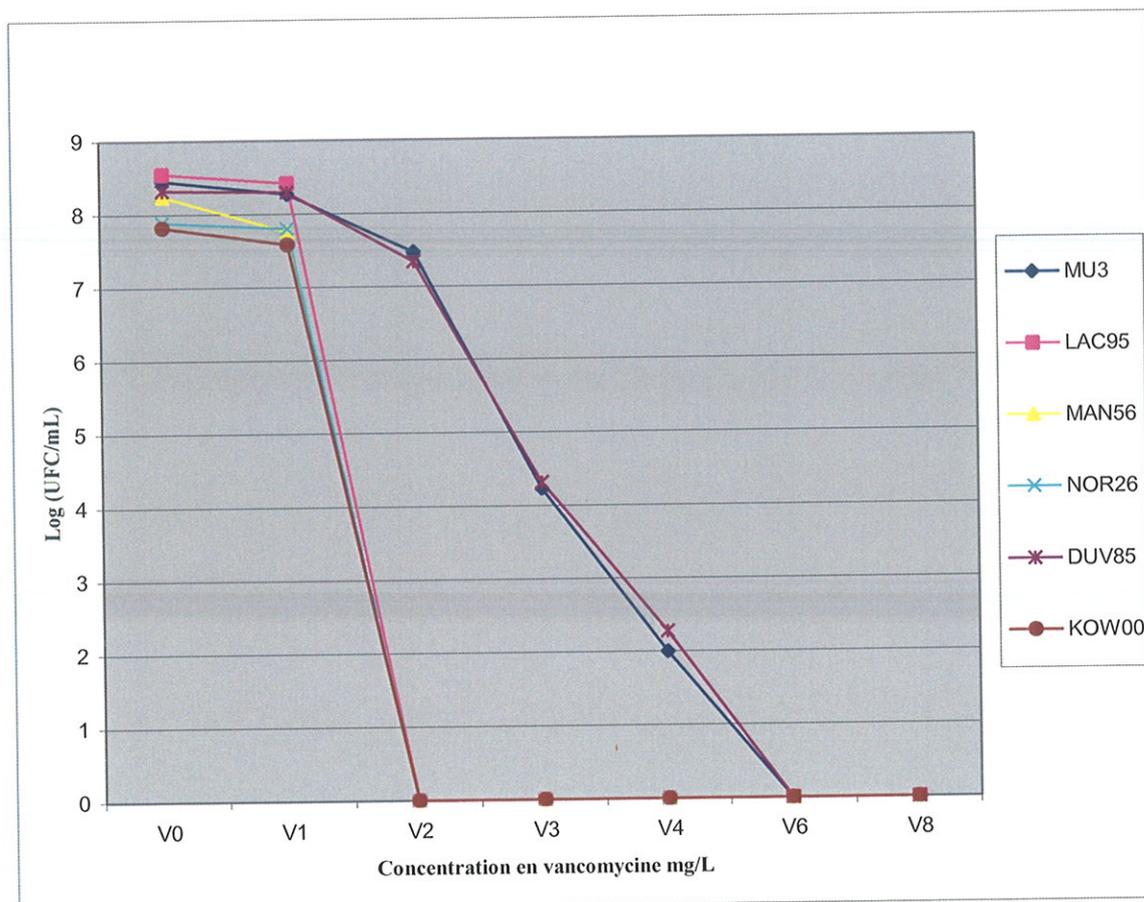


Figure 23 : Courbe de l'analyse de population n°7

Cinq souches se révèlent être positives après étude de population : CHA91, CUS98, DUV85, ETO86, FOU72, provenant de 5 patients différents.

Nous pouvons remarquer trois souches ayant un profil différent des souches sensibles mais n'ayant pas exactement le profil de Mu3. Ces souches présentent des colonies jusqu'à V3. Il s'agit de BOI21 (Fig 17), DUV49 (Fig 19), et de FON41 (Fig 22).

BOI21 a une CMI de la teicoplanine élevée (CMI=12 mg/L) mais n'a donc pas été confirmée comme une souche hGISA.

DUV49 a été isolée chez le même patient que DUV85 qui est hGISA. Elle est antérieure à DUV85 et ne présente pas de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

FON41 est une souche méticilline-sensible dont les CMI étaient peu élevées (CMI de la vancomycine = 6mg/L et CMI de la teicoplanine = 8mg/L).

Corrélation entre CMI et analyse de population. Les souches GISA présentent des CMI de la teicoplanine supérieures à celles de la vancomycine alors que c'est l'inverse chez les souches résistantes aux glycopeptides (VRSA) (67). Les CMI (inoculum 2McF) de la teicoplanine des 5 souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides après analyse de population sont toutes supérieures ou égales à 12 mg/L. Toutes les souches ayant les CMI les plus élevées ont été confirmées comme des hGISA. Il s'agit de CHA91 (CMI de la teicoplanine = 24mg/L), DUV85 (CMI de la teicoplanine = 24mg/L), ETO86 (CMI de la teicoplanine = 16mg/L), FOU91 et FOU72 (CMI de la teicoplanine = 24 et 32 mg/L respectivement). Cependant, CUS98 présente une CMI de la teicoplanine de 12 mg/L et a été confirmée par analyse de population comme hGISA (figure 19) et VAN81 qui présente une CMI de la teicoplanine de 16 mg/L s'est révélée être sensible (figure 19). Huit souches présentent des CMI de la teicoplanine équivalentes à celles de CUS98 (12 mg/L).

Les valeurs de CMI de la teicoplanine supérieures à 12mg/L sont corrélées avec une diminution de la sensibilité diminuée de la teicoplanine mais pour des CMI de 12 mg/L, il est, à priori impossible de conclure avant la confirmation par l'analyse de population. Les CMI de la vancomycine sont moins élevées, comprises entre 6 et 12 mg/L. Cependant, toutes les souches présentant des CMI de la vancomycine de 12 mg/L ont été confirmées comme des hGISA (DUV85, FOU91 et FOU72).

Toutes les souches révélées hGISA ont été testées ensemble en présence d'une souche sensible (MAN56) et de Mu3 comme témoin positif (cf figure 24).

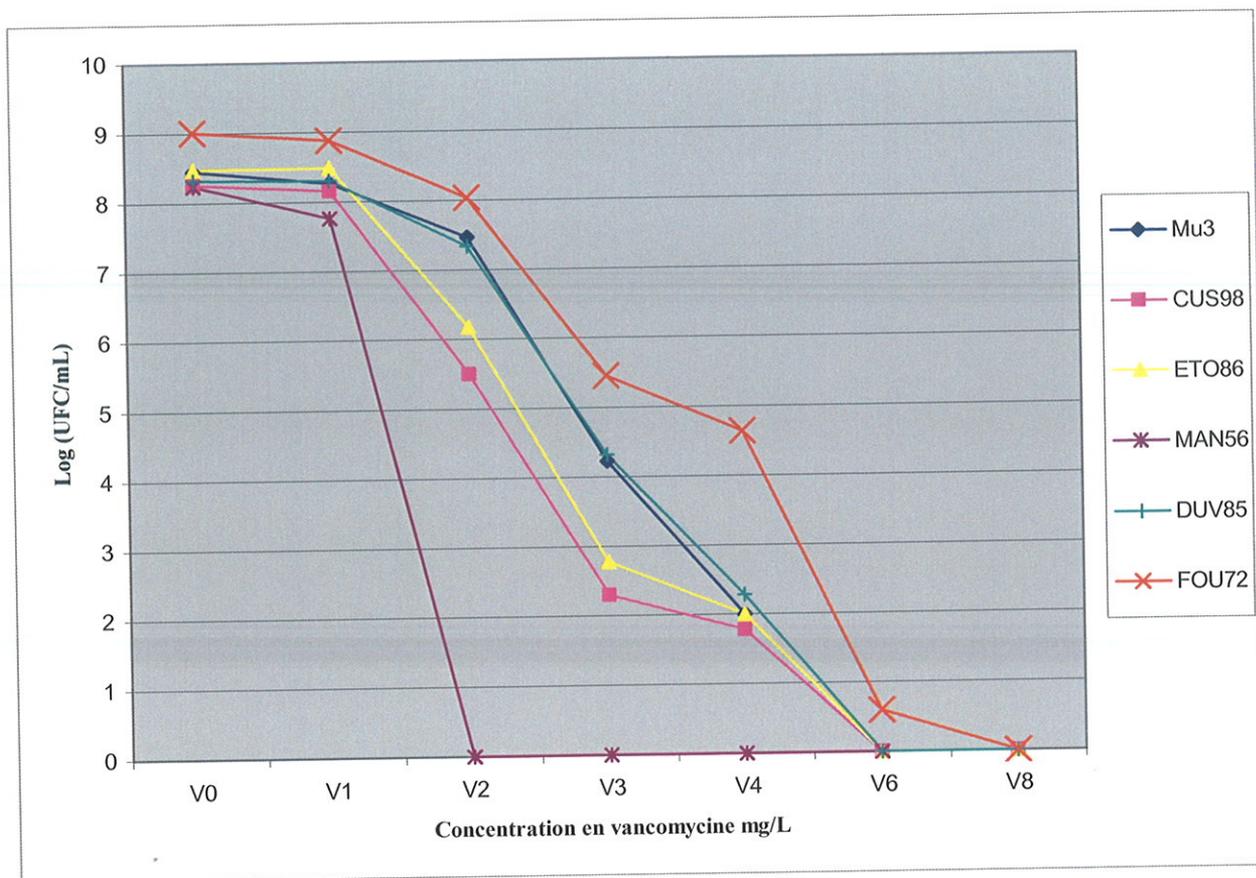


Figure 24 : Courbe de l'analyse de population n°8

En résumé, entre le 1^{er} Novembre 2004 et le 30 Avril 2005 :

Parmi les 41 souches sélectionnées par la détermination de CMI :

39 souches ont été étudiées en analyse de population (2 doublons éliminés)

34 souches se sont révélées sensibles

5 souches hGISA ont été isolées correspondant à 5 patients (tableau 14)

L'incidence des souches de sensibilité diminuée au cours de cette période est de 1,1%.

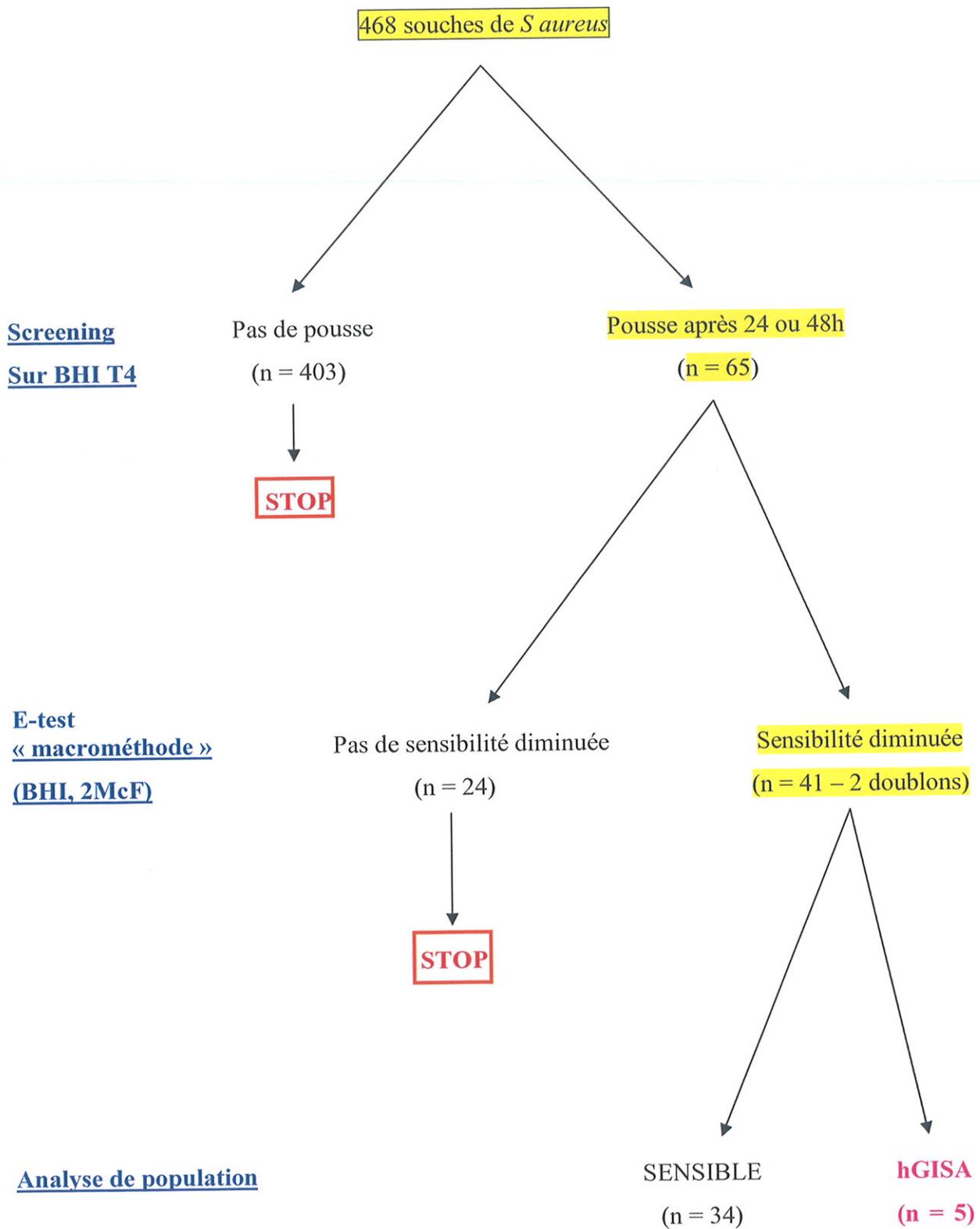


Figure 25: Résultats de l'étude des souches de *S. aureus* isolées de novembre 2004 à avril 2005

2. Analyse de population après le 30 avril 2005

Deux souches isolées après le 30 avril 2005 ont été étudiées en analyse de population.

- La souche FOU53 provenait d'un patient présentant des souches hGISA entre novembre 2004 et avril 2005 (FOU72, FOU91); il était donc intéressant dans ce cas d'observer l'évolution de la résistance et de confirmer le profil de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

- La souche RAO25 présentait une différence de plus de 3mm entre les diamètres de la vancomycine et de la teicoplanine sur l'antibiogramme en milieu solide. Il était intéressant de vérifier la concordance qu'il pouvait y avoir entre la recommandation du CA-SFM et notre précédente étude.

Une analyse de population a été effectuée afin de comparer le profil de ces souches avec celui d'une souche témoin Mu3 et d'une souche sensible KOW00.

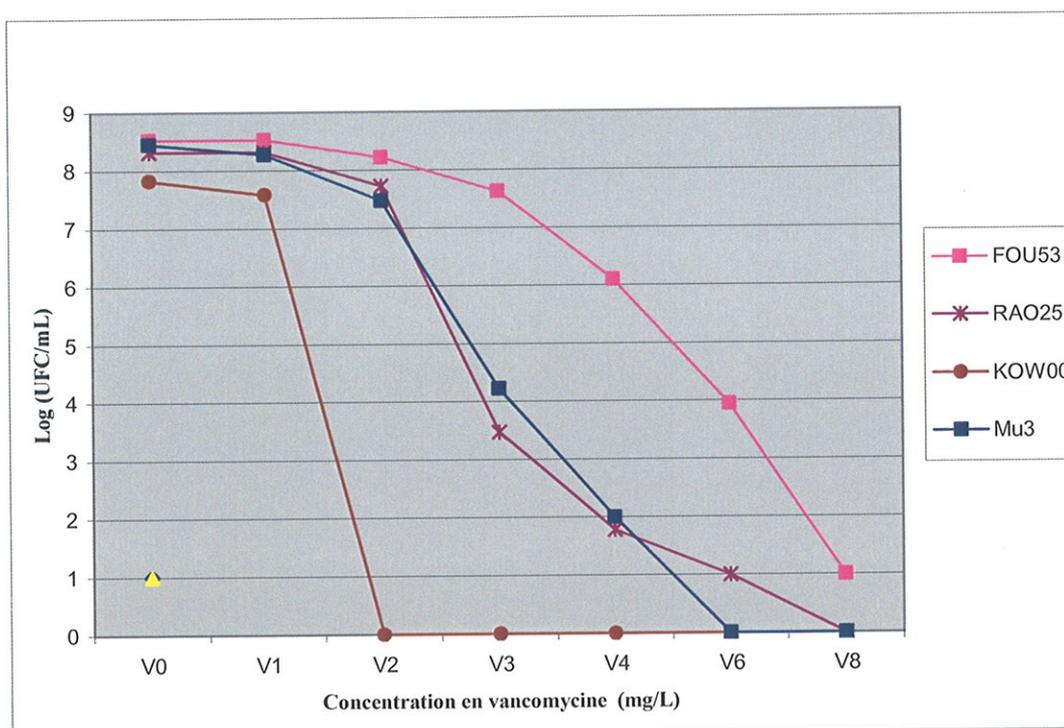


Figure 26 : Courbe de l'analyse de population n°9

Les souches RAO25 et Mu3 ont des profils similaires ce qui permet de conclure que RAO25 est une souche hGISA.

FOU53 ne présentait pas exactement la même allure que les autres souches hGISA. Sa décroissance était moins rapide (approximativement même nombre de colonies sur V0, V1,

V2), elle a donc été testée une autre fois avec comme témoins positifs: LIM2 et Mu50, souches GISA isolées à Limoges et au Japon respectivement (cf Figure 27).

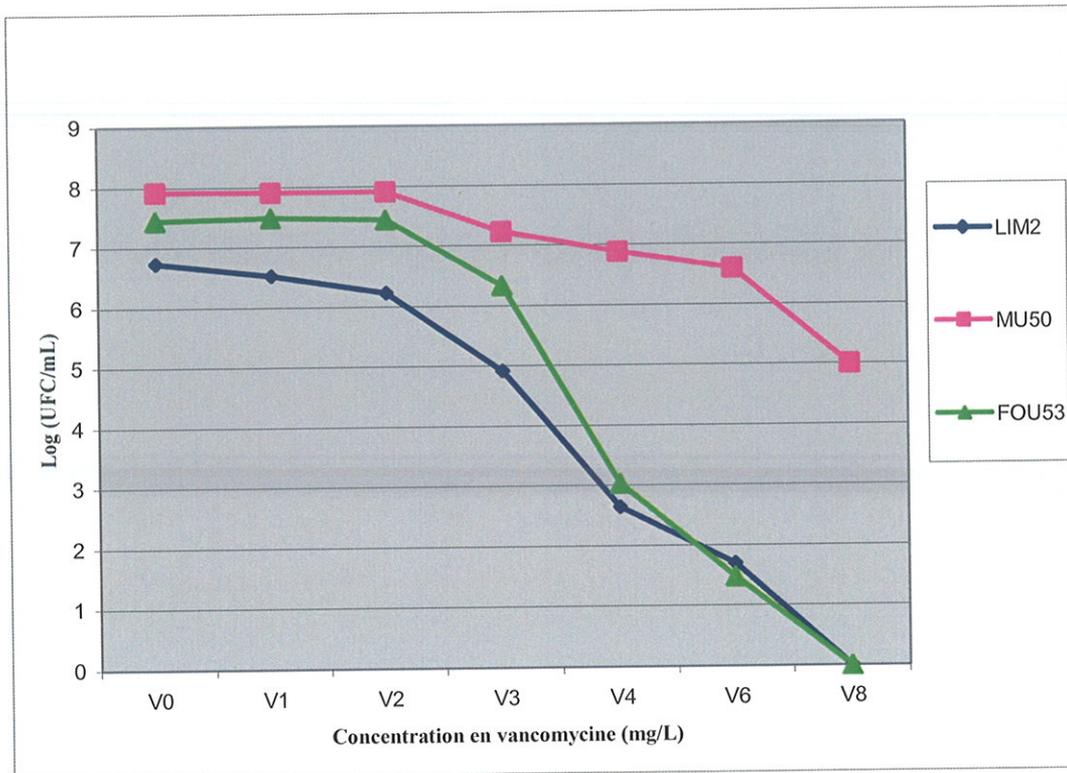


Figure 27 : Courbe de l'analyse de population n°10

Le profil de FOU53 est comparable à celui de la souche GISA, LIM2 : il s'agit d'une souche GISA.

Le tableau 16 rappelle les principales caractéristiques des souches hGISA et GISA isolées après l'étude de population : CHA91, CUS98, DUV85, ETO86, FOU91 (et son doublon FOU72) isolées dans la période de l'étude, entre novembre 2004 et avril 2005, ainsi que FOU53 et RAO25 isolées en Juin 2005.

Les CMI de référence en milieu solide (0,5 McF) de ces souches ont été effectuées.

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des souches hGISA et GISA isolées.

SOUCHE	CHA91	CUS98	DUV85	ETO86	FOU91	FOU72	FOU53	RAO25
DATE PVT	27/04/05	16/11/04	20/04/05	02/12/04	20/02/05	21/03/05	07/06/05	11/06/05
ORIGINE	Pulm.	Pus	Hémoc.	Pulm.	Pulm.	Pulm.	Pulm.	Pus
CMI Tec 0,5 McF	4	< 2	< 2	< 2	8	8	4	< 2
CMI Van 0,5 McF	1	1	1	1	2	2	2	1
Etest Tec 2 McF	24	12	24	16	24	32	32	24
Etest Van 2 McF	6	6	12	8	12	12	16	8
PROFIL								
Oxa	R	R	R	S	R	R	R	R
Genta	R	S	R	S	R	R	R	R
Pristina	S	S	R	S	S	S	S	R
RESULTAT	hGISA	hGISA	hGISA	hGISA	hGISA	hGISA	GISA	hGISA

Pulm. : prélèvement pulmonaire

V. DOSSIERS CLINIQUES

Les souches de sensibilité diminuée isolées provenaient de 6 patients différents. La consultation des dossiers cliniques a permis de collecter certaines informations résumées dans le tableau 17.

Le patient FOU est un jeune homme de 23 ans, atteint de mucoviscidose, greffé pulmonaire en Février 2003. Il présente d'autre part un diabète insulino-dépendant et une insuffisance rénale chronique. Il est connu du service depuis 2002 et une souche de *S. aureus* a été isolée régulièrement de ces expectorations depuis. L'étude du dossier ne montre qu'un traitement par la vancomycine, pendant la période post-greffe, du 12 avril au 15 mai 2003. Toutes les souches isolées pour ce patient entre novembre 2004 et avril 2005 (FOU91, FOU72 et

FOU53) ont été testées lors du screening sur BHI à 4 mg/L de teicoplanine et sélectionnées pour l'analyse de population après la détermination des CMI.

Le patient CHA est un homme de 31 ans, atteint, lui aussi de mucoviscidose et présentant un diabète insulino dépendant. Il est suivi en parallèle dans un hôpital parisien et à Bordeaux. Les cures d'antibiotiques prescrites par Paris contiennent de la vancomycine depuis Octobre 2002.

La première souche isolée d'un prélèvement pulmonaire à Bordeaux en Novembre 2002 présentait le même profil de résistance sur l'antibiogramme que celle isolée en Avril 2005 (CHA91).

Une autre souche de ce patient, CHA07 a été screenée lors de notre étude mais s'est révélée sensible après la détermination des CMI.

Le patient CUS est un homme de 44 ans, toxicomane et VHC positif, hospitalisé pour une endocardite à SARM. Ce patient a été traité par vancomycine du 12/10 au 12/11/2004 (avec une interruption entre le 03 et le 06/11, pour cause de surdosage) et les hémocultures se sont négativées. La souche CUS04, isolée à ce niveau, début Octobre, était sensible aux glycopeptides. Cependant, huit jours après la fin du traitement, la souche hGISA (CUS98) a été isolée d'un hygroma de son coude gauche.

Le patient DUV est un homme de 80 ans présentant un diabète non-insulino dépendant et hospitalisé plusieurs fois pour un mal perforant plantaire pour lequel il a été amputé de plusieurs orteils. Ce patient a reçu plusieurs fois de la vancomycine en post-opératoire pour une souche de *S. aureus* (DUV49) isolée de la plaie. Lors d'une hospitalisation pour décompensation cardiaque, en Avril 2004, le patient a fait une bactériémie et la souche DUV85 (hGISA) a été isolée des hémocultures.

Le patient RAO est un homme de 73 ans, hospitalisé en réanimation thoracique pour subir une ablation d'un adénocarcinome du cardia. Il présentait lui-aussi un diabète non-insulino dépendant. Nous n'avons pas retrouvé d'hospitalisations antérieures pour ce patient ni de traitements par vancomycine. La souche RAO25 a été isolée de la plaie opératoire.

Le patient ETO est un homme de 61 ans hospitalisé en réanimation thoracique pour une intervention sur un carcinome de l'œsophage. ce patient n'avait jamais reçu de traitement par

glycopeptides au préalable. Par contre, la souche ETO86, isolée d'un prélèvement pulmonaire, a été traitée par vancomycine avec succès.

Tableau 17 : Caractéristiques des patients

SOUCHES	CHA	CUS	DUV	ETO	FOU	RAO
AGE	31	44	80	61	23	73
PATHOLOGIE CHRONIQUE	Muco-viscidose DID	Toxicomane VHC	DNID Mal perforant	Carcinome (Esophage)	Mucoviscidose /Greffé pulmonaire	DNID Adénocarcinome cardia
DATE HOSPIT	Consultation	21/10/2004	11/04/2005	20/09/2004	06/06/2005	23/05/2005
HOSPIT ANTERIEURE	OUI	NON	OUI	OUI	OUI	NON
DATE ISOLEMENT GISA ou hGISA	27/04/2005 CHA91	16/11/2004 CUS98	20/04/2005 DUV85	02/12/2004 ETO86	20/02/05-FOU91 21/03/05-FOU72 07/06/05-FOU53	11/06/2005 RAO25
SERVICE	CRCM	MEDECINE	REA DIG	REA THO	CHIR THO	REA
TTT VANCO ANTERIEUR	OUI	OUI	OUI	NON	OUI	NON
DATE	Cures d'AB Depuis Oct 2002	12/10 au 03/11/04 et 06 au 12/11	24/11 au 02/12/2004		Depuis 2003	
TTT		inconnu	Zyvoxid	Tazocilline + Oflocet + Vancocine (du 03 au 12/12)		-Tazocilline+ Amiklin -Tienam+ Gentalline
DOSAGES VANCOMYCINE (en mg/L) N perf: 10-35 mg/L		22/10/04 : 40 28/10/04 : 33 03/11/04 : 61 06/11/04 : 16 10/11/04 : 19	26/11/04 : 16 29/11/04 : 28 02/12/04 : 42	04/12/04 : 19 06/12/04 : 25 09/12/04 : 25 13/12/04 : 2		
ECHEC THERAPEUTIQUE	OUI	OUI	NON	NON	OUI	NON

VI. ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE

Afin de déterminer s'il s'agissait d'un même clone ou de souches différentes, nous avons effectué une électrophorèse en champ pulsé, technique de choix dans les études épidémiologiques et permettant de comparer des souches entre elles.

Nous avons donc comparé les 7 souches hGISA et GISA sélectionnées après notre étude à des souches témoins : une souche méticilline sensible non sélectionnée pour l'étude de population GON13, la souche *S. aureus* de référence ATCC25923, la souche Mu3. Nous avons ajouté également les souches CHA07, CUS04, DUV49.

- bande 1 : marqueur de poids moléculaire (concatémère lambda)
- bande 2 : souche de référence ATCC25923
- bande 3 : souche GOZ13 (sensible aux glycopeptides)
- bande 4 : souche Mu3 (témoin GISA)
- bande 5 : souche FOU72 (hGISA)
- bande 6 : souche FOU53 (GISA)
- bande 7 : souche DUV49 (mal perforant)
- bande 8 : souche DUV85 (hémoculture)
- bande 9 : souche RAO25 (plaie opératoire)
- bande 10 : souche CHA07 (prélèvement pulmonaire de janvier 2005)
- bande 11 : souche CHA91 (prélèvement pulmonaire d'avril 2005)
- bande 12 : souche CUS04 (hémoculture)
- bande 13 : souche CUS98 (hygroma du coude)
- bande 14 : souche ETO86 (prélèvement pulmonaire)
- bande 15 : marqueur de poids moléculaire (concatémère lambda)

Aucune souche ne présente le même pulsotype que la souche japonaise de référence hGISA, Mu3.

FOU72 et FOU53 présentent le même pulsotype ; la souche FOU53 (GISA) serait donc bien issue de la souche FOU72 (hGISA).

Les souches DUV49 et DUV85 ne présentent pas le même pulsotype, ce qui prouve que la souche isolée du mal perforant plantaire n'était pas à l'origine de la bactériémie (avec un profil de résistance sur l'antibiogramme différent). Par contre, la souche DUV85 semble très

proche de la souche RAO25, ce qui peut évoquer une transmission, puisque les 2 patients sont passés dans le même service à quelques jours d'intervalle.

Les souches CUS04 et CUS98 sont identiques, donc la souche à l'origine de la bactériémie est bien la même que celle de l'hygroma du coude. Leur profil de résistance sur l'antibiogramme était, de plus, identique.

CHA91 et CHA07 ne sont pas issues du même clone. Toutes les autres souches ont des pulsotypes différents.

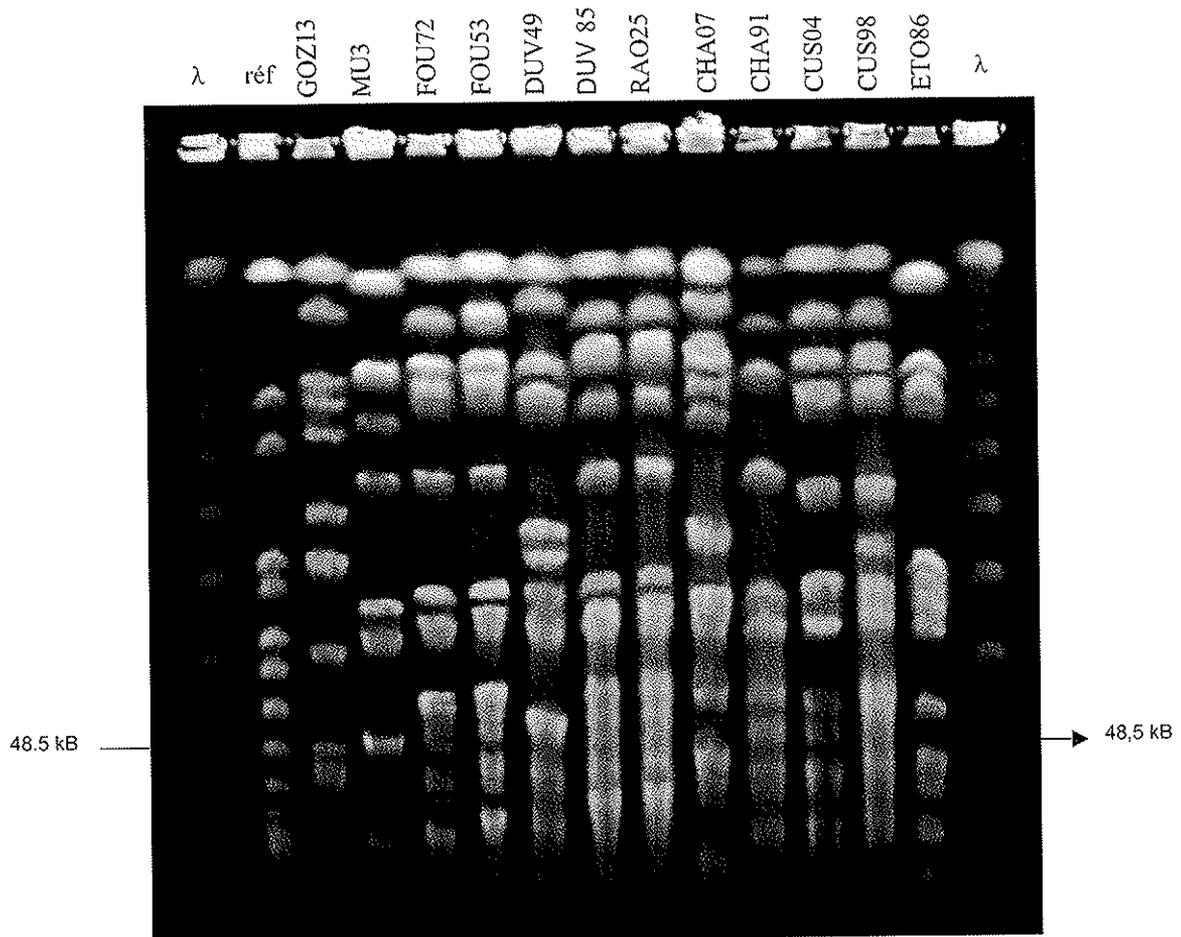


Figure 28 : Pulsotypes des différents souches après hydrolyse par l'enzyme SmaI

DISCUSSION

La détection des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides est un vrai challenge pour les laboratoires de bactériologie.

Depuis l'isolement par Hiramatsu d'une souche de sensibilité diminuée à la vancomycine Mu50 en 1997 (41), suivi de l'isolement de souches similaires aux Etats-Unis (85) et en France (77), de nombreuses études ont essayé de détecter ce type de résistance chez *S. aureus*.

La mise en évidence d'une hétéro-résistance à la vancomycine par Hiramatsu (Mu3) (39), a entraîné une remise en question des méthodes de détection. En effet si les souches GISA peuvent être mises en évidence par détermination de leurs CMI aux glycopeptides, les hGISA se montrent sensibles par les mêmes techniques. La faible fréquence ($\leq 10^{-6}$) des sous-populations diminue la sensibilité des méthodes utilisées en routine. De ce fait, aucune technique standardisée n'est encore disponible.

Une détection efficace des souches GISA et hGISA demande des procédures efficaces basées sur des milieux appropriés, des inocula et des temps d'incubation adéquats.

Nous avons étudié 468 souches de *S. aureus* isolées entre novembre 2004 et avril 2005, à l'hôpital du Haut Lévêque, chez 331 patients. Notre étude s'est déroulée en trois parties : tout d'abord un screening sur gélose BHI à 4 mg/L de teicoplanine, puis les CMI par la méthode des E-test avec un inoculum Mac Farland 2 ont été réalisées sur les souches sélectionnées. Enfin, les souches dont les CMI de la teicoplanine et de la vancomycine étaient supérieures à certains seuils (CMI de la vancomycine ≥ 4 mg/L et CMI de la teicoplanine ≥ 8 mg/L ou CMI de la vancomycine ≤ 4 mg/L et CMI de la teicoplanine ≥ 12 mg/L) ont été étudiées en analyse de population.

I. A PROPOS DE LA TECHNIQUE

1. Le screening

Dans notre étude, nous avons effectué un screening sur gélose BHI contenant 4 mg/L de teicoplanine. Cette technique a permis de sélectionner 65 souches sur les 468 souches initiales ce qui correspond à 14,9 % des souches testées. Il est difficile de comparer nos résultats à

ceux de la littérature, étant donné que les études n'utilisent pas, soit le même milieu, soit le même antibiotique, soit le même inoculum, soit la même population de départ (*S. aureus* ou SARM). Ainsi, les pourcentages de positivité après le screening varient beaucoup selon les techniques utilisées, lors de l'étude, celles-ci sont nombreuses et sont le plus souvent des variantes des techniques recommandées par le CA-SFM ou le CDC.

Le CA-SFM (5) recommande un screening sur gélose Mueller-Hinton à 5 mg/L de teicoplanine, ensemencé par dépôt de 10 µl d'une suspension étalonnée à 2 McF. La sensibilité diminuée est suspectée par la présence d'au moins 4 colonies après incubation à 35-37°C et lecture à 24 et 48 h.

Le CDC recommande un screening sur gélose BHI contenant 6 mg/L de vancomycine ensemencé par dépôt de 10 µl d'une suspension étalonnée à 0,5 McF. Le résultat est positif si l'on observe plus de 2 colonies après incubation à 35-37°C pendant 24h.

Les résultats des différentes techniques retrouvées dans la littérature selon le milieu, l'inoculum, la nature et la concentration en antibiotique sont résumés dans le tableau 18.

Les pourcentages de souches positives après screening varient de 1,7 à 56,6%. Il est à noter que la majorité des études publiées sélectionne initialement une population de SARM. Liu (58) avait montré que sur 14 études publiées entre 1997 et 2001, neuf avaient screené des SARM ce qui représente 6052 SARM sur 7920 souches testées. Les résultats ont pu être biaisés par le choix délibéré de ne tester que des souches présentant une résistance à la méticilline car depuis, une souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides, méticilline sensible a été publiée. Elle provenait d'une patiente de 35 ans, porteuse de lentilles et souffrant d'une conjonctivite. Elle était sensible à la méticilline (CMI oxacilline < 0,5 mg/L) et n'était porteuse que d'une pénicillinase. Cette patiente n'avait pas reçu de glycopeptides (16).

Dans l'étude de Limoges (Juillet 2001 – Juin 2002) (76), 7 souches sur 2300 *S. aureus* testées étaient des hGISA sensibles à la méticilline.

Dans notre étude, sur les 6 souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides isolées, une souche (ETO86) est la seule sensible à la méticilline. Ce résultat confirme le fait que toutes les souches de *S. aureus* et pas seulement les SARM doivent être screenées.

Tableau 18 : Caractéristiques et résultats des techniques de screening de différentes études publiées.

ETUDE	MILIEU	AB	[C] (mg/L)	Inoc (McF)	SOUCHES	TOTAL	SOUCHES POSITIVES	%
Denis (28)	BHI	V	6	0,5	SA	2145	146	6,8
Reverdy (78)	MH	V T	2 4	0,5	SA	640	81	12,6
Ploy (76)	BHI	T	4	2	SA	2300	555	24,1
Bordeaux (2005)	BHI	T	4	2	SA	468	65	13,9
Pierard (75)	MH	T	5	2	SARM	1002	17	1,7
Mastouri (65)	MH	T	5	0,5	SARM	96	11	11,5
Lecaillon (55)	BHI	V	4	2	SARM	367	188	51,2
Marchese (63)	BHI	V	4	2	SARM	179	38	21,2
Sancak (82)	BHI	V	4	0,5	SARM	256	145	56,6
Mallaval (61)	BHI	T	5	2	SARM	883	102	11,6
Cartolano (20)	BHI	T	6	0,5	SARM	1070	145	13,6

AB = antibiotique T = teicoplanine V = vancomycine C = concentraion

Inoc = inoculum des 10 µlensemencés

SA = *S. aureus* MH = Mueller Hinton BHI = Brain Heart Infusion

2. E-test en « macrométhode »

Les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine des souches sélectionnées par le screening ont été effectuées sur gélose BHI, avec un inoculum dosé à 2 McF.

Sur les 65 souches, nous avons retenu 41 souches potentiellement GISA (63%) selon les critères du fabricant (AB Biodisk, Solna, Sweden) : CMI de la vancomycine ≥ 4 mg/L et CMI de la teicoplanine ≥ 8 mg/L ou CMI de la vancomycine ≤ 4 mg/L et CMI de la teicoplanine ≥ 12 mg/L.

Walsh (102) a démontré que cette technique était la méthode de choix pour screener les souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides. En effet, il trouve 97 % de spécificité et 96% de sensibilité (tableau 6) et en comparant toutes les méthodes testées, il conclut que le milieu BHI est le milieu de choix pour effectuer les CMI en « macrométhode ». De la même façon, B lstrom et al (17) ont rapporté que l'utilisation d'un inoculum (2McF), d'un milieu riche (BHI) et d'une période d'incubation de 48h optimise la détection des GISA et des hGISA. De plus, Wooton (110) la décrit comme une technique présentant peu de faux positifs.

Cette technique a donc été très souvent utilis e dans les études publi es. Contrairement au screening, les pourcentages de la littérature des souches potentiellement GISA après la détermination des CMI varient peu : 50% (73 souches sur les 146 sélectionnées après le screening) pour Denis (28), 53% (9/17 souches) pour Pierard (75), 31% (58/188) pour Lecaillon (55), 53% (294/555 souches) pour Ploy (76). La seule étude se démarquant est l'étude lyonnaise (78) qui présente un taux de 8,6% (7/81 souches).

Cette technique qui pourtant permet d'éliminer au moins 50 % des souches sélectionnées par le screening manque, pour certains, de spécificité. Denis rapporte 90% de faux-positifs pour cette technique de E-test avec inoculum lourd et incubation prolong e. Dans notre étude, le taux de faux-positifs s'élève à 85%.

Ce travail a permis de montrer que les souches ayant les CMI de la vancomycine les plus  lev es (≥ 12 mg/L) se révèlent être des hGISA. Les CMI de la teicoplanine > 16 mg/L sont li es à une sensibilité diminuée. Mais ce seuil ne permet pas de détecter toutes les souches hGISA.

3. Analyse de population

Une analyse de population a été réalisée à partir des 39 souches sélectionnées par la détermination des CMI par E-test (après exclusion des doublons : CHE73 et FOU91). Cinq souches (provenant de 5 patients) se sont révélées être des hGISA. L'incidence des souches hGISA de novembre 2004 à avril 2005 est de 1,1% (5/468) des souches de *S. aureus* testées.

L'étude de Limoges (76), dont nous avons utilisé la méthode, montre une incidence élevée (11%) durant la période de Juillet 2001 à Juillet 2002 mais l'électrophorèse en champ pulsé a permis de démontrer l'appartenance de 88,2% des souches à un même clone épidémique. Durant la période de Février 2003 à Juillet 2004, l'incidence des hGISA était de 0,95%, résultat similaire au nôtre.

Les incidences des hGISA varient énormément d'une étude à l'autre mais sont < 1% dans des études de surveillance conduites en Grande-Bretagne, Italie, USA et Corée. Par contre, des prévalences plus élevées ont été rapportées au Japon (5-22%), en Allemagne (2-14%), les Pays-Bas (7,6%) et en France (20%) (71).

Il est clair que ces incidences sont dépendantes de la technique de screening utilisée, de la population sélectionnée (65% des SARM responsables d'infections en orthopédie)(9).

Cette méthode d'analyse de population apparaît dans la littérature comme la méthode de référence. Walsh et Howe (103) recommandent cette technique comme la méthode de confirmation du statut d'hGISA. En effet, l'analyse de population d'Hiramatsu, utilisée antérieurement semblait sélectionner la résistance et non la détecter et lorsqu'on la compare à la technique de Howe, elle révèle avoir une sensibilité de 71% et une spécificité de 88% et Mu 3 n'est détecté que dans 80% des cas (103).

Les études publiées entre 1997 et 2001 montrent que 132 souches hGISA ont été trouvées à partir de 7920 souches de *S. aureus* testées. Liu (58) a calculé une prévalence moyenne de 1,67% (les prévalences des différentes études s'échelonnent entre 0 à 74% - tableau 7). Il faut noter que la majorité de ces techniques a confirmé l'hétérorésistance des souches par la méthode d'analyse de population d'Hiramatsu et de plus, elles ont sélectionné comme population de départ des SARM.

Les études utilisant l'étude de population de Howe présentent des prévalences plus faibles. Les taux varient de 0,1 à 1,9 % des souches initiales de *S. aureus* (28, 55, 71, 75, 78).

II. CARACTERISTIQUES DES SOUCHES ET CONTEXTE CLINIQUE

En résumé, six souches se sont révélées être des hGISA et une souche serait une homo-GISA. Dans nos observations, nous retrouvons les différents arguments décrits dans la littérature (8, 9, 68, 69, 72, 77, 101) pour expliquer la sélection de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

La pression de sélection par la prise de glycopeptides.

Le patient CHA a reçu de nombreuses cures de vancomycine depuis Octobre 2002 et reste porteur d'une souche de SARM présentant le même profil de résistance.

Les souches FOU53, FOU91 et FOU72 sont issues du même clone, elles présentent le même pulsotype en PFGE. Lorsque l'on regarde les CMI (2 McF) de ces souches et les dates d'isolement, on remarque une augmentation des CMI de la teicoplanine (24 à 32 mg/L) et de la vancomycine (12 à 16 mg/L) ainsi qu'une modification des profils en analyse de population. La dernière souche FOU53 est GISA alors que les 2 autres souches isolées sont hGISA.

Selon Hiramatsu (38), les souches GISA sont issues d'un processus en 2 étapes à partir des souches SARM. En présence de vancomycine, ces souches SARM deviennent des hGISA qui eux, sont des précurseurs de GISA. Le statut hGISA est un processus d'évolution de *S. aureus* afin de résister à la pression de sélection causée par les glycopeptides. Les hGISA sont capables de générer à une haute fréquence des GISA. Cette transformation est réversible dès que la pression par l'antibiotique cesse. Cependant dans le cas de FOU, ce patient est colonisé par un SARM présentant ce phénotype depuis 2002 et il n'a reçu théoriquement qu'une cure de vancomycine d'avril à mai 2003.

Pour le patient DUV, 2 types de souches ont été étudiées: DUV49 issue d'un mal perforant et DUV85 isolée dans les hémocultures. Ce patient a reçu plusieurs cures de vancomycine depuis novembre 2004, antérieures à l'isolement de l'hGISA qui aurait permis le développement de la résistance. Cependant la première souche, sensible aux glycopeptides, isolée du mal perforant plantaire en novembre 2004 présente un profil différent en PFGE et l'hGISA (DUV85) isolée en avril 2005 ne serait donc pas issue de cette souche.

Il a été montré également que l'évolution des souches hGISA est liée non seulement à la pression de sélection exercée par l'antibiotique mais aussi à une diffusion tissulaire limitée des glycopeptides et à la diminution de la bactéricidie de l'antibiotique sur ces souches (38). En ce qui concerne CUS, ce patient était porteur d'un SARM. Cette souche (CUS04) isolée dans ces hémocultures était sensible aux glycopeptides. Le traitement par la vancomycine a permis de négativer ces hémocultures. Cependant l'isolement d'une souche hGISA (CUS98) au niveau d'un hygroma du coude prouve un échec de la vancomycine instaurée comme traitement de son endocardite. Dans ce cas, il est possible que la vancomycine n'ait pas diffusé correctement au niveau de l'hygroma. La souche de *S. aureus* présente à ce niveau a été exposée à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotique qui auraient permis le développement de la résistance, surtout que les dosages sériques de vancomycine à partir du 06/11/04 sont inférieurs aux concentrations recommandées (16 et 19 mg/L) alors qu'ils étaient beaucoup plus élevés dans le début du traitement de la bactériémie (40 à 60 mg/L).

Les souches isolées sans pression de sélection par les glycopeptides

Il n'a pas été retrouvé de traitement par la vancomycine antérieur à l'isolement de RAO25. Son pulsotype en PFGE était identique à celui de DUV85. Ces 2 souches DUV85 et RAO25 sont issues du même clone : même profil de résistance et même pulsotype en PFGE.

Les deux patients n'ont pas été hospitalisés en même temps : du 11/04 au 13/05/05 pour DUV, et du 23/05 au 16/07/05 pour RAO. Les services d'accueil n'étaient pas les mêmes mais sont dans le même bâtiment et partagent certaines salles et du matériel. Le traitement par vancomycine de DUV a pu entraîné une pression de sélection suffisante pour développer une souche de sensibilité diminuée à la vancomycine. RAO n'a pas reçu de glycopeptides et a pu se contaminer avec la souche de DUV. On peut se demander pourquoi d'autres souches n'ont pas été isolé dans le cas, que nous supposons, d'une transmission épidémique.

Ce cas, comme celui de ETO qui n'a jamais reçu de glycopeptide, peut être aussi rapproché de celui de la deuxième souche VRSA. Elle a été isolée aux Etats-Unis, chez un patient n'ayant pas été hospitalisé ni reçu de vancomycine dans les 5 années antérieures à l'isolement (107). Une exposition à la vancomycine n'est donc pas nécessaire au développement d'une souche de sensibilité diminuée à la vancomycine, dans ce cas, VRSA. Il a été retrouvé dans ces antécédents une colonisation par un SARM et un entérocoque résistant à la vancomycine.

Des échecs thérapeutiques ont été publiés chez des patients porteurs de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (8, 9, 68, 69, 72, 77, 101, 105) mais d'autres études ont montré des succès thérapeutiques. Bert (13) a étudié une population de 48 patients greffés rénaux. Grâce à un protocole de détection similaire à celui du laboratoire du CHU de Limoges, il a détecté 13 souches hGISA (27%). Seulement 2 patients sur les 13 infectés ou colonisés par un hGISA avaient reçu un traitement antérieur par la vancomycine. La majorité des patients ont été traités avec succès par la vancomycine, un seul patient n'a pas répondu au traitement.

Dans notre étude on peut parler d'échec thérapeutique dans plusieurs cas. Tout d'abord chez les deux patients atteints de mucoviscidose (CHA et FOU), surtout le patient CHA qui reçoit des cures de vancomycine depuis 2002 et pour lequel on isole régulièrement la même souche. Dans le cas du patient CUS, on peut parler d'échec car le traitement à la vancomycine, s'il a été efficace sur la bactériémie, n'a pas empêché l'évolution de l'hygroma.

Par contre, pour le patient ETO, il s'agit d'un succès thérapeutique puisqu'il n'a pas été retrouvé de prélèvements positifs postérieurs à l'isolement de la souche ETO86.

Les patients DUV et RAO ont été traités par des antibiotiques différents des glycopeptides.

CONCLUSION

Les glycopeptides constituent un traitement de choix pour les infections à SARM mais l'émergence de souches de sensibilité diminuée peut poser des problèmes.

Selon le protocole de détection des GISA réalisé au CHU de Limoges (screening, Etest sur BHI 2 McF, analyse de population), l'étude menée entre le 1^{er} novembre 2004 et le 30 avril 2005 à l'hôpital Haut-Lévêque a permis d'isoler 5 souches hGISA parmi les 468 souches testées.

L'incidence s'élève à 1,1%, elle est proche des incidences décrites dans la littérature et de celle trouvée au CHU de Limoges de février 2003 à juillet 2004 (0,95%).

L'étude des souches en champ pulsé a permis de montrer une diversité dans les souches isolées.

Les 6 patients étudiés et porteurs de ces souches présentaient tous une infection chronique et/ou une infection ou colonisation récurrente par des SARM. L'émergence de ces souches par pression de sélection due à un traitement antérieur par des glycopeptides a été retrouvée pour 4 patients seulement. Parmi les 3 patients traités par vancomycine, on note un seul succès thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Centers For Disease Control and Prevention.** 1997. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-- United States,1997. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **46(33):765-6.**
2. **Centers For Disease Control and Prevention.** 2004. Brief Report: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*--New York,2004. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **53(15):322-323.**
3. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2004. Investigation and control of Vancomycin-Intermediate and Resistant- *Staphylococcus aureus* (VISA/VRSA) - Health Department and Infection Control Guidance disponible sur www.cdc.gov/ncidod/hip/vanco/vanco.htm.
4. **Centre national de référence des toxémies à Staphylocoques (CNR-TS)** disponible sur <http://dm3.univ-lyon1.fr/staph/txtstaph.htm>.
5. **Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie** - communiqué 2005 - <http://www.sfm.asso.fr>.
6. **Faculté de médecine de la Pitié Salpêtrière** "Staphylocoques" disponible sur <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.3.html>.
7. **National Committee for Clinical Laboratory Standards** "antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th Ed" Approved standard M7-A6. NCCLS, Wayne, PA, USA 2003.
8. **Andrade-Baiocchi, S., M. C. Tognim, O. C. Baiocchi, and H. S. Sader.** 2003. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. *Diagn Microbiol Infect Dis* **45:149-52.**
9. **Ariza, J., M. Pujol, J. Cabo, C. Pena, N. Fernandez, J. Linares, J. Ayats, and F. Gudiol.** 1999. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* **353:1587-8.**
10. **Avril, J. L., H. Dabernat, F. Denis, H. Monteil.** 2000. Bactériologie clinique Ellipses 3ème ed.
11. **Berche, P., J. L. Gaillard, M. Simonet.** Bactériologie - Bactéries des infections humaines, collection de la biologie à la clinique, Médecine-Sciences. Flammarion.
12. **Bernard, L., P. Vaudaux, P. Rohner, E. Huggler, M. Armanet, D. Pittet, D. P. Lew, and J. Schrenzel.** 2004. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Microbiol Methods* **57:231-9.**
13. **Bert, F., J. Clarissou, F. Durand, D. Delefosse, C. Chauvet, P. Lefebvre, N. Lambert, and C. Branger.** 2003. Prevalence, molecular epidemiology, and clinical significance of heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* **41:5147-52.**
14. **Bierbaum, G., K. Fuchs, W. Lenz, C. Szekat, and H. G. Sahl.** 1999. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18:691-6.**
15. **Bille, J.** "Glycopeptides" in C. Carbon, B. Regnier, G. Saimot, J.L. Vildé, P. Yeni "médicaments anti-infectieux" 1994 Flammarion Médecine-Sciences.
16. **Bobin-Dubreux, S., M. E. Reverdy, C. Nervy, M. Rougier, A. Bolmstrom, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2001. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative. *Antimicrob Agents Chemother* **45:349-52.**

17. **Bolmstrom, A., A. Karlsson, P. Wong.** 1999. Macromethod conditions are optimal for detection of low level glycopeptide resistance in *staphylococcus*. Clin Microbiol Infect **5** (suppl 3):113.
18. **Boyle-Vavra, S., S. K. Berke, J. C. Lee, and R. S. Daum.** 2000. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother **44**:272-7.
19. **Brun, Y., M. Bes.** "Staphylococcus" in :J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet "Précis de bactériologie clinique" Ed ESKA 2000 p 783-819.
20. **Cartolano, G. L., M. Cheron, D. Benabid, M. Leneveu, and A. Boisivon.** 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to glycopeptides (GISA) in 63 French general hospitals. Clin Microbiol Infect **10**:448-51.
21. **Chang, S., D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. Shah, J. T. Rudrik, G. R. Pupp, W. J. Brown, D. Cardo, and S. K. Fridkin.** 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med **348**:1342-7.
22. **Charles, P. G., P. B. Ward, P. D. Johnson, B. P. Howden, and M. L. Grayson.** 2004. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis **38**:448-51.
23. **Clark, N. C., L. M. Weigel, J. B. Patel, and F. C. Tenover.** 2005. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother **49**:470-2.
24. **Courvalin, P.** 2005. Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens. Int J Med Microbiol **294**:479-86.
25. **Cui, L., X. Ma, K. Sato, K. Okuma, F. C. Tenover, E. M. Mamizuka, C. G. Gemmell, M. N. Kim, M. C. Ploy, N. El-Solh, V. Ferraz, and K. Hiramatsu.** 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **41**:5-14.
26. **Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki, and K. Hiramatsu.** 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. Antimicrob Agents Chemother **44**:2276-85.
27. **Davani S., P. M., B. Royer, B. Hoen, J.-P. Kantelip.** 2002. Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique des principaux antibiotiques. Annales de Biologie Clinique **60**:655-61.
28. **Denis, O., C. Nonhoff, B. Byl, C. Knoop, S. Bobin-Dubreux, and M. J. Struelens.** 2002. Emergence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a Belgian hospital: microbiological and clinical features. J Antimicrob Chemother **50**:383-91.
29. **Floret, D.** 2001. [Clinical aspects of streptococcal and staphylococcal toxic diseases]. Arch Pediatr **8 Suppl 4**:762s-768s.
30. **Fonsale, N., M. Bes, I. Verdier, A. Carricajo, C. Ploton, G. Aubert, J. Etienne, F. Vandenesch, and A. M. Freydiere.** 2004. Specific identification of *Staphylococcus aureus* by Staphychrom II, a rapid chromogenic staphylocoagulase test. J Clin Microbiol **42**:1962-4.
31. **Franchi, D., M. W. Climo, A. H. Wong, M. B. Edmond, and R. P. Wenzel.** 1999. Seeking vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* among patients with vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis **29**:1566-8.
32. **Fridkin, S. K.** 2001. Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. Clin Infect Dis **32**:108-15.

33. **Garcia Quetglas, E., J. R. Azanza Perea, B. Sadaba Diaz de Rada, and I. Gil Aldea.** 2003. [Pharmacology of antimicrobials used in the treatment of serious Gram-positive bacteria infections]. *Rev Esp Quimioter* **16**:277-88.
34. **Geisel, R., F. J. Schmitz, L. Thomas, G. Berns, O. Zetsche, B. Ulrich, A. C. Fluit, H. Labischinsky, and W. Witte.** 1999. Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Dusseldorf area. *J Antimicrob Chemother* **43**:846-8.
35. **Grattard, F.** "Electrophorèse en champ pulsé" in :J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet "Précis de bactériologie clinique" Ed ESKA 2000 p267-77.
36. **Hanaki, H., K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, H. Labischinski, and K. Hiramatsu.** 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* **42**:199-209.
37. **Hanaki, H., H. Labischinski, Y. Inaba, N. Kondo, H. Murakami, and K. Hiramatsu.** 1998. Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* **42**:315-20.
38. **Hiramatsu, K.** 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* **1**:147-55.
39. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670-3.
40. **Hiramatsu, K., L. Cui, and K. Kuwahara-Arai.** 2004. Has vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* started going it alone? *Lancet* **364**:565-6.
41. **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F. C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **40**:135-6.
42. **Howe, R. A., K. E. Bowker, T. R. Walsh, T. G. Feest, and A. P. MacGowan.** 1998. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **351**:602.
43. **Howe, R. A., M. Wootton, P. M. Bennett, A. P. MacGowan, and T. R. Walsh.** 1999. Interactions between methicillin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains displaying different phenotypes of vancomycin susceptibility. *J Clin Microbiol* **37**:3068-71.
44. **Howe, R. A., M. Wootton, T. R. Walsh, P. M. Bennett, and A. P. MacGowan.** 1999. Expression and detection of hetero-vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **44**:675-8.
45. **Howe, R. A., M. Wootton, T. R. Walsh, P. M. Bennett, and A. P. Macgowan.** 2000. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **45**:130-2.
46. **Hubert, S. K., J. M. Mohammed, S. K. Fridkin, R. P. Gaynes, J. E. McGowan, Jr., and F. C. Tenover.** 1999. Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: evaluation of a novel screening method and results of a survey of selected U.S. hospitals. *J Clin Microbiol* **37**:3590-3.
47. **Ike, Y., Y. Arakawa, X. Ma, K. Tatewaki, M. Nagasawa, H. Tomita, K. Tanimoto, and S. Fujimoto.** 2001. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. *J Clin Microbiol* **39**:4445-51.

48. **Janda, W. M., K. Ristow, and D. Novak.** 1994. Evaluation of RapiDEC Staph for identification of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol* **32**:2056-9.
49. **Jelh, F., M. Chomarat, M. Weber, A. Gerard.** 2000. De l'antibiogramme à la prescription ed. bioMérieux.
50. **Joly-Guillou, M. L.** 2004. [*Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in ICU]. *Réanimation* **13**:185-189.
51. **Kantzanou, M., P. T. Tassios, A. Tseleni-Kotsovili, N. J. Legakis, and A. C. Vatopoulos.** 1999. Reduced susceptibility to vancomycin of nosocomial isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **43**:729-31.
52. **Kim, M. N., C. H. Pai, J. H. Woo, J. S. Ryu, and K. Hiramatsu.** 2000. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* **38**:3879-81.
53. **Koehl, J. L., A. Muthaiyan, R. K. Jayaswal, K. Ehlert, H. Labischinski, and B. J. Wilkinson.** 2004. Cell wall composition and decreased autolytic activity and lysostaphin susceptibility of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3749-57.
54. **Le Minor L., V. M.** "Bactériologie médicale" 2ème ed. Med.Sc. Flammarion.
55. **Lecaillon, E., P. Gueudet, M. Wooton, T. R. Walsh, A. P. Macgowan, and M. E. Jones.** 2002. [Endemic heteroresistant glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus* (hGISA) comprising unrelated clonal types and not associated with vancomycin therapy]. *Pathol Biol (Paris)* **50**:525-9.
56. **Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* **319**:157-61.
57. **Leone, M., M. L. Ayem, and C. Martin.** 2000. [Glycopeptides]. *Ann Fr Anesth Reanim* **19**:177-87.
58. **Liu, C., and H. F. Chambers.** 2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3040-5.
59. **Livermore, D. M.** 2000. Antibiotic resistance in *staphylococci*. *Int J Antimicrob Agents* **16 Suppl 1**:S3-10.
60. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**:520-32.
61. **Mallaval, F. O., A. Carricajo, F. Delavenna, C. Recule, N. Fonsale, G. Manquat, D. Raffenot, O. Rogeaux, G. Aubert, and J. Tous.** 2004. Detection of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a French hospital. *Clin Microbiol Infect* **10**:459-61.
62. **Mallaval, F. O., A. Carricajo, I. Martin, N. Fonsale, F. Grattard, P. Fascia, G. Aubert, F. Zeni, F. Lucht, B. Pozzetto, and P. Berthelot.** 2003. [Epidemic outbreaks control involving *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides]. *Pathol Biol (Paris)* **51**:469-73.
63. **Marchese, A., G. Balistreri, E. Tonoli, E. A. Debbia, and G. C. Schito.** 2000. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. *J Clin Microbiol* **38**:866-9.
64. **Marlowe, E. M., M. D. Cohen, J. F. Hindler, K. W. Ward, and D. A. Bruckner.** 2001. Practical strategies for detecting and confirming vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*: a tertiary-care hospital laboratory's experience. *J Clin Microbiol* **39**:2637-9.

65. **Mastouri, M., Nour, M., Ben Nejma, M., Bouallegue, O., Hammami, M., Khedher, M.** 2004. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline: détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. *Pathol Biol (Paris)*.
66. **Moise-Broder, P. A., G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, J. J. Schentag, A. Forrest, and R. C. Moellering, Jr.** 2004. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* **38**:1700-5.
67. **Montcriol, A., M.E. Reverdy, J.L. Koeck.** 2003. Mécanismes et méthodes de détection de la résistance de *Staphylococcus aureus* aux glycopeptides. *Revue Française des Laboratoires* N° **352**.
68. **Moore, M. R., F. Perdreau-Remington, and H. F. Chambers.** 2003. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1262-6.
69. **Naimi, T. S., D. Anderson, C. O'Boyle, D. J. Boxrud, S. K. Johnson, F. C. Tenover, and R. Lynfield.** 2003. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* with phenotypic susceptibility to methicillin in a patient with recurrent bacteremia. *Clin Infect Dis* **36**:1609-12.
70. **Noble, W. C., Z. Virani, and R. G. Cree.** 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **72**:195-8.
71. **Nonhoff, C., O. Denis, and M. J. Struelens.** 2005. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in Belgian hospitals. *Clin Microbiol Infect* **11**:214-20.
72. **Paton, R., T. Snell, F. X. Emmanuel, and R. S. Miles.** 2001. Glycopeptide resistance in an epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **48**:941-2.
73. **Perry, J. D., C. Rennison, L. A. Butterworth, A. L. Hopley, and F. K. Gould.** 2003. Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **41**:5695-8.
74. **Piemont, Y.** 1997. Les toxines synergo-hyménotropes des staphylocoques. *Med Mal Infect* **27**:135-142.
75. **Pierard, D., H. Vandebussche, I. Verschraegen, and S. Lauwers.** 2004. [Screening for *Staphylococcus aureus* with a reduced susceptibility to vancomycin in: a Belgian hospital]. *Pathol Biol (Paris)* **52**:486-8.
76. **Ploy, M. C., D.Chainier, F. Garnier, T.Walsh, A.Karlsson, A.Bolmström, C.Grelaud,C.Debrock, F.Denis.** 2003. Surveillance of VISA strains during one year in a french hospital. *ICAAC*.
77. **Ploy, M. C., C. Grelaud, C. Martin, L. de Lumley, and F. Denis.** 1998. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* **351**:1212.
78. **Reverdy, M. E., S. Jarraud, S. Bobin-Dubreux, E. Burel, P. Girardo, G. Lina, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2001. Incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals. *Clin Microbiol Infect* **7**:267-72.
79. **Ruef, C.** 2004. Epidemiology and clinical impact of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection* **32**:315-27.

80. **Ruzin, A., G. Singh, A. Severin, Y. Yang, R. G. Dushin, A. G. Sutherland, A. Minnick, M. Greenstein, M. K. May, D. M. Shlaes, and P. A. Bradford.** 2004. Mechanism of action of the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:728-38.
81. **Sakoulas, G., G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., C. Wennersten, L. Venkataraman, R. P. Novick, and H. S. Gold.** 2002. *Accessory gene regulator (agr)* locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1492-502.
82. **Sancak, B., S. Ercis, D. Menemenlioglu, S. Colakoglu, and G. Hascelik.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* **56**:519-23.
83. **Schmitz, F. J., A. Krey, R. Geisel, J. Verhoef, H. P. Heinz, and A. C. Fluit.** 1999. Susceptibility of 302 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 20 European university hospitals to vancomycin and alternative antistaphylococcal compounds. SENTRY Participants Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**:528-30.
84. **Sieradzki, K., and Z. Markiewicz.** 2004. Mechanism of vancomycin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Pol J Microbiol* **53**:207-14.
85. **Smith, T. L., M. L. Pearson, K. R. Wilcox, C. Cruz, M. V. Lancaster, B. Robinson-Dunn, F. C. Tenover, M. J. Zervos, J. D. Band, E. White, and W. R. Jarvis.** 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *N Engl J Med* **340**:493-501.
86. **Stevens, D. L., D. Herr, H. Lampiris, J. L. Hunt, D. H. Batts, and B. Hafkin.** 2002. Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis* **34**:1481-90.
87. **Tenover, F. C.** 1999. Implications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* **43 Suppl**:S3-7.
88. **Tenover, F. C.** 2005. The Real Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Has Arrived. *Clinical Microbiology Newsletter* **Vol.27, No.5**.
89. **Tenover, F. C.** 2000. VRSA, VISA, and GISA: The Dilemma Behind The Name Game. *Clinical Microbiology Newsletter* **Vol.22, No. 7**.
90. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-9.
91. **Tenover, F. C., J. W. Biddle, and M. V. Lancaster.** 2001. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* **7**:327-32.
92. **Tenover, F. C., M. V. Lancaster, B. C. Hill, C. D. Steward, S. A. Stocker, G. A. Hancock, C. M. O'Hara, S. K. McAllister, N. C. Clark, and K. Hiramatsu.** 1998. Characterization of *staphylococci* with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* **36**:1020-7.
93. **Tenover, F. C., and L. C. McDonald.** 2005. Vancomycin-resistant *staphylococci* and *enterococci*: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis* **18**:300-5.
94. **Tenover, F. C., L. M. Weigel, P. C. Appelbaum, L. K. McDougal, J. Chaitram, S. McAllister, N. Clark, G. Killgore, C. M. O'Hara, L. Jevitt, J. B. Patel, and B. Bozdogan.** 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:275-80.

95. **Trakulsomboon, S., S. Danchaivijitr, Y. Rongrungruang, C. Dhiraputra, W. Susaemgrat, T. Ito, and K. Hiramatsu.** 2001. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. *J Clin Microbiol* **39**:591-5.
96. **Uttley, A. H., C. H. Collins, J. Naidoo, and R. C. George.** 1988. Vancomycin-resistant *enterococci*. *Lancet* **1**:57-8.
97. **van Griethuysen, A., M. Bes, J. Etienne, R. Zbinden, and J. Kluytmans.** 2001. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **39**:86-9.
98. **Vandenesch, F.** 1997. Régulation de l'expression des exoprotéines de *Staphylococcus aureus*. *Med Mal Infect* **27**:150-158.
99. **Verdier, I., Lina, G., Gillet, Y., Vandenesch, F.** "*Staphylococcus*" disponible sur <http://microbes-edu.org/etudiant/staph.html>.
100. **Verdier, I., M. E. Reverdy, J. Etienne, G. Lina, M. Bes, and F. Vandenesch.** 2004. *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides belong to accessory gene regulator group I or II. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1024-7.
101. **Villeveille, T., I. Vincenti-Rouquette, J. L. Koeck, F. Petitjeans, J. M. Rousseau, and L. Brinquin.** 2001. [Fatal septicemia from *Staphylococcus aureus* resistance to glycopeptides]. *Ann Fr Anesth Reanim* **20**:498-9.
102. **Walsh, T. R., A. Bolmstrom, A. Qwarnstrom, P. Ho, M. Wootton, R. A. Howe, A. P. MacGowan, and D. Diekema.** 2001. Evaluation of current methods for detection of *staphylococci* with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* **39**:2439-44.
103. **Walsh, T. R., and R. A. Howe.** 2002. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* **56**:657-75.
104. **Walsh, T. R., R. A. Howe, M. Wootton, P. M. Bennett, and A. P. MacGowan.** 2001. Detection of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **47**:357-8.
105. **Ward, P. B., P. D. Johnson, E. A. Grabsch, B. C. Mayall, and M. L. Grayson.** 2001. Treatment failure due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to vancomycin. *Med J Aust* **175**:480-3.
106. **Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore, and F. C. Tenover.** 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* **302**:1569-71.
107. **Whitener, C. J., S. Y. Park, F. A. Browne, L. J. Parent, K. Julian, B. Bozdogan, P. C. Appelbaum, J. Chaitram, L. M. Weigel, J. Jernigan, L. K. McDougal, F. C. Tenover, and S. K. Fridkin.** 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clin Infect Dis* **38**:1049-55.
108. **Wong, S. S., P. L. Ho, P. C. Woo, and K. Y. Yuen.** 1999. Bacteremia caused by *staphylococci* with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin Infect Dis* **29**:760-7.
109. **Wootton, M., M. B. Avison, P. M. Bennett, R. A. Howe, A. P. MacGowan, and T. R. Walsh.** 2004. Genetic analysis of 17 genes in *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin (VISA) and heteroVISA. *J Antimicrob Chemother* **53**:406-7.
110. **Wootton, M., R. A. Howe, R. Hillman, T. R. Walsh, P. M. Bennett, and A. P. MacGowan.** 2001. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* **47**:399-403.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

d' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;

d' exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 325

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Les *Staphylococcus aureus* sont une cause majeure d'infections nosocomiales dans le monde. Les glycopeptides restent le traitement de choix des infections sévères à SARM. Cependant, après l'émergence de résistance à la vancomycine chez les entérocoques et chez les staphylocoques coagulase négative, des souches de *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été isolées, en particulier, au Japon, en France, en Espagne, au Royaume-Uni et aux Etats-Unis. Le but de notre étude était de déterminer la proportion de ces souches au sein de l'hôpital Haut-Lévêque à Bordeaux. Parmi les 468 souches de *S. aureus* screenées sur géloses contenant 4 mg/L de teicoplanine, 65 souches ont été sélectionnées pour la détermination des CMI par Etest en « macrométhode ». 39 souches ont été étudiées en analyse de population. Ce protocole a permis de détecter 5 souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides. La diversité des souches a été confirmée par électrophorèse en champ pulsé. Les dossiers cliniques ont permis de mettre en évidence un échec thérapeutique dans 3 cas.

INCIDENCE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WITH REDUCED SUSCEPTIBILITY TO GLYCOPEPTIDES IN HAUT-LEVEQUE HOSPITAL IN BORDEAUX (NOVEMBER 2004- APRIL 2005)

SUMMARY

Staphylococcus aureus are a major cause of nosocomial infections around the world. Glycopeptides remain the drug of choice for severe infections caused by MRSA. However, after the emergence of vancomycine resistance in *enterococcus* and in the coagulase negative *staphylococcus*, strains of *S. aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides have been reported in Japan, France, Spain, the UK and the United States. The aim of our study was to determine the proportion of these strains in the Haut-Lévêque Hospital of Bordeaux. Among 468 *S. aureus* isolates screened on an initial agar screening test containing 4 mg/L of teicoplanin, 65 isolates were selected for the determination of the MICs by "macromethod" Etest. 39 strains were studied by population analysis. This procedure detected 5 isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. The diversity of the strains was confirmed by pulsed-field gel electrophoresis. The clinical history showed failure in treatment for 3 patients.

MOTS CLES

Staphylococcus aureus, glycopeptides, GISA, hGISA, analyse de population

Laboratoire de Bactériologie – Pr C. BEBEAR

Hôpital Haut -Lévêque – CHU de Bordeaux